



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

IBSAL
Instituto de Investigación
Biomédica de Salamanca



Control nucleocitoplasmático del complejo Calpaína-2/Calpastatina durante la Tolerancia isquémica neuronal

Tesis Doctoral
Jesús María Hermosín Montes

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG)

Junio 2023



Control Nucleocitoplasmático
del Complejo Calpaína-
2/Calpastatina durante la
Tolerancia Isquémica
Neuronal

Jesús María Hermosín Montes

Directores:

PROF^a. DR^a. ÁNGELES ALMEIDA PARRA

PROF^a. DR^a. MARÍA DELGADO ESTEBAN

SALAMANCA, 2023

Parte de los resultados expuestos en la presente Memoria han sido presentados a los siguientes congresos Nacionales de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM):

43º Congreso de la SEBBM. Celebrado en Barcelona, septiembre de 2021.

44º Congreso de la SEBBM. Celebrado en Málaga, septiembre de 2022.

Dra. Ángeles Almeida Parra, Investigadora Científica del CSIC en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG. CSIC-Universidad de Salamanca) y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Dra. María Delgado Esteban, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por Jesús María Hermosín Montes, titulado “Control Nucleocitoplasmático del Complejo Calpaína-2/Calpastatina durante la Tolerancia isquémica Neuronal”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autorizan su presentación.

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 15 de mayo de 2023.



Fdo: Ángeles Almeida Parra

Fdo: María Delgado Esteban



Este trabajo ha sido financiado con proyectos de investigación concedidos por el Instituto de Salud Carlos III (CP0014/00010, PI18/00103, PI21/00727 y RD21/0006/0005, co-financiados por la Unión Europea) y la Junta de Castilla y León (CSI151P20; Escalera de Excelencia CLU 2017-03 cofinanciada por la Unión Europea FEDER/FSE+ and NextGenerationEU). Jesús Hermosín obtuvo un contrato predoctoral de personal investigador de la Junta de Castilla y León (EDU/556/2019).

ABREVIATURAS

7-AAD: 7-amino-actinomicina D

Ac-DEVD-AMC: Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina

ACM: Arteria cerebral media

ACV: Accidente cerebrovascular

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

AIT: Ataque isquémico transitorio

AMC: 7-amino-4-metilcumarina

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ATP: Adenosín trifosfato

ARNm: ARN mensajero

Bad: Bcl-2 associated death promoter protein

Bax: Bcl-2 associated X protein

BCA: Ácido bicinconínico

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bid: BH3 interacting-domain death agonist

BSA: Albúmina sérica bovina

Cdk: Cyclin-dependent-like kinase

Ct: Ciclo umbral

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DEPC: Di-etil piro-carbonato

DIV: Días in vitro

DMEM: Dulbeccó's Modified Eagle Medium

EDTA: Ácido etilen-di-amino-tetra- acético

Fold: Unidades arbitrarias de expresión

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

IPC: Precondicionamiento isquémico

IL-6: Interleucina-6

KDa: Kilodalton

KO: Knock-out

MAP-2: Microtubule Associated Protein 2

MDM2: Murine doble minute 2

NES: Señal de exportación nuclear

NF-κB: Nuclear factor κB

NLS: Señal de localización nuclear

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

NMDA-PC: Precondicionamiento con NMDA

NMDA-R: Receptor N-metil-D-aspartato

Nx: Normoxia

OGD: Oxygen-Glucose Deprivation

OptiMEM: Medio mínimo esencial optimizado

pb: Pares de bases

PBS: Tampón fosfato salino

PC: Precondicionamiento

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDL: Poli-D-lisina

PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinasa

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato

PKA: Protein kinase A

PKC: Protein kinase C

PSA: Persulfato sódico amónico

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

RIPA: Tampón para ensayo de radioinmunoprecipitación

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS

S.E.M.: Error estándar de la media

SF: Suero fetal

siRNA: RNA de interferencia

TBS: Tampón tris salino

TEMED: N, N, N, N'-tetrametilendiamina

TI: Tolerancia isquémica

TTBS: Tampón tris salino con tween 20

TTC: Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

WT: Wild type

Contenido

ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	18
1. EL ICTUS ISQUÉMICO Y EL AIT: LA PARADOJA ISQUÉMICA	19
1.1. EL ICTUS ISQUÉMICO.....	20
1.2. EL ATAQUE ISQUÉMICO TRANSITORIO	21
2. NEUROPROTECCIÓN FRENTE A LA CASCADA ISQUÉMICA	23
3. EL PRECONDICIONAMIENTO Y LA TOLERANCIA ISQUÉMICA	25
3.1. TIPOS DE CONDICIONAMIENTO	25
3.2. TIPOS DE ESTÍMULOS DE PRECONDICIONAMIENTO	26
3.3. MECANISMOS DE TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL	27
3.4. OTRAS ESTRATEGIAS NEUROPROTECTORAS FRENTE AL DAÑO ISQUÉMICO	29
4. LA ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS DURANTE LA ISQUEMIA	30
4.1. EL ESTRÉS OXIDATIVO	30
4.2. MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL.....	31
4.3. LA ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS DURANTE EL IPC	32
5. EL SISTEMA DE LAS CALPAÍNAS	34
5.1. ESTRUCTURA DE LAS CALPAÍNAS EN EL CEREBRO: CAPN1 Y CAPN2.....	39
5.1.1. Estructura de la subunidad catalítica	40
5.1.2. Estructura de la subunidad reguladora	42
5.2. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS.....	43
5.3. PRINCIPALES FUNCIONES CELULARES DE LAS CALPAÍNAS	47
5.3.1. Regulación del ciclo celular	49
5.3.2. Potenciación a largo plazo	50
5.3.3. Regulación de la vía apoptótica	50
5.3.4. Implicación en la autofagia	51
5.4. REGULACIÓN DEL SISTEMA DE LAS CALPAÍNAS.....	51
5.4.1. Regulación por Calcio y formación de heterodímeros	52
5.4.2. Autólisis de las calpaínas.....	53
5.4.3. Translocación a la membrana. Localización subcelular.....	54
5.4.4. Inhibidor endógeno de calpaínas: La Calpastatina.....	57
5.4.5. Otros inhibidores y activadores de la función de las calpaínas	61
5.4.6. Mecanismos postraduccionales	62
5.5. FACTORES IMPLICADOS EN EL RECONOCIMIENTO DE LOS SUSTRATOS	66
5.5.1. La afinidad por su sustrato	66
5.5.2. Sustratos marcadores de la actividad de las calpaínas	67
HIPÓTESIS	71

OBJETIVOS	73
MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. MODELOS DE PRECONDICIONAMIENTO Y DE ISQUEMIA EN CEREBRO DE RATÓN	76
1.1. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO DE ISQUEMIA IN VIVO	76
1.2. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL	77
1.3. ANÁLISIS DEL VOLUMEN DE LA LESIÓN CEREBRAL	77
2. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES DE RATÓN	78
3. MODELOS DE PRECONDICIONAMIENTO E ISQUEMIA EN CULTIVOS DE NEURONAS CORTICALES DE RATÓN	79
4. ANÁLISIS DE LA MUERTE POR APOPTOSIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO 81	
5. ANÁLISIS POR FLUORIMETRÍA DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3	83
6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LOS NIVELES DE ARNM MEDIANTE PCR CUANTITATIVA	84
6.1. EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ARN.....	84
6.2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ARNM MEDIANTE PCR CUANTITATIVA (RT-QPCR)	85
6.2.1. <i>Retrotranscripción (RT)</i>	85
6.2.2. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa</i>	86
6.2.3. <i>Electroforesis de ADN en geles horizontales de agarosa</i>	89
7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES	90
8. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR: NÚCLEO Y CITOSOL	91
9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	92
9.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	92
9.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES	93
9.3. ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS	94
10. INMUNOCITOQUÍMICA	98
11. MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y DE ACTIVIDAD DE LAS CALPAÍNAS	100
11.1. SILENCIAMIENTO GÉNICO	100
11.2. INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA.....	102
12. ENSAYO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA	102
12.1. UNIÓN DEL ANTICUERPO A LAS DYNABEADS®	102
12.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS E INMUNOPRECIPITACIÓN	103
12.3. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	104

13.	ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE HETERODÍMEROS	104
14.	ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	105
15.	DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H₂O₂	106
16.	DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN	108
16.1.	CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO 3XFLAG-VACÍO.....	108
16.2.	TRANSFORMACIÓN BACTERIANA (DH-5 α) Y PURIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS	109
16.3.	EXPRESIÓN ECTÓPICA MEDIANTE TRANSFECCIONES CELULARES	110
16.4.	MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES HEK-293T Y SHSY5Y	111
17.	PREDICCIÓN IN SILICO DE SECUENCIAS NLS	112
18.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	114
RESULTADOS		115
1.	EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA ESTABILIZACIÓN DE LAS CALPAÍNAS Y SU ACTIVIDAD, LO QUE REDUCE LA LESIÓN CEREBRAL TRAS LA ISQUEMIA	116
1.1.	EL PRECONDICIONAMIENTO REDUCE EL TAMAÑO DE INFARTO CEREBRAL INDUCIDO TRAS LA ISQUEMIA	117
1.2.	EL PRECONDICIONAMIENTO PROMUEVE LA DESESTABILIZACIÓN DE LAS CALPAÍNAS CAPN1 Y CAPN2 Y PREVIENE EL AUMENTO EN SU ACTIVIDAD EN RESPUESTA A LA ISQUEMIA	119
2.	EL PRECONDICIONAMIENTO PROMUEVE LA TOLERANCIA NEURONAL, A TRAVÉS DE LA DESESTABILIZACIÓN DE LAS CALPAÍNAS, EN RESPUESTA AL DAÑO ISQUÉMICO.....	123
2.1.	EL IPC PREVIENE LA MUERTE NEURONAL POR APOPTOSIS INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL, PROMOVRIENDO LA NEUROPROTECCIÓN.....	124
2.2.	EL IPC INDUCE LA DESESTABILIZACIÓN DE LAS CALPAÍNAS EN RESPUESTA A LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL.....	127
2.2.1.	<i>El IPC y la isquemia no inducen cambios significativos en los niveles de ARN mensajero de CAPN1 y CAPN2</i>	<i>128</i>
2.2.2.	<i>El IPC previene la formación del heterodímero CAPN2/CSS1-CSS2 y promueve su desestabilización en respuesta a la isquemia.....</i>	<i>129</i>
3.	EL IPC PREVIENE LA ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS NEURONALES INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL	131
3.1.	EL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE CAPN2 MIMETIZA LA NEUROPROTECCIÓN DEL PRECONDICIONAMIENTO EN RESPUESTA AL DAÑO ISQUÉMICO.....	134
3.2.	LA INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS CALPAÍNAS MIMETIZA EL EFECTO NEUROPROTECTOR DEL PRECONDICIONAMIENTO.....	139
4.	EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE CAPN2.....	140
4.1	EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO PREVIENE LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE CAPN2 .	141

4.2. EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA PROTEÓLISIS DE FODRINA TRAS EL DAÑO ISQUÉMICO, LO QUE PREVIENE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO FODRINA/CAPN2 NUCLEAR	144
4.3. EL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE CAPN2 MIMETIZA EL EFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO	145
5. EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO CAPN2/CAST, EVITANDO LA PROTEOLISIS DE CAST INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA.....	146
5.1. EL IPC PREVIENE LA FORMACIÓN DE LOS FRAGMENTOS PROTEOLIZADOS DE CAST, CONSERVANDO SU FUNCIÓN INHIBITORIA FRENTE A CAPN2	147
5.2. LOS CAMBIOS EN EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN/DEFOSFORILACIÓN PODRÍAN AFECTAN A LA TOLERANCIA ISQUÉMICA NEURONAL	149
6. ESTUDIOS REALIZADOS IN SÍLICO PREDICEN UNA POSIBLE SECUENCIA DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR EN CAPN2.....	150
6.1. EL POSIBLE NLS INTERACCIONA CON LA SUBUNIDAD REGULADORA IMPLICADA EN CAMBIOS DE LOCALIZACIÓN	151
6.2. LA ARG417 DEL POSIBLE NLS QUEDA LIBRE EN EL ESPACIO CUANDO INTERACCIONA CON CAST.....	153
6.3. LA SOBREENPRESIÓN DE CAPN2 PROMUEVE LA TOXICIDAD CELULAR	155
7. EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	156
7.1. EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA FORMACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO INDUCIDO TRAS LA ISQUEMIA	157
7.2. EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA ACUMULACIÓN DE H ₂ O ₂ TRAS LA ISQUEMIA	159
7.3. EL ANTIOXIDANTE GLUTATIÓN PREVIENE LA TRASLOCACIÓN NUCLEAR DE CAPN2	161
7.4. OXIDACIÓN DE CAPN2	163
DISCUSIÓN	166
CONCLUSIONES	176
CONCLUSIÓN FINAL.....	180
BIBLIOGRAFÍA.....	182

INTRODUCCIÓN

1. EL ICTUS ISQUÉMICO Y EL AIT: LA PARADOJA ISQUÉMICA

El ictus sigue siendo, la primera causa de discapacidad y segunda de muerte en el Mundo [Organización Mundial de la Salud; <https://www.who.int/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019>]. En España existen unos 110.000 nuevos casos de ictus al año, de los cuales al menos el 15 % resulta mortal.

El ictus isquémico, representa el 80%, mientras que el ictus hemorrágico constituye el 20 % de los casos. El ictus isquémico, es una enfermedad cerebrovascular aguda que se desencadena por la interrupción brusca del flujo sanguíneo. Su origen en la mayoría de los casos se debe a la formación de un trombo, que bloquea uno o varios vasos sanguíneos, provocando la privación de oxígeno y de nutrientes en uno o varios territorios del cerebro. El fallo en estos nutrientes trae como consecuencia el daño cerebral con distintos grados de afectación neurológica o incluso la muerte (Lipton 1999; Kuriakose and Xiao 2020).

Su incidencia cada vez es mayor y tiene un carácter multifactorial. Entre los factores de riesgo asociados, se encuentra la edad y la existencia de otras enfermedades, como son la hipertensión, la hiperlipidemia, la diabetes mellitus, y en general la falta de hábitos saludables (Katan & Luft, 2018).

El Ataque isquémico transitorio o AIT, es a lo que se le conoce tradicionalmente por ser una interrupción isquémica transitoria de duración menor de 24 horas. El AIT está relacionado con el ictus isquémico, ya que se le ha asociado a riesgo de recurrencia de un nuevo episodio isquémico. Sin embargo, el AIT no se acompaña de la presencia de infarto en la neuroimagen ni de afectación neurológica (Easton et al., 2009). Existen evidencias clínicas de la existencia de

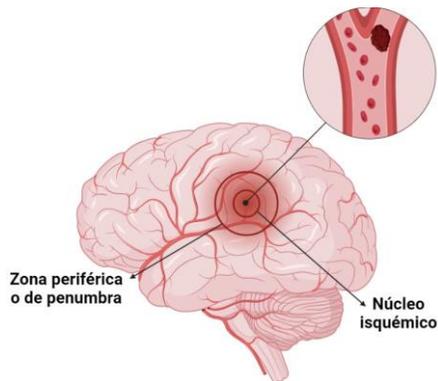
este efecto paradójico de la isquemia transitoria antes del infarto cerebral como son los estudios de Aboa-Ebolu  y otros (Aboa-Ebolu  et al., 2011; Castillo et al., 2003; Hoshino et al., 2013; R. Weber et al., 2011) donde demuestran como los pacientes que han sufrido un ictus isquémico y que presentan antecedentes de AIT reciente, presentan un mejor pronóstico funcional, es decir una mejor evolución neurológica acompañada de una menor lesión cerebral.

1.1. El ictus isquémico

El objetivo de la terapia frente al ictus isquémico consiste en restablecer el flujo sanguíneo al cerebro lo antes posible con objeto de minimizar el daño del tejido y evitar la gravedad de las secuelas neurológicas del paciente. En la actualidad, el tratamiento con trombolíticos, como es el activador del plasminógeno tisular (tPA), se utilizan a menudo para disolver el coágulo y restaurar el flujo sanguíneo. Además, la intervención quirúrgica basada en la trombectomía mecánica se utiliza en algunos casos para eliminar el coágulo. Sin embargo, no todos los pacientes pueden beneficiarse de estos tratamientos (Kuo et al., 2020; Zhao et al., 2022) siendo necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas novedosas que ayuden a mitigar los efectos deletéreos y las secuelas que se originan tras el daño isquémico cerebral.

Tras sufrir el daño isquémico, se han establecido en el territorio cerebral dos zonas que difieren entre sí y que son (ESQUEMA 1): 1) una zona central denominada el core o núcleo isquémico, caracterizada porque las células mueren principalmente por procesos rápidos de necrosis, y 2) una zona periférica al núcleo isquémico o zona de penumbra, donde las neuronas han demostrado tener un distinto grado de susceptibilidad a morir más lentamente por fenómenos de apoptosis (Choi et al., 2021). De hecho, esta zona de

penumbra y los mecanismos de muerte por apoptosis siguen constituyendo, hoy en día, una diana de investigación en la búsqueda de los mecanismos moleculares implicados en la isquemia y en el establecimiento de estrategias neuroprotectoras frente al daño isquémico cerebral.



ESQUEMA 1. El núcleo isquémico o zona donde las células mueren rápidamente por necrosis y la zona periférica o de penumbra, donde las células mueren más lentamente por fenómenos apoptóticos.

1.2. El Ataque Isquémico Transitorio

El ataque isquémico transitorio (AIT), es un episodio breve de síntomas neurológicos transitorios que puede durar desde minutos hasta una hora y que se origina por una interrupción temporal en el flujo sanguíneo al cerebro (Gutiérrez-Zúñiga et al., 2019).

La evidencia clínica ha demostrado que el AIT posee un potente efecto protector contra el ictus isquémico, ya que se ha observado que en los pacientes tras sufrir un ictus y con antecedente de AIT (sobre todo en los primeros 3 meses previos) tienen menor lesión cerebral y mejor pronóstico funcional, en comparación con aquellos que no han experimentado un AIT

previo al ictus (Castillo et al., 2003; Easton et al., 2009; Hoshino et al., 2013; Ramos-Araque et al., 2019; R. Weber et al., 2011). Todas estas evidencias clínicas hacen que el AIT pueda ser considerado un estado precondicionado en el paciente tras sufrir un ictus isquémico.

El fenómeno de tolerancia isquémica observado en el AIT ha sido muy poco estudiado en pacientes que sufren ictus, destacando algunos estudios de (Castillo et al., 2003; Purroy et al., 2016) y más recientemente los trabajos publicados en (Colàs-Campàs et al., 2020), en los que se demuestra una mejor evolución neurológica asociada al AIT.

Otro aspecto importante es que, a su vez los esfuerzos actuales se centran en la identificación temprana y en el tratamiento rápido del AIT, ya que así se podría prevenir, no solo la progresión de la enfermedad cerebrovascular, sino que se conseguiría reducir el riesgo de futuros eventos cerebrovasculares graves o de recurrencia (Amin et al. 2023).

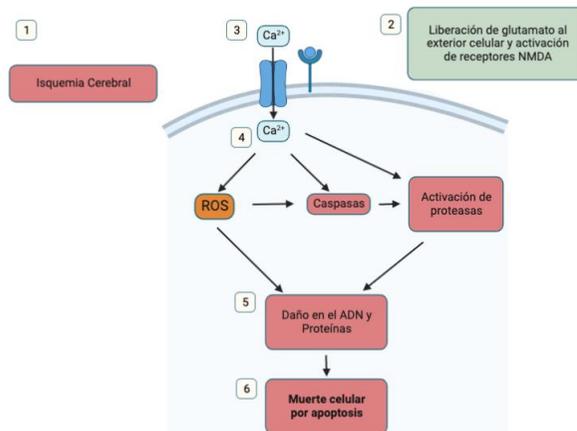
2. NEUROPROTECCIÓN FRENTE A LA CASCADA ISQUÉMICA

La Neuroprotección surgió como estrategia prometedora cuyo objetivo es reducir la lesión cerebral, al interferir en las diferentes y complejas vías bioquímicas que se inducen tras la isquemia, como son el estrés oxidativo, la apoptosis neuronal y la inflamación entre otras (Li et al. 2017; Rodriguez et al 2021).

La identificación de las vías implicadas en la neuroprotección cerebral frente a la isquemia, hace necesario conocer previamente las rutas de señalización a nivel molecular y celular que se desencadenan tras la isquemia.

La cascada isquémica es un proceso complejo, se resume en el ESQUEMA 2 ya que puede tener múltiples etapas y participan numerosos mecanismos, entre los que se encuentra la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (R-NMDA) de glutamato, la entrada de calcio intracelular y la activación de proteínas sensibles al calcio (Lai et al., 2014).

La activación de los R-NMDA: Durante la isquemia cerebral, la disminución del flujo sanguíneo conduce a la sobreproducción del principal neurotransmisor excitador del cerebro, el glutamato. El exceso de glutamato puede activar los R-NMDA en las neuronas, lo que provoca la apertura de los canales de sodio y la entrada exacerbada de calcio y su acumulación intracelular (Kalogeris et al., 2012). La entrada de calcio desencadena una serie de eventos como son: la activación de enzimas con función proteasa, que pueden dañar las membranas celulares, la activación de proteínas que promueven los eventos de muerte por apoptosis y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar las estructuras celulares (Kalogeris et al., 2012).



ESQUEMA 2. La Cascada isquémica. Tras el estímulo isquémico (1) se aumenta la sobreproducción de glutamato en el exterior celular y activación de los receptores NMDA (R-NMDA) (2), provocando la excitotoxicidad; la entrada masiva de calcio al interior celular (3); la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de proteasas sensibles al Ca^{2+} , como las caspasas y las calpainas (4); el daño en el ADN y proteínas junto al fallo mitocondrial (5) y finalmente la muerte celular por apoptosis y necrosis entre otras (6).

La activación de proteínas sensibles al calcio incluye entre otras a la, calmodulina, a las proteasas (calpainas y caspasas) y proteínas cinasas. A su vez, la activación de estas proteínas desencadena la activación de las cascadas de señalización celular que contribuyen a generar los efectos

perjudiciales en las células cerebrales en respuesta a la isquemia (Baudry, 2019; Kalogeris et al., 2012; Madden et al., 2007; M. A. Smith & Schnellmann, 2012a) y que pueden llegar a modular la expresión génica (Briz & Baudry, 2017).

La comprensión de todos estos mecanismos puede ser importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a mitigar los efectos perjudiciales de la isquemia cerebral.

3. EL PRECONDICIONAMIENTO Y LA TOLERANCIA ISQUÉMICA

Una de las estrategias neuroprotectoras que se identificó por primera vez en 1986 (Murry, Jennings, and Reimer. 1986) y que ha resurgido con fuerza desde hace unos 10 años, es la que se conoce como condicionamiento (Y. Wang et al., 2020).

Numerosos estudios han demostrado que la aplicación de un estímulo subletal previo (Precondicionamiento) a un daño más severo, promueve la citoprotección en tejidos como el miocardio, el cerebral y el hepático (Fan et al., 2017; Hao et al., 2020a; Rosenzweig et al., 2004; Vartanian et al., 2011). En concreto, el preconditionamiento isquémico (IPC), es el proceso de protección endógena más importante que se conoce (Liang et al., 2021).

En el contexto del ictus, un gran número de estudios han identificado diversos factores por los cuales el preconditionamiento isquémico induce la tolerancia isquémica, entre ellos la activación de síntesis de proteínas (Dirnagl et al., 2009), la degradación o desestabilización de determinadas proteínas (C. Liu et al., 2005; Sung et al., 2021; Vecino et al., 2018); o la activación de las vías de señalización anti-apoptóticas (Barrio et al., 2021; Zhou et al., 2016) entre otras.

3.1. Tipos de Condicionamiento

Existen diferentes tipos de condicionamiento que se diferencian en el momento de la aplicación: antes del daño (pre-condicionamiento); durante el daño (per-condicionamiento) y después del daño (post-condicionamiento). Si, además, estos estímulos se aplican en zonas alejadas del órgano a proteger, como es el cerebro, este tipo de condicionamiento se denomina Remoto. En

los ensayos clínicos, este tipo de condicionamiento Remoto se realiza en una extremidad (brazo o pierna) y con ayuda de un dispositivo similar a un medidor de presión arterial, que, de forma controlada por el facultativo, permite las interrupciones del flujo sanguíneo (Landman et al. 2023; Mollet et al. 2022; Pico et al. 2020; Purroy, Arque, et al. 2020; Purroy, García, et al. 2020; Ren et al. 2008).

En la actualidad están surgiendo novedosas estrategias terapéuticas de intervención en el paciente que incluyen aspectos relacionados con el condicionamiento isquémico, como son el Pre-, Per- o Post- condicionamiento Remoto y que están descritos en los estudios clínicos publicados en (Landman et al. 2023; Mollet et al. 2022; Pico et al. 2020; Purroy, Arque, et al. 2020; Purroy, García, et al. 2020; Ren et al. 2008).

3.2. Tipos de estímulos de preconditionamiento

En los modelos animales y células en cultivo primario se han establecido diferentes tipos de estímulos de preconditionamiento (Hao et al., 2020b):

- 1) Isquémico: que consiste en someter al tejido a una breve y repetida interrupción del flujo sanguíneo antes de una lesión más grave (Gidday, 2006);
- 2) Farmacológico: que utiliza fármacos para simular el efecto del preconditionamiento isquémico, tales como la estimulación subtóxica de los receptores NMDA de Glutamato (Dirnagl et al., 2009; Gidday, 2010; Vecino et al., 2018);
- 3) Térmico: que utiliza la aplicación de temperaturas frías extremas (Yunoki et al., 2003);
- 4) Hipoxia: que somete al tejido a niveles bajos de oxígeno para mejorar su tolerancia a la isquemia (S. Li et al., 2017);
- 5) Luz: que utiliza la exposición a la luz transcranealmente a 610 nm durante 20 minutos (Lee et al., 2016) o
- 6) Sonido: que utiliza la exposición a sonidos (500 ondas de impulso a 0.15 mJ/mm (Tobalem et al., 2013).

Todos estos modelos de preconditionamiento han demostrado que pueden mejorar la tolerancia y provocar la resistencia del tejido frente a diferentes tipos de daños, incluyendo la isquemia cerebral.

En el contexto del daño isquémico cerebral el preconditionamiento isquémico (IPC) es uno de los tipos de condicionamiento más estudiados (Dirnagl et al. 2009). En los modelos animales, este tipo de IPC que consiste en someter al tejido cerebral a una breve interrupción del flujo sanguíneo, antes de una lesión cerebral más grave, ha demostrado que promueve la resistencia del cerebro frente al daño posterior. Así, se ha comprobado en modelos animales, que el IPC puede reducir significativamente el tamaño de la lesión cerebral, al disminuir el volumen de infarto y mejorar la recuperación funcional después de la oclusión de la arteria cerebral media como modelo de daño isquémico (Liang et al., 2021; Vecino et al., 2018; Yang et al., 2016).

Todos los resultados obtenidos en estos modelos basados en el IPC podrían ayudar a conocer los mecanismos endógenos que se ponen en marcha en el cerebro, y que permiten protegerse así mismo, frente al daño isquémico. Así mismo, Estos hallazgos podrían resultar útiles en la identificación de biomarcadores y ayudaría en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el ictus (Dirnagl et al. 2003; Lai, Zhang, and Wang 2014; Silva de Carvalho et al. 2022).

3.3. Mecanismos de tolerancia isquémica cerebral

El IPC genera la interacción compleja entre múltiples vías de señalización y mecanismos moleculares, y que modulan a su vez, la respuesta de las células del cerebro frente al daño isquémico. En general, se ha puesto de manifiesto que el IPC puede inducir cambios funcionales y estructurales en el cerebro que

contribuyen a la protección cerebral, como la mejora de la función neurológica, la reducción del tamaño del infarto y la preservación de la integridad de la barrera hematoencefálica (Burda and Morochovič 2023; Lai et al. 2014).

Las vías de señalización implicadas en la protección asociada al IPC incluyen de forma destacada: 1) La activación subtóxica de los receptores celulares N-metil-D-aspartato (Dirnagl et al., 2009). La activación de los R-NMDA, en los astrocitos, desencadena una cascada de señalización que implican la vía Cdk5/Nrf2, estimulando la síntesis de glutatión reducido y promoviendo así la protección de las neuronas (Jimenez-Blasco et al., 2015); 2) La regulación de la expresión génica a través del incremento de los receptores de adenosina en el cerebro (Pugliese et al., 2003); 3) La modulación de la inflamación al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina-1 β (Simón et al., 2012) y la interleucina-6 (IL-6); 4) la reducción del estrés oxidativo, disminuyendo la generación de las ROS, es otro de los mecanismos que acompañan a la neuroprotección asociada al IPC (Simón et al., 2012).

A pesar del creciente interés en el IPC como una estrategia potencial para mitigar el daño isquémico cerebral, aún existen muchos desafíos y preguntas que deben abordarse en esta área de investigación.

Por lo tanto, el objetivo general de la Tesis Doctoral ha sido identificar nuevas vías de señalización involucradas en la tolerancia neuronal durante el IPC al mismo tiempo que estudiar los mecanismos moleculares y celulares subyacentes, así como los posibles efectos funcionales y estructurales de esta respuesta adaptativa.

3.4. Otras estrategias neuroprotectoras frente al daño isquémico

Existen numerosos estudios que abordan diferentes estrategias neuroprotectoras que intentan mitigar o inhibir algunas de las vías anteriormente expuestas y que participan en la cascada isquémica, como son: 1) los inhibidores o antagonistas de glutamato para evitar la excitotoxicidad, con resultados controvertidos (H. S. V. Chen & Lipton, 2006); 2) los bloqueantes de los canales de sodio y calcio, como la mexiletina (Hewitt et al., 2001); 3) los agonistas del neurotransmisor GABA (ácido gamma aminobutírico), como el clometiazol que contrarresta la despolarización y la cascada apoptótica asociada (Vaishnav & Lutsep, 2002); 4) los antioxidantes, como la superóxido dismutasa o la glutatión oxidasa (Rodríguez et al., 2021); 5) los antiinflamatorios supresores de la acción de IL6, NFκB o S100b entre otros (Colàs-Campàs et al., 2020).

Aunque existen resultados prometedores obtenidos en estudios preclínicos, en la aplicación clínica, la mayoría de estos ensayos neuroprotectores no han mostrado ser del todo eficaces. En parte, se cree que una de las razones se debe, precisamente al hecho de que cada una de ellas funciona generalmente frente a una única vía de la compleja cascada isquémica (Purroy, García, et al., 2020; Rodríguez et al., 2021).

4.LA ESTABILIDAD DE PROTEÍNAS DURANTE LA ISQUEMIA

Las proteínas dependen de su estructura y estabilidad para llevar a cabo funciones biológicas específicas. Por lo tanto, el control de la estabilidad de las proteínas es un proceso crítico que asegura que las proteínas mantengan una función adecuada y alteraciones en su conformación es promotora de múltiples enfermedades.

La isquemia puede afectar a la estabilidad de las proteínas neuronales, como hemos demostrado en el grupo de investigación previamente (Gomez-Sanchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2018; Sánchez-Morán et al., 2020) y como este control entre la degradación y síntesis de proteínas determinadas determina el pronóstico funcional de los pacientes que sufren ictus isquémico o hemorrágico (Gomez-Sanchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2018; Sánchez-Morán et al., 2020)

A su vez la falta o disminución de oxígeno y nutrientes que ocurre durante un episodio isquémico puede provocar:

4.1. El Estrés Oxidativo

Entre los procesos más importantes que ocurren durante la isquemia se encuentra el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *radical oxygen species*) y a la disminución de la capacidad antioxidante del organismo, lo que origina su desequilibrio y fomenta el estrés oxidativo (Kalogeris et al., 2012). Entre otros efectos, las ROS pueden dañar las proteínas al oxidar los residuos de aminoácidos, lo que puede alterar su estructura y función (Kalogeris et al., 2012; Lipton, 1999). En las neuronas, el tratamiento

con antioxidantes ha demostrado reducir la muerte celular por apoptosis inducida por el estrés oxidativo, como consecuencia de su efecto directo en la activación de las vías de supervivencia TrKB/Creb/BDNF y AKT/Nrf2 y en la inhibición de la actividad de las calpaínas (Yoo et al., 2017).

Además, de la reducción de las ROS, se ha sugerido, en el contexto de la lesión hepática inducida tras isquemia/reperfusión, que el IPC promueve la disminución de los factores de transcripción de genes de respuesta temprana como c-fos y c-jun, relacionados de forma inversa con la respuesta antioxidante (Xiao. JS et al, 2005).

El sistema antioxidante a su vez también es diana del IPC; así se ha identificado que el IPC aumenta la respuesta antioxidante en el cerebro y en órganos periféricos, a través de la movilización de ácido úrico en el organismo (Glantz et al., 2005) donde el IPC-remoto produce el aumento en la respuesta antioxidante, en riñón e hígado frente al daño de isquemia/reperfusión (Da SilvaCosta et al., 2015) y que este efecto, al menos en parte, se debe a que induce el aumento tiempo-dependiente en la expresión de la glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y la catalasa en cerebro de rata (Monteiro et al., 2021).

4.2. Modificación Postraducciona

Las proteínas a menudo experimentan modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, la glicosilación y la ubiquitinación, que pueden afectar su estabilidad y actividad (Kalogeris et al., 2012). La isquemia puede alterar estos procesos de modificación postraducciona, lo que puede tener un impacto en la estabilidad y función de las proteínas (Kalogeris et al., 2012; Lipton, 1999).

4.3. La estabilidad de proteínas durante el IPC

Los principales sistemas de control de la degradación y síntesis de proteínas se encuentran el sistema de ubiquitina-proteasoma, el sistema de autofagia-lisosoma, y las enzimas proteolíticas caspasas y calpaínas. En conjunto, estos sistemas de control son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis celular y el correcto funcionamiento de los organismos vivos.

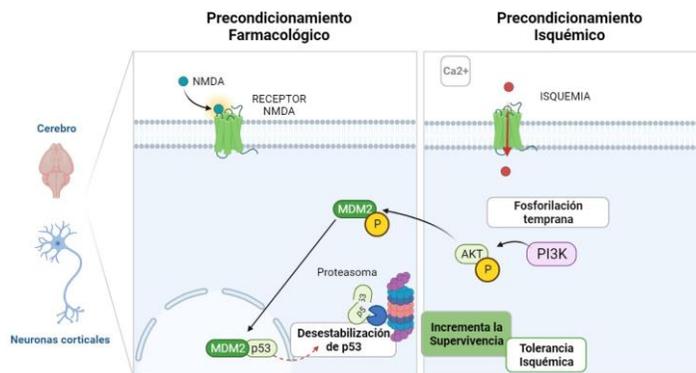
Existen estudios que demuestran la importante implicación que tiene el preconditionamiento isquémico en el control de la estabilidad de proteínas tanto en modelos animales como en cultivos celulares y frente al daño isquémico (Vecino R, 2018; Barrio et al. 2021; Goll et al. 2003; Sorimachi, Hata, and Ono 2011b).

El **sistema de ubiquitina-proteasoma** es el principal sistema de degradación de proteínas en las células eucariotas. Consiste en la adición de una cadena de ubiquitina a la proteína objetivo, lo que marca la proteína para su degradación vía proteasoma, una compleja estructura proteolítica. El sistema de etiquetado con ubiquitina involucra a más de 1000 ligasas de ubiquitina. Este sistema es esencial para la eliminación de proteínas dañadas o innecesarias y para el control de la cantidad de proteínas celulares (Hershko & Ciechanover, 1998).

El **sistema de autofagia-lisosoma** es otro importante mecanismo de control de la degradación de proteínas. En este sistema, las proteínas se marcan para su degradación en los lisosomas mediante la formación de una membrana de autofagia alrededor de la proteína. Una vez en el lisosoma, las proteínas se descomponen en sus componentes básicos, que pueden ser reutilizados por la célula (Levine & Kroemer, 2008; J. J. Weber et al., 2019a).

La proteólisis del **sistema de las caspasas** funciona principalmente para inducir la apoptosis. En cambio, el **sistema de las calpaínas** principalmente emplea procesamiento proteolítico, en lugar de la degradación, para modular o modificar la actividad, especificidad, longevidad, localización y estructura de sus sustratos (Goll et al., 2003; Mclaughlin et al., 2002; M. A. Smith & Schnellmann, 2012a; J. J. Weber et al., 2019a).

En estudios previos, se ha puesto de manifiesto que el control de la estabilidad de proteínas es fundamental no solo durante la respuesta a la isquemia (Gomez-Sanchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2018; Sánchez-Morán et al., 2020), sino también durante la tolerancia neuronal inducida por el preconditionamiento (Barrio et al., 2021; C. Liu et al., 2005; Sung et al., 2021; Vecino et al., 2018). De hecho, en nuestro grupo se ha identificado recientemente que, la proteína E3-ubiquitina ligasa, MDM2 (*murine doble minute 2*), principal regulador de la estabilidad de p53, tiene una importante función en la tolerancia isquémica asociada al IPC, tanto en un modelo de rata in vivo como en neuronas corticales de ratón (Barrio et al., 2021; Vecino et al., 2018) y que se resumen en el ESQUEMA 3.



ESQUEMA 3. Vías de señalización implicadas en la estabilidad de proteínas. La tolerancia isquémica inducida en un modelo de preconditionamiento isquémico (derecha) y farmacológico (izquierda) promovida mediante la activación de la vía PI3K/AKT, el aumento en la E3-ubiquitina ligasa MDM2 nuclear y la subsiguiente desestabilización de p53 e inactivación de la vía apoptótica Caspasa-3.

El IPC es capaz de promover la supervivencia de las neuronas frente al daño isquémica, a través de la inducción de la proteína E3-ubiquitina ligasa, MDM2, lo que desestabiliza p53 e inhibe la subsiguiente activación de la vía apoptótica Caspasa-3/PUMA (Vecino et al., 2018). Además, la activación rápida y transitoria de la vía de señalización PI3K/AKT por IPC, ha resultado ser una de las vías implicadas en la translocación nuclear de MDM2, aumentando la desestabilización de p53 durante el preconditionamiento (Barrio et al. 2021, Gutiérrez-Zúñiga et al. 2019; Kalogeris et al. 2012).

Estos estudios demuestran que el control de la estabilidad proteica es esencial en la TI neuronal. Por lo tanto, en la presente Tesis doctoral, pensamos que otro de los principales sistemas responsables del control de la estabilidad de las proteínas, el sistema de las calpaínas, podrían tener un papel fundamental en la TI neuronal.

5. EL SISTEMA DE LAS CALPAÍNAS

Las calpaínas son una familia de tiol-proteasas, ricas en cisteínas, no lisosomales dependientes de Ca^{2+} y ampliamente distribuidas en bacterias y células eucariotas. Estas enzimas tienen actividad proteolítica, similar a la de la papaína y dependiente del calcio a pH neutro. Su nombre deriva de estas dos características inicialmente identificadas: **CAL-**: actividad dependiente de calcio y **-PAINA**: actividad similar a la de la papaína.

Mayoritariamente su localización es citosólica, aunque también puede estar unida a las membranas celulares y más recientemente se ha descubierto su presencia en otros compartimentos subcelulares, como la mitocondria y el núcleo.

Al igual que los otros sistemas responsables de la homeostasis celular, como son el sistema ubiquitina-proteasoma, el sistema autofagia-lisosoma y las caspasas; el sistema de las calpaínas está estrictamente regulado. En líneas generales, podemos decir que los dos primeros actúan como sistemas de degradación y eliminación de los sustratos, mientras que las caspasas, proteolizan específicamente sus sustratos para inducir el proceso de la muerte por apoptosis y se activan por oligomerización dependiente de otras señales (J. J. Weber et al., 2019b).

Tradicionalmente a las calpaínas se les considera proteasas cuya actividad principal era la degradación de sus sustratos. En los últimos años, se han descubierto nuevas funciones mediadas por las calpaínas, de tal manera que han comenzado a ser consideradas como importantes moléculas moduladoras de la función proteica.

El procesamiento proteolítico que realizan las calpaínas se produce gracias al reconocimiento e interacción con la estructura conformacional de sus dianas moleculares, lo que promueve la modulación de la función de estas, de tal manera que puede llegar a afectar por ejemplo a las diferentes estructuras celulares.

Hasta la fecha, se sabe que las calpaínas tienen un papel importante en la modulación de la actividad proteolítica intracelular y en la regulación de diversas vías celulares, participando en una amplia diversidad de procesos fisiológicos, como lo son la diferenciación celular, la migración, la apoptosis, la senescencia y la remodelación de la matriz extracelular (Franco and Huttenlocher 2005; Goll et al. 2003; Smith and Schnellmann 2012).

No obstante, en determinadas situaciones fisiopatológicas, se ha relacionado la desregulación en la actividad de las calpaínas, con alteraciones en procesos tan diversos como son la apoptosis (Raynaud & Marcilhac, 2006); el

mantenimiento del citoesqueleto (Baitinger & CHENEY Trun, 1987; Nakajima et al., 2011; Siman et al., 1984; Sreeja et al., 2020a) y la inflamación entre otras (Miyazaki et al., 2020; Sorimachi et al., 2011a). Todos estos procesos, se han asociado con el desarrollo de numerosas enfermedades humanas, como son el cáncer (Storr et al., 2011), las enfermedades neurodegenerativas (Jin et al., 2015; Podbielska et al., 2016; Takeda et al., 1991; J. J. Weber et al., 2018), las cardiovasculares (Easton et al., 2009; M. A. Smith & Schnellmann, 2012a), las autoinmunitarias, los trastornos musculares (Aluja et al., 2019; de la Fuente et al., 2020; Miyazaki et al., 2020)

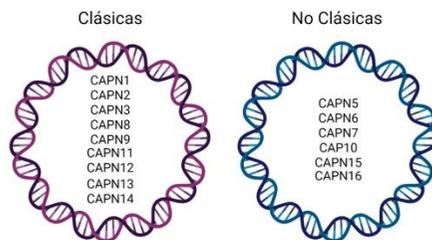
Por lo tanto, todo parece indicar que el control en la regulación de la actividad de las calpaínas resultaría esencial en el desarrollo de estrategias terapéuticas frente a una gran diversidad de enfermedades (M. A. Smith & Schnellmann, 2012a).

En la última década, se han realizado importantes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la actividad de las calpaínas. Estos estudios incluyen la identificación de sus inhibidores específicos, la caracterización de los complejos de su activación, los cambios de localización subcelular y los mecanismos de modulación postraduccional de su actividad. Además, se ha demostrado que las calpaínas pueden estar reguladas por diversos factores extracelulares, como las hormonas, los factores de crecimiento, las citocinas y los componentes de la matriz extracelular (Bano et al., 2010; Chu et al., n.d.; Goll et al., 2003).

En la Introducción de la presente Tesis Doctoral, se aborda la regulación de las calpaínas desde diferentes perspectivas. Tras describir la estructura y función de las calpaínas, mayoritarias en el cerebro, CAPN1 y CAPN2, se discutirán los diferentes mecanismos moleculares que se conocen y que están implicados en la regulación de la actividad de estas, incluyendo los inhibidores específicos,

los complejos de activación, los cambios de localización subcelular y los mecanismos de modulación postraduccional.

Están descritas 16 formas de calpaínas, codificadas por genes distintos y que se dividen en dos grupos, según se resume en el ESQUEMA 4: 1) las calpaínas clásicas (**CAPN1, CAPN2, CAPN3, CAPN8, CAPN9, CAPN11, CAPN12, CAPN13, CAPN14, CAPN16, CAPNS1/CAPNS2**) y 2) las calpaínas no clásicas (**CAPN4, CAPN5, CAPN6, CAPN7, CAPN10, CAPN15**), clasificación que se realizó según la estructura del dominio IV de las proteínas (Franco and Huttenlocher 2005; Sorimachi, Hata, and Ono 2011).



ESQUEMA 4. Clasificación de las calpaínas.

Algunas calpaínas, como la CAPN1 y la CAPN2, además de la 5, 7, 10, 12, 14 y 15, se expresan de forma ubicua, mientras que otras son tejido-específicas, la 6, 8, 9, 11 y 12 y la CAPN3 en el músculo (VER TABLA 1).

Gen	Proteína	Localización	Clasificación	Expresión
<i>capn 1</i>	CAPN1 subunidad catalítica	11q13	Clásica	Ubicua
<i>capn 2</i>	CAPN2 Subunidad catalítica	1q41-q42	Clásica	Ubicua (excepto eritrocitos)
<i>capn 3</i>	CAPN3	15q15.1- q21.1	Clásica	Músculo esquelético
<i>capn 5</i>	CAPN5	11q14	No clásica	Abundante en testículos y cerebro
<i>capn 6</i>	CAPN6	Xq23	No clásica	Músculo embrionario y placenta
<i>capn 7</i>	CAPN7	3p24	No clásica	Ubicua
<i>capn 8</i>	CAPN8	1q41	Clásica	Tracto Gastrointestinal
<i>capn 9</i>	CAPN9	1q42.11- q42.3	Clásica	Tracto Gastrointestinal
<i>capn 10</i>	CAPN10	2q37.3	No clásica	Ubicua
<i>capn 11</i>	CAPN11	6q12	Clásica	Testículo
<i>capn 12</i>	CAPN12	19q13.2	Clásica	Folículo piloso
<i>capn 13</i>	CAPN13	2p22-p21	Clásica	Ubicua
<i>capn 14</i>	CAPN14	2p23.1-p21	Clásica	Ubicua
<i>capn 15</i>	CAPN15	16p13.3	No clásica	Ubicua

capn 16	CAPN16	6q24.3	Clásica	Ubicua
capns1	Subunidad reguladora 1 (CSS1)	19q13	Clásica	Ubicua
capns2	Subunidad reguladora 2 (CSS2)	16q13	Clásica	Ubicua
cast	Calpastatina (Inhibidor endógeno)	5q15-21	-	Ubicua

TABLA 1. Los genes que codifican en humanos para las proteasas de la familia de las calpaínas, de las subunidades reguladoras y el correspondiente gen del inhibidor endógeno. Su localización en distintas regiones del genoma y su expresión en los tejidos.

5.1. Estructura de las calpaínas en el cerebro: CAPN1 y CAPN2

En la presente Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio de las dos formas de calpaínas, que se expresan mayoritariamente en el cerebro, la CAPN1 y la CAPN2.

Cabe destacar que existen diferencias entre ambas formas, una de las primeras diferencias entre CAPN1 y CAPN2 es que poseen diferente requerimiento en la concentración de calcio necesaria para su activación, motivo por el cual se han denominado de la siguiente forma, la μ -calpaína para referirse a la calpaína-1/CAPN1 y la m-calpaína para referirse a la calpaína-2/CAPN2. En general, se requiere una concentración de calcio en el rango de micromolar (μ M) para activar la CAPN1, en el rango de 10-50 μ M para alcanzar su máxima actividad, mientras que la CAPN2 requiere una concentración de calcio (mM),

en el rango de 50-200 μM para alcanzar su máxima actividad (Baudry, 2019; Spinozzi et al., 2021).

5.1.1. Estructura de la subunidad catalítica

Las calpaínas clásicas, entre las que se encuentran CAPN1 y CAPN2, están formadas por una estructura heterodimérica constituida por dos subunidades de distinto tamaño: la subunidad catalítica o grande (80 kDa) y la subunidad reguladora o pequeña (28 kDa), que se unen de forma no covalente (Hata et al. 2016). Ambas isoformas poseen una homología de secuencia de aminoácidos del 60 %, pero presentan similitud en la afinidad durante el reconocimiento de los sustratos y en la especificidad de corte proteolítico de los mismos (Goll et al. 2003; Smith and Schnellmann 2012).

La subunidad catalítica se compone principalmente de **4 dominios**:

El **dominio I** está ubicado en la parte amino terminal ($-\text{NH}_2$) de la proteína y no tiene homología de secuencia con ninguna otra proteína secuenciada hasta ahora. Sin embargo, se ha encontrado una homología de secuencia de este dominio, que oscila entre el 72-86 % entre diferentes especies (humanos, pollos, ratas, cerdos y conejos) (Goll et al., 2003).

El **dominio II** es una región de la proteína que contiene un residuo de cisteína y otros dos residuos importantes para la actividad catalítica de la enzima (histidina y asparagina), formando un **tripleto catalítico** típico de las proteasas de cisteína como la papaína o las catepsinas B, L o S. Aunque este dominio tiene poca similitud de secuencia con otras proteasas de cisteína, lo que sugiere que éste evolucionó a partir de un gen ancestral diferente. En la estructura cristalográfica de la m-calpaína, el residuo de cisteína activo se encuentra en el dominio IIa, mientras que los otros dos residuos del tripleto catalítico están en el dominio IIb. Se ha descubierto que cada uno de estos dominios IIa y IIb se une a un átomo de calcio a través de un bucle de péptido

de 8 (dominio IIa) o 9 (dominio IIb) aminoácidos. La secuencia de este dominio está muy conservada en las diferentes especies (85-93 %) (Goll et al. 2003).

El **dominio III** de la calpaína no comparte similitud de secuencia con ninguna otra proteína. Este dominio es el responsable de conectar los dominios de unión al Ca^{2+} con el dominio catalítico (dominio II). Además, está involucrado en la unión de fosfolípidos y en la regulación de la actividad de la calpaína mediante la participación en interacciones electrostáticas críticas (Gil-Parrado et al., 2003).

El análisis de las secuencias de aminoácidos revela que el dominio III también contiene dos secuencias potenciales de **unión al Ca^{2+} tipo EF-hand**. Una de estas secuencias se encuentra en el límite del dominio II/III, mientras que la otra se encuentra en el límite del dominio III/IV. La secuencia en el límite del dominio II/III no tiene una conformación EF-hand en la estructura cristalográfica de la m-calpaína de rata o humana, y esta región no parece unir Ca^{2+} en la m-calpaína de mamíferos. Sin embargo, en otras especies como es el parásito trematodo *Schistosoma mansoni* sí es capaz de unirse al Ca^{2+} .

El **dominio IV** es similar en su secuencia a la del dominio VI, con una homología a la calmodulina del 24-44 % y 51-54 % para μ -o m-calpaína. El dominio IV contiene cuatro secuencias que predicen sitios de unión a Ca^{2+} también denominados **EF-hand**. A diferencia de la asignación de dominios basada en la secuencia de aminoácidos, la estructura cristalográfica de la m-calpaína indica que el dominio IV de la m-calpaína humana comienza en el residuo de aminoácido 530 e incluye el EF-hand en los residuos 541-552. Por lo tanto, el dominio IV de la subunidad catalítica también tiene cinco secuencias de EF-hand, siendo el quinto, el EF-hand en posición carboxi-terminal (COOH-), el que está involucrado en la **dimerización de las subunidades** reguladora y catalítica.

En resumen, las seis secuencias de *EF-hand* en la subunidad catalítica se denominan EF-IIb, EF-1, EF-2, EF-3, EF-4 y EF-5 desde el extremo NH₂-terminal al extremo COOH-terminal de la subunidad de catalítica. Para este dominio IV el grado de homología de secuencia entre las especies es de 65-93 % (Goll et al., 2003; M. A. Smith & Schnellmann, 2012a).

Respecto a las diferencias funcionales, se ha demostrado que la CAPN1, pero no la CAPN2, tiene mayor afección por la mitocondria (Tait & Green, 2010). Además, se sabe que CAPN1, pero no CAPN2, se asocia a las subunidades NR2A de los R-NMDA del glutamato. De hecho, se ha sugerido que ambas isoformas podrían presentar funciones opuestas en el cerebro. Mientras CAPN1 sería necesaria para la plasticidad sináptica, aumentando la capacidad neuroprotectora en determinadas situaciones (Baudry, 2019). En contraposición, la CAPN2 limitaría la plasticidad y tendría consecuencias que promoverían la neurodegeneración (Baudry, 2019) .

Las vías de señalización reguladas por la CAPN1 y la CAPN2 siguen siendo, hoy en día, grandes desconocidas, siendo necesarias más investigaciones para identificarlas y comprender mejor las funciones del sistema de calpaínas en el cerebro, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas (Baudry, 2019).

5.1.2. Estructura de la subunidad reguladora

Tanto CAPN1, como CAPN2 comparten una subunidad reguladora de 28 KDa, denominada **CSS1** (también conocida clásicamente como CAPN4 o con el mismo nombre del gen CAPNS1). La subunidad CSS1 consta de dos dominios: el dominio N-terminal V, rico en glicina e hidrofóbico, y el dominio VI C-terminal, que es una región de unión al calcio que contiene cinco motivos *EF-hand*, similar al dominio IV de las subunidades catalíticas. El dominio VI,

situado en la región COOH-terminal de la subunidad pequeña (residuos 101-268), es similar a la calmodulina, ya que contiene cinco sitios de unión al calcio de tipo *EF-hand*. La cristalografía de rayos X de esta subunidad han revelado la presencia de un quinto sitio de unión al calcio, lo que identifica a las calpaínas como miembros de la familia de proteínas **penta-EF-hand** (Goll et al., 2003). Esta familia de proteínas entre las que se encuentran las calpaínas, forma dímeros que se asocian con membranas.

Recientemente, se ha descubierto una segunda subunidad reguladora, también de 28 KDa, denominada **CSS2** (o por el nombre del gen CAPNS2), que posee un 73 % de homología de secuencia con CSS1. Sin embargo, CSS2 se une a las CAPN1 y CAPN2 con menos afinidad que CSS1. Otra diferencia entre ambas subunidades reguladoras es su localización; la CSS1 se localiza en las dendritas mientras que CSS2 lo hace en los axones en cerebro de rata. Aunque se ha propuesto que CSS2 puede reemplazar funcionalmente a CSS1, esto parece poco probable ya que solo el Knockout de CSS1 es letal incluso en presencia de CSS2 (Bevers & Neumar, 2008a; Franco & Huttenlocher, 2005).

Los estudios han demostrado que la eliminación de la subunidad reguladora de las calpaínas afecta a 1) la estabilidad del heterodímero formado con la subunidad catalítica de la proteína, 2) a la activación y 3) a la interacción de CAPN1 y CAPN2 con las estructuras de membrana, como consecuencia de la pérdida del dominio hidrofóbico que le permite interactuar con los fosfolípidos (Franco & Huttenlocher, 2005; Goll et al., 2003; Spinozzi et al., 2021)

5.2. Mecanismos de activación de las calpaínas

Dado el amplio rango de dianas moleculares y vías de señalización celular en las que el sistema de las calpaínas realiza su función, es plausible que participe en una gran variedad de procesos fisiopatológicos. Sin embargo, se han

registrado pocas enfermedades genéticas relacionadas con esta proteína, ya que la mayoría de los trastornos, en los que está implicada, se originan como consecuencia de una alteración en la homeostasis del calcio, y por lo tanto cualquier desregulación en este ion puede generar cambios en la activación de la calpaína.

En circunstancias fisiológicas, la entrada de calcio al interior de la célula produce la activación de algunas moléculas de calpaína. Por el contrario, en una situación fisiopatológica, una entrada exacerbada de calcio ocasiona la hiperactivación de la calpaína, lo que provoca la activación de todas las moléculas de calpaína disponibles en la célula. Esto, a su vez, produce una proteólisis incontrolada de los sustratos de la calpaína, lo que conlleva a la muerte celular (C. Liu et al., 2005).

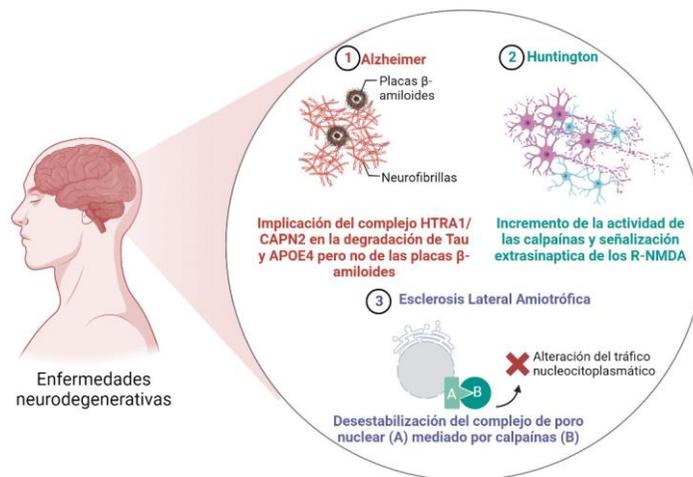
Existen estudios que han abordado la función de las calpaínas y su posible función en el control de las sinapsis cerebrales durante el daño isquémico (Curcio et al., 2016) pero en muchas ocasiones sin identificar la participación de una isoforma determinada de calpaína (Baudry, 2019; M. Chen et al., 2001; Hernando et al., 2010; M. A. Smith & Schnellmann, 2012b).

El aumento en la actividad de las calpaínas está asociado a la isquemia cerebral (Blomgren et al., 1995) y la isquemia miocárdica (Singh et al., 2004), y en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas: la enfermedad de Alzheimer (Jin et al., 2015; Su et al., 2020), la enfermedad de Huntington (Gladding et al., 2014; Incebacak Eltemur et al., 2022; J. J. Weber et al., 2018) y la enfermedad de Parkinson (Bever and Neumar 2008b; Jin et al. 2015; Su et al. 2020; Vosler, Brennan, and Chen 2008), o la esclerosis lateral amiotrófica (Shang et al., 2017; Wright & Vissel, 2016; Yamashita et al., 2017).

Aunque, existen pocos trabajos que abordan la función de las calpaínas durante el IPC, existen resultados en tejido el hepático, donde se ha

demostrado que el IPC promueve la protección del tejido a través de la inhibición de CAPN2 y restableciendo la función mitocondrial inducida por la isquemia/reperfusión (A. Liu et al., 2016).

A continuación, vamos a revisar algunas de las vías de señalización en las que se ha demostrado que la actividad de las calpaínas juega un importante papel en el desarrollo fisiopatológico cerebral, durante el desarrollo de la neurodegeneración, como la enfermedad de Alzheimer, la de Huntington (Gladding et al. 2014; Incebacak Eltemur et al. 2022; Weber et al. 2018), y o la esclerosis lateral amiotrófica de la Fuente et al. 2020; Wright and Vissel 2016) y que se resume en el ESQUEMA 5.



ESQUEMA 5. Implicación de las calpaínas en las enfermedades neurodegenerativas: 1) Alzheimer; 2) Huntington; 3) Esclerosis lateral amiotrófica.

En modelos de la enfermedad de Alzheimer, se ha descrito que equilibrio entre las cinasas y las fosfatasa en la regulación de la fosfoproteína Tau es necesaria para mantener la homeostasis celular y evitar la neurotoxicidad (Jin et al., 2015). Así, se ha demostrado que el aumento en los niveles de p25 como consecuencia de la conversión de p35 mediado por la calpaína, lleva a la formación del complejo Cdk5/p25, lo que promueve una activación de la

kinasa, lo que induce la hiperfosforilación de Tau (Jin et al., 2015). Además, se ha identificado que el óxido nítrico endotelial (NOSe) suprime la actividad de la calpaína, reduciendo la formación del complejo Cdk5/p25, reduciendo la fosforilación de Tau y su neurotoxicidad (Iadecola, 2016). Sin embargo, el papel de la calpaína y el impacto en la reducción de Tau hiperfosforilada sobre en el plegamiento, la agregación y la función sináptica de Tau aún no están claros. Por otro lado, se sugiere que la disfunción endotelial y el péptido A β podrían promover la fosforilación de la Tau y, posiblemente, sus defectos en el plegamiento, en la agregación y por ende aumentando la neurotoxicidad (Iadecola, 2016).

Todo parece indicar que las proteasas clásicas CAPN1 y CAPN2, se sintetizan como precursores inactivos, que se procesan proteolíticamente resultando en una activación irreversible. Sin embargo, recientemente se ha propuesto un mecanismo de activación alternativo y reversible, que se realiza con la forma inactiva de la proteasa CAPN2 (Rey et al., 2022). Este mecanismo, implica la formación del complejo hetero-oligomérico entre la serina proteasa HTRA1 y la cisteína proteasa CAPN2 (Rey et al., 2022). La HTAR1 es la única proteasa conocida capaz de degradar Tau y APOE4 (Poepsel et al., 2015).

Las alteraciones de la serina proteasa HTRA1, están implicadas en enfermedades oculares relacionadas con la edad como son la enfermedad cerebral isquémica familiar de pequeños vasos, la artritis y en cáncer (Zurawa-Janicka et al., 2017). La familia HTRA se caracteriza por tener estructura homooligomérica y dominios PDZ en el COO- terminal. Los dominios PDZ están implicados en la detección de proteínas mal plegadas, activación alostérica, procesamiento de sustratos y disociación de las fibrillas de amiloide (Clausen et al., 2011). La formación del complejo CAPN2/HTRA1, activa HTRA1 y produce la proteólisis de la proteína tau soluble, de forma más eficiente, pero no la disociación y la degradación de las fibrillas de amiloide. Este mecanismo

propone una posible función en el control de calidad de proteínas de proteasas en la eliminación de fibrillas citotóxicas (Rey et al., 2022).

En estudios sobre la Esclerosis Lateral Amiotrófica, se ha demostrado que las calpaínas pueden fragmentar algunos componentes proteicos del poro nuclear de las motoneuronas, lo que contribuye a la desorganización estructural de la envuelta nuclear (de la Fuente et al., 2020; Wright & Vissel, 2016). Estas alteraciones llevan a la deslocalización citoplasmática de ciertas nucleoporinas, como NUP62, NUP88 y NUP153, formando gránulos irregulares, lo que resulta en una disfunción en el transporte nucleocitoplasmático (Shang et al. 2017). Este transporte se realiza a través de los complejos de poro nuclear, estructuras complejas compuestas de alrededor de 30 proteínas diferentes que permiten el transporte bidireccional de más de un millón de macromoléculas por minuto entre el núcleo y el citoplasma en células eucariotas. Las proteínas que se importan al núcleo portan una señal de localización nuclear (NLS) y se acoplan con una de las proteínas solubles llamadas importinas, mientras que la familia de proteínas llamadas Ran regula la interacción del complejo con el NPC y su translocación a través de él. Por lo tanto, la desorganización de los componentes proteicos del poro nuclear puede tener graves consecuencias en el transporte y la distribución de moléculas importantes en la célula (Mosammaparast & Pemberton, 2004; Yamashita et al., 2017).

5.3. Principales funciones celulares de las calpaínas

El sistema de las calpaínas es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular y la adaptación fisiológica en diferentes tejidos y sistemas biológicos (Perrin & Huttenlocher, 2002). En el cerebro, el sistema de las

calpaínas tiene múltiples funciones, incluyendo la formación de las sinapsis y la plasticidad sináptica cerebral (Briz & Baudry, 2017), la apoptosis (Momeni, 2006), la migración (Franco and Huttenlocher 2005), la liberación de citoquinas en la respuesta inflamatoria (Colàs-Campàs et al. 2020; Miyazaki et al. 2020) o incluso en el tráfico nucleocitoplasmático de otras proteínas (Shang et al. 2017).

Existen estudios que revelan que CAPN1 y CAPN2 poseen funciones opuestas en el cerebro, es decir, la actividad de CAPN1 parece ser que sería necesaria durante la plasticidad sináptica, con funciones en el aprendizaje y la memoria; o incluso en determinados procesos neuroprotectores durante el desarrollo postnatal y en el adulto. Por el contrario, la actividad de CAPN2 limitaría la plasticidad sináptica y el aprendizaje y estaría implicada en la neurodegeneración (Baudry and Bi 2016).

Todo parece indicar que las funciones de CAPN1 y CAPN2, se regulan principalmente por 1) la activación y localización espacial de las diferentes isoformas de calpaína, 2) la interacción con cofactores y sustratos específicos y 3) por mecanismos de inhibición endógena, que implican a la calpastatina (CAST).

Además, otra diferencia ya indicada y que implica el requerimiento tan alto de calcio para la activación de la CAPN2, hace más probable que cuando la proteína se localice en el citosol se active mayoritariamente en condiciones fisiopatológicas y no tanto fisiológicas.

Tanto CAPN1 como CAPN2 han demostrado en los estudios in vitro, tener la capacidad de reconocer y proteolizar los mismos sustratos. Los modelos animales y en contrato los modelos de ratones transgénicos que carecen de una u otra isoforma, sugieren que podrían tener funciones fisiológicas distintas. El ratón transgénico carente en la subunidad catalítica de la isoforma CAPN1 es viable, pero presenta problemas como son la disfunción de las

plaquetas, mientras que no presenta problemas en otras funciones, como son la potenciación a largo plazo (LTP), proceso fisiológico implicado en los procesos del aprendizaje y la memoria. Por el contrario, la ausencia de la subunidad catalítica de la isoforma CAPN2 es letal en el ratón transgénico, y lo mismo ocurre en el ratón en ausencia de la subunidad reguladora. En estas dos situaciones, los embriones mueren alrededor del undécimo día de gestación. Otros estudios, han demostrado diferencias en las funciones fisiológicas de cada una de ellas donde: 1) CAPN1 puede estar implicada en procesos de expansión celular a través de la proteólisis de RhoA, generando así un fragmento dominante-negativo inhibidor de la expansión celular (Franco & Huttenlocher, 2005); 2) CAPN2 está implicado en la proteólisis de talin 1 que se encarga de la regulación de la adhesión (Costa et al., 2023; Franco & Huttenlocher, 2005).

A continuación, se explican algunas de las importantes vías de señalización celular, que han sido identificadas como dianas del sistema de las calpaínas, entre ellas, el ciclo celular, la potenciación a largo plazo, la apoptosis y la autofagia.

5.3.1. Regulación del ciclo celular

La evidencia destaca que el sistema de las calpaínas interviene en la regulación del ciclo celular, participando en los procesos fisiológicos que incluyen el crecimiento y la proliferación en una gran diversidad de tipos celulares (Goll et al., 2003), aunque se desconoce su función en los procesos de proliferación y diferenciación de las células nerviosas.

Alteraciones en la expresión y/o actividad de las calpaínas parecen ser esenciales en la proliferación de células tumorales, la migración, la invasión y la angiogénesis lo que contribuye al desarrollo de la transformación tumoral (Ackermann & Brieger, 2019; Storr et al., 2011; Xu & Deng, 2006a, 2006b) o

como moduladores de los procesos angiogénicos generales de las células endoteliales (Y. Zhang et al. 2017).

Todo ello es debido a que estas enzimas degradan proteínas reguladoras del ciclo celular y que su inhibición provoca una desaceleración en el avance de la fase G1 en algunos modelos celulares. Así, la sobreexpresión de CAPN2 ha demostrado promover la metástasis y la proliferación, a través de la vía AKT/mTOR en carcinoma renal (Miao C et al, 2017).

No obstante, modelos experimentales en animales *knockout*, han demostrado que la ausencia de calpaínas, al menos CAPN1, no es imprescindible para la mitosis, aunque sí afecta el ritmo de proliferación celular. Por el contrario, el ratón *knockout* transgénico de CAPN2 resulta letal desde la edad embrionaria, lo que demuestra su posible función esencial durante el desarrollo (Dutt et al., 2006).

5.3.2. Potenciación a largo plazo

En neuronas, la proteólisis mediada por calpaínas, específicamente CAPN1 resulta esencial para la reorganización de la densidad postsináptica, característica de la potenciación a largo plazo (LTP) (Yi, Waxman, and Lynch 2004) en el establecimiento de la memoria y el aprendizaje. En condiciones fisiológicas, se ha demostrado que la degradación por parte de CAPN1, de proteínas de citoesqueleto como es la fodrina, las subunidades NR2 del R-NMDA de glutamato o la proteína PSD-95 en el axón terminal es un proceso fundamental para dicha reestructuración del LTP (Goll et al., 2003).

5.3.3. Regulación de la vía apoptótica

En algunos tipos celulares, las calpaínas pueden inducir las vías de señalización apoptóticas, cuando se someten a ciertos estímulos proapoptóticos (Goll et

al., 2003). Las vías involucradas en la participación de las calpaínas durante la muerte celular por apoptosis incluyen: 1) la inactivación de la caspasa 9 mediante proteólisis; 2) la activación de las procaspasas 7 y 12; 3) la inhibición de la molécula antiapoptótica Bcl-xL; 4) la proteólisis y activación de proteínas proapoptóticas como Bax, Bid y AIF; 5) la proteólisis catalizada de Atg5, cuyo producto es proapoptótico y 6) la translocación al núcleo y degradación de CAMKIV, con efecto proapoptótico (M. Chen et al., 2001; Goll et al., 2003; Raynaud & Marcilhac, 2006; Yousefi et al., 2006).

5.3.4. Implicación en la autofagia

Existe controversia respecto a la función de las calpaínas en el proceso de autofagia. Un estudio sugiere que la subunidad reguladora de las calpaínas clásicas es necesaria para la inducción de la autofagia en respuesta a diferentes estímulos, y que su inhibición favorece la apoptosis (Demarchi et al., 2006). Sin embargo, otros trabajos demuestran que la inhibición simultánea de las caspasas y de las calpaínas, en una línea celular de fibroblastos, induce la muerte celular mediada por autofagia (Madden et al., 2007). No obstante, trabajos recientes han puesto de manifiesto que la respuesta de autofagia adaptativa implica a las calpaínas, demostrándose que, en neuronas corticales sometidas a isquemia y reintroducción de glucosa, estas son vulnerables a la actividad de las calpaínas (Gerónimo-Olvera et al., 2017).

5.4. Regulación del sistema de las calpaínas

La regulación temporal y espacial de la actividad de las calpaínas es compleja. Estas proteasas están presentes mayoritariamente en el citoplasma celular, y son capaces de escindir proteínas estructurales y de señalización intracelular como hemos revisado anteriormente en el apartado 5.3 de la Introducción.

Se han descrito múltiples mecanismos implicados en la regulación de la función de las calpaínas, como son: 1) la presencia de calcio; 2) la autólisis; 3) la translocación a la membrana; 4) la presencia del inhibidor endógeno, la calpastatina (CAST) y 5) la existencia de modificaciones postraduccionales como la fosforilación de diferentes residuos (Goll et al., 2003).

5.4.1. Regulación por Calcio y formación de heterodímeros

La entrada de calcio y su aumento intracelular provoca cambios conformacionales en la subunidad grande de 80 KDa de las calpaínas, al inducir un reordenamiento estructural de la proteína que produce el alineamiento del centro catalítico de la proteína, lo que activa la proteasa.

Según los estudios cristalográficos relacionados con la estructura de la m-calpaína, este proceso de activación parece ocurrir en dos fases: En una primera fase, el calcio se une a los dominios IV y VI, provocando el acercamiento de estos dominios hacia el núcleo catalítico y la interacción de los dominios IIa y III, que estabilizan el núcleo de la enzima. En una segunda fase, el calcio se une a los lugares de unión en el dominio II, alineando los dos subdominios y formando el centro catalítico.

En la primera fase el cambio conformacional es mayoritariamente reversible y la disociación parcial conduce a la formación de agregados de heterodímeros y de grandes subunidades disociadas. Los homodímeros de subunidades pequeñas pierden su capacidad de asociación y los agregados más grandes formados a su vez por subunidades grandes, se formarán irreversiblemente.

En el caso de que la calpaína se active, también se ha comprobado que la agregación ocurre como consecuencia de la presencia de Ca^{2+} , al mismo

tiempo que se inicia la autólisis para degradar las subunidades grandes a fragmentos inactivos (Pal et al., 2001).

El requerimiento en las concentraciones de Ca^{2+} como ya hemos mencionado, difiere entre la m-calpaína y la μ -calpaína, y se ha demostrado que estas diferencias se deben a regiones de la proteína completa que carecen de determinados sitios de unión a calcio.

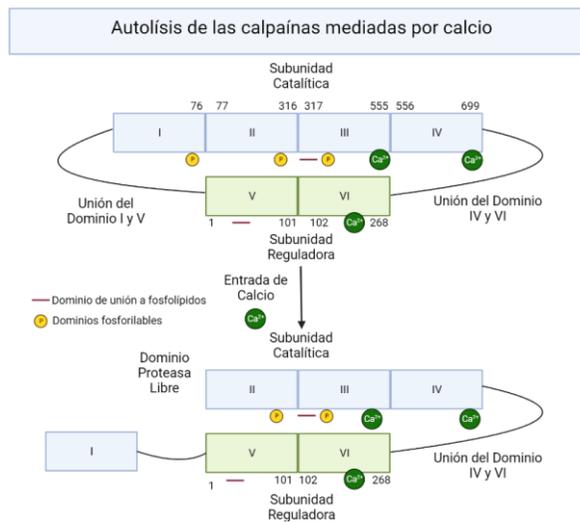
Por otro lado, la disociación entre ambas subunidades, catalítica y reguladora y, por lo tanto, la ruptura del heterodímero se ha propuesto como parte del proceso de activación de la proteasa y sobre todo de la pérdida de su estabilidad. Así, se ha observado que la disociación de ambas subunidades disminuye tanto la actividad, como la estabilidad y por ende afecta a la afinidad por los sustratos (Franco & Huttenlocher, 2005; Incebacak Eltemur et al., 2022).

5.4.2. Autólisis de las calpaínas

La autólisis del extremo amino terminal de las calpaínas es un fenómeno que ocurre en presencia de altas concentraciones de calcio (ESQUEMA 6). Sin embargo, su papel en el proceso de activación de las proteasas aún no está claro. Parece que, en estas situaciones de acumulación de calcio intracelular, la autólisis ocurre rápidamente tanto en la subunidad grande (dominio I) como en la pequeña (dominio V) (Franco & Huttenlocher, 2005). En estudios realizados sobre la cinética de la enzima, se ha descubierto que la autólisis precede a la activación, sugiriendo que las calpaínas son proenzimas y que la autólisis es un paso del proceso de activación. Sin embargo, las concentraciones de calcio necesarias para inducir esta proteólisis son similares a las requeridas para la activación (50-150 μM para la μ -calpaína y 550-800 μM para la m-calpaína). Además, hasta el momento los resultados muestran que

el proceso de autólisis reduce la estabilidad de la proteína y se ha detectado actividad proteolítica en calpaínas no autolisadas (Spinozzi et al., 2021).

Los resultados en células o tejidos que muestran actividad proteolítica de las calpaínas no permiten afirmar o negar la existencia de autólisis, por lo que el papel de la autólisis en la activación de las calpaínas continúa siendo objeto de controversia (Baudry, 2019; Goll et al., 2003)



ESQUEMA 6. Autólisis de las calpaínas mediada por Calcio.

5.4.3. Translocación a la membrana. Localización subcelular

A pesar de haberse descrito en numerosas ocasiones que la actividad de las calpaínas ocurre en la membrana celular y que muchos de sus sustratos son proteínas de membrana o asociadas a ésta (Goll et al., 2003), algunos estudios sugieren que las calpaínas son liberadas y actúan específicamente en el citosol (Inomata et al., 1989; Youn et al., 2009).

5.4.3.1. Traslocación a la membrana plasmática

La translocación de las calpaínas a la membrana se ha constatado en numerosas situaciones y modelos experimentales, aunque existen discrepancias en las condiciones de activación de las calpaínas en la membrana, en lo que respecta a la presencia de autólisis y a la concentración de calcio necesaria para su translocación. Por ejemplo, en los eritrocitos se ha observado que un aumento en la concentración de calcio incrementa la cantidad de calpaína asociada a la membrana (Inomata et al., 1989), pero en otros modelos celulares, como los fibroblastos, se han cuestionado estos mecanismos, ya que en estos casos se ha observado que la translocación es mediada por cambios en los niveles de fosforilación (Shao et al., 2006). A su vez, en las neuronas corticales, se ha observado que la μ -calpaína está mayoritariamente presente en la membrana, sin observarse translocación ni autólisis en su activación (Hewitt et al., 1998).

En conclusión, no está claro cómo se produce la interacción de las calpaínas con las membranas, ya que no existe un consenso en la identificación de las moléculas con las que interaccionan (Bever & Neumar, 2008a; Spinozzi et al., 2021). No obstante, diversos estudios han demostrado que las calpaínas tienen la capacidad de unirse a fosfolípidos, tales como PI y PIP₂, lo que permite reducir los requerimientos de calcio para la autólisis in vitro a elevadas concentraciones (Fernández-Montalván et al., 2006; Goll et al., 2003; Shao et al., 2006). Asimismo, se ha encontrado que estas proteínas tienen la habilidad de unirse a proteínas específicas, como fodrina en neuronas corticales, subunidad NR2 de receptores NMDA, Bid entre otros (Chang et al., 2015; Inomata et al., 1989; Shulga & Pastorino, 2006; Siman et al., 1984; Yi et al., 2004).

La existencia de estudios que relacionan a las calpaínas con balsas lipídicas, es decir, áreas de la membrana plasmática con una composición lipídica particular, como la presencia elevada de PIP₂, y con funciones y proteínas específicas que las realizan, podría explicar las discrepancias en los resultados obtenidos sobre las moléculas que median la translocación de las calpaínas a la membrana (Goudenege et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que las regiones proteicas involucradas en la interacción con la membrana parecen ser el dominio III (Shao et al., 2006) y/o el dominio V (Fernández-Montalván et al., 2006). La translocación de las calpaínas podría tener diversos objetivos, como reducir los niveles de calcio necesarios para su activación mediante la interacción con proteínas y/o lípidos de membrana, mantenerlas alejadas de su inhibidor endógeno, la CAST (Molinari & Carafoli, 1997), dirigir las a regiones celulares con altas concentraciones de calcio (Hood et al., 2006) o permitir su contacto con sustratos de membrana específicos (Zalewska et al., 2004). Sin embargo, aún no se ha determinado con certeza el sitio exacto donde las calpaínas translocadas llevan a cabo su actividad proteolítica (Molinari et al., 1994; Youn et al., 2009).

5.4.3.2. Localización nuclear y mitocondrial

A pesar de las restricciones pasadas en cuanto a la localización subcelular de las calpaínas, actualmente se ha demostrado que CAPN1 y CAPN2 pueden actuar en otros compartimentos celulares. Así, a CAPN1 se le ha implicado en la liberación del factor intramitocondrial inductor de apoptosis (AIF), induciendo la muerte neuronal tras la isquemia cerebral (Cao et al., 2007), y han sido incluidas como dianas moleculares de la neuroprotección (Perez-Pinzon et al., 2012).

Existen estudios, realizados en cardiomiocitos de rata, que describen la translocación nuclear de las calpaínas, en concreto de CAPN2, tras la

exposición al isoproterenol (ISO) acompañado de un aumento en la actividad de las NADPH oxidasas (NOXs) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Junto a la translocación nuclear de CAPN2, se observa la degradación de CaMK II δ B y la disminución de la expresión de ARNm de Bcl-2, lo que aumenta la relación BAX/Bcl-2 y finalmente se induce la apoptosis de las células. En este estudio, se demostró que la inhibición de la CAPN2 redujo significativamente la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c, así como la activación de las caspasas-3 y 9 en la vía apoptótica mitocondrial. Por lo tanto, los resultados sugieren que la translocación nuclear de la CAPN2 inducida por ROS facilita la apoptosis de los cardiomiocitos a través de la vía mitocondrial (Chang et al., 2015).

5.4.4. Inhibidor endógeno de calpaínas: La Calpastatina

La calpastatina (CAST) fue la primera proteína identificada como moduladora de la actividad de las calpaínas, y actúa como su inhibidor endógeno natural. Se trata de una proteína monomérica codificada por un solo gen, pero debido a la presencia de diferentes promotores y *splicing* alternativos, se han identificado hasta 4 isoformas que se diferencian en el extremo amino-terminal (Parr et al., 2004; Takano et al., 2000)

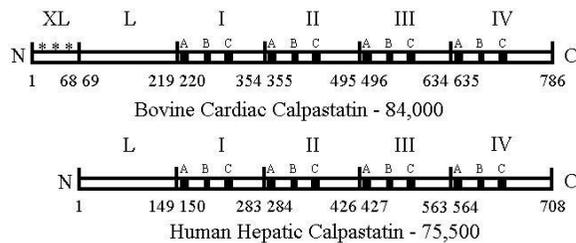
La expresión de la CAST es constitutiva y se encuentra presente en todos los tipos celulares, aunque su isoforma varía dependiendo del tejido e incluso de la especie (Goll et al., 2003). Y es capaz de inhibir con similar especificidad a CAPN1 y a CAPN2, sin afectar a ninguna otra proteasa (Perez-Pinzon et al., 2012).

El complejo CAST/CAPN es esencial para la supervivencia embrionaria dependiente de la integridad placentaria (Takano et al., 2011).

Se han detectado niveles bajos de CAST en las dendritas de pacientes con Alzheimer, asociada con la activación de calpaínas e hiperfosforilación de Tau, lo que promueve la neurodegeneración. Por el contrario, la sobreexpresión de CAST en células de hipocampo, ha demostrado ser neuroprotectora (Rao et al., 2008).

5.4.4.1. Estructura de la calpastatina

En el ESQUEMA 7, se describe la estructura de la CAST hepática humana y la cardíaca bovina, que contienen cuatro dominios inhibidores similares entre sí, y dos dominios amino terminales conocidos como L y XL, respectivamente. En cuanto a su expresión puede variar en diferentes tejidos y especies, existiendo situaciones en los que está ausente algunos de estos dominios.



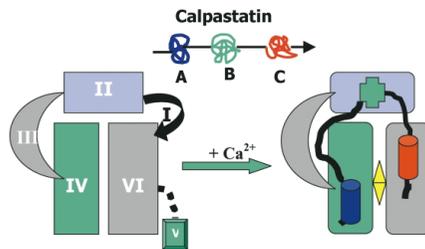
ESQUEMA 7. Estructura de la calpastatina de tejido cardíaco bovina (con la presencia del dominio XL) y la correspondiente CAST de tejido hepático humano, (sin presencia del dominio XL en este caso).

Los dominios inhibidores de la CAST se dividen en tres regiones (A, B y C) que tienen la capacidad de unirse a la proteasa y, por lo tanto, de inhibirla. Así, se ha demostrado, que una sola molécula de CAST es capaz de inhibir simultáneamente cuatro moléculas de calpaína, lo que indica su eficacia como inhibidor natural de esta proteasa (Goll et al., 2003; Hanna et al., 2008).

5.4.4.2. Modelos de inhibición mediados por la calpastatina

La CAST se une de forma reversible a la proteasa de forma calcio-dependiente, y en el caso de CAPN2, esta unión solo ocurre cuando esta proteasa está en su conformación activa, permitiendo que las regiones A y C de la CAST se unan a los dominios IV y VI de la CAPN2. En el ESQUEMA 8 se representa el modelo de inhibición propuesto en (Todd et al., 2003).

Recientemente, otros modelos han postulado que la región B de la CAST forma un bucle sobre el sitio activo de la proteasa, lo que impide la unión del sustrato, lo que lo protege de la actividad proteolítica de la proteasa. No obstante, se ha demostrado que la CAST y la calpaína también pueden interactuar a concentraciones bajas de calcio y que este tipo de unión depende del dominio L de la CAST, proceso que parece estar mediado por cambios en la fosforilación de la CAST mediados por la proteína quinasa C (De Tullio et al., 2014; Melloni et al., 2006).



ESQUEMA 8. Representación del modelo de inhibición de la calpaína por la calpastatina. Las regiones A y C de la calpastatina, se muestran unidas a los dominios DIV y DVI, respectivamente, como cilindros de color azul y rojo. La región B se representa en verde y se muestra en bucle hacia arriba y se unen al DI (Todd et al., 2003).

La capacidad de la CAST de unirse a la calpaína durante su activación plantea dudas, ya que se desconocen los mecanismos que regulan este proceso.

Se ha propuesto que la translocación de la calpaína a la membrana es un mecanismo que permite que ésta quede fuera del alcance de la CAST (Molinari

& Carafoli, 1997). El hecho de que el calcio juega un papel esencial, tanto en la activación de la calpaína, como en su translocación a la membrana y en su interacción con la CAST y de que la propia CAST puede actuar como un sustrato de la actividad catalítica de las calpaínas se sugiere que deben existir otros factores que deben estar contribuyendo al funcionamiento de este sistema. Por lo tanto, se requiere una mayor comprensión de la dinámica de interacción entre estas proteínas para elucidar completamente su papel en la regulación de la actividad proteolítica de las calpaínas.

Un asunto destacable es que la evidencia muestra que la CAST inhibe la actividad de las calpaínas, en condiciones de baja concentración de calcio, mientras que, a concentraciones altas y prolongadas, la CAST pasa a ser sustrato de las calpaínas. De esta forma se produce una escisión del CAST, lo que promueve una pérdida en la función biológica de su efecto inhibitorio sobre la calpaína, pero una ganancia de la actividad proteolítica de la calpaína. Así, se ha demostrado que la unión de estos fragmentos proteolizados de CAST no solo carecen de poder inhibitorio, sino que, además, bloquearían los residuos específicos de interacción CAST-Calpaína, impidiendo la interacción con moléculas intactas y no proteolizadas de CAST con posible capacidad inhibitoria (De Tullio et al., 2000) lo que potenciaría aún más la actividad de la calpaína.

Los estudios de cristalografía indican que la CAST previene la agregación de la calpaína, permitiendo la formación de los complejos CAST/CAPN (Pal et al., 2001).

Se ha postulado un modelo de regulación de la disponibilidad de CAST en el citosol, controlado por mecanismos de fosforilación/desfosforilación. Los estudios describen que la fosforilación de la CAST promueve su estado agregado cercano al núcleo. Específicamente, ha sido descrita que la fosforilación mediada por la proteína kinasa A la devuelve a su estado

agregado (De Tullio et al., 2014). Sin embargo, la elevación en la concentración de calcio intracelular induce la desfosforilación de CAST, favoreciendo su estado soluble y su accesibilidad para interactuar con la calpaína.

No obstante, este modelo de fosforilación/desfosforilación y estado agregado/soluble de CAST, no explicaría las situaciones en las que la CAST está unida a la calpaína incluso en condiciones basales de calcio. En este sentido, existe un estudio que muestra que la activación de la caspasa 8 puede interrumpir la unión entre la m-calpaína y la CAST, permitiendo la activación de la proteasa. Si esto es así, durante la interacción CAST/calpaína podrían estar implicadas otras proteínas, lo que complicaría el modelo, pero al mismo tiempo ayudaría a entender la función dual y contrapuesta de la CAST, como modulador (activador o inhibidor) de la actividad de las calpaínas (De Tullio et al., 2014; Goll et al., 2003)

5.4.5. Otros inhibidores y activadores de la función de las calpaínas

Dado el evidente aumento observado en la actividad de las calpaínas durante el desarrollo de numerosos procesos fisiopatológicos, resulta atractiva la estrategia terapéutica basada en la inhibición de las calpaínas.

Los inhibidores sintéticos que se han descrito en la bibliografía son compuestos como los epóxidos, aldehídos, acilfosforanos, compuestos 1-2 dicarbonílicos entre otros, y compuestos relacionados. La alta reactividad de estos inhibidores los hace poco selectivos, pudiendo inhibir a otras proteasas diferentes a las calpaínas.

Muchos inhibidores son derivados peptídicos con aminoácidos hidrófobos y anillos aromáticos (Chatterjee et al., 1998; Tao et al., 1998; Wells et al., 2001) (Chicharro et al., 2008). Por ejemplo, existe una endopeptidasa neutra

activada por calcio donde los anillos aromáticos de la cadena lateral son capaces de interactuar con Ca^{2+} y con otras entidades químicas (por ejemplo, otros fragmentos aromáticos). Además, existen otros inhibidores híbridos formados por: 1) péptido-bifenilo que inhiben la calpaína I (Chatterjee et al., 1998); 2) péptido-heterociclo donde la actividad/selectividad podría modularse por la secuencia de aminoácidos (cadenas cortas, aminoácidos hidrófobos de las dos series enantioméricas (Leung et al., 2000).

El compuesto orgánico ALLN (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO) inhibidor de calpaína I ($K_i=190$ nM), Calpaína II ($K_i=220$ nM), aunque también inhiben la catepsina B ($K_i=150$ nM) y L ($K_i=500$ pM), ha demostrado disminuir la proteólisis mediada por calpaínas, de la proteína marcadora de autofagia, Beclin-1 en células de hipocampo HT22 tratadas con H_2O_2 (Nguyen et al., 2019).

Otros como el polybrominated diphenyl ether-153, inhibidor de CAPN2, evita la formación del complejo Cdk5/p25, lo que previene la muerte por apoptosis en células de hipocampo de rata frente a la presencia de estímulos tóxicos ambientales, como son los éteres de difenilo polibromados (H. Zhang et al., 2017).

Los activadores de las calpaínas han sido identificados ser específicos para la CAPN1 (Melloni et al., 1998) o CAPN2 (Melloni et al., 2000) y son capaces de reducir los requerimientos de calcio para su activación, al mismo tiempo que facilitan su autólisis (Salamino et al., 1993). No obstante, su precisa función en la regulación de estas calpaínas ha sido muy poco estudiada.

5.4.6. Mecanismos postraduccionales

5.4.6.1. Fosforilación

Uno de los mecanismos que regulan la actividad de las calpaínas es la fosforilación. Esta modificación postraducciona, ha sido detectada en residuos

específicos de serina, treonina y tirosina en las calpaínas ubicuas mediante diversas técnicas, como son la inmunodetección con anticuerpos y espectrometría de masas MALDI-TOF, así como la captación de ³²P (Glading et al., 2004; Goll et al., 2003; Shiraha et al., 2002; Xu & Deng, 2006b). Sin embargo, el papel de estas modificaciones en la estructura o actividad catalítica de las calpaínas no está del todo claro.

Estudios previos han identificado hasta nueve residuos distintos fosforilados en la CAPN1 y ocho en la CAPN2, pero no todas las moléculas presentaban los mismos residuos fosforilados (Goll et al., 2003). Estudios más recientes han demostrado que la fosforilación in vivo e in vitro de las calpaínas modifica su actividad proteolítica, tal y como la que se ha identificado en el caso de la fosforilación descrita en Ser50 y otra en Ser369 y/o Thr370, siendo activadoras o inhibidoras de la actividad de CAPN2, respectivamente.

La cinasa ERK ha demostrado in vitro, inducir la fosforilación en el residuo de Ser50 en m-calpaína y μ -calpaína (Glading et al., 2004). Además, en estudios realizados en fibroblastos estimulados con EFG, esta fosforilación en Ser50 de la m-calpaína, ha resultado ser activadora de la proteasa, incluso en ausencia de calcio, y aumentar su presencia en la membrana celular (Shao et al., 2006).

La fosforilación en los residuos 369 y/o 370 catalizada por la proteína cinasa A (PKA) y se ha demostrado en cultivo de fibroblastos inhibe la actividad de la calpaína (Shiraha et al., 2002). Además, un estudio in vitro con diferentes mutaciones en la m-calpaína ha confirmado el efecto inhibitor de las mutaciones Ser369Asp, Ser369Glu y Thr370Glu (S. D. Smith et al., 2003).

Existen diversos estudios que describen la regulación de la actividad de las calpaínas a través de cinasas o fosfatasa, aunque en algunos casos no se han identificado los residuos implicados. Por ejemplo, se ha observado que la PKC

fosforila in vitro tanto la μ -calpaína como a la m-calpaína, y su sobreexpresión in vivo aumenta el grado de fosforilación de las proteasas (Xu & Deng, 2006a).

Por otro lado, la fosfatasa PP2A es capaz de defosforilar ambas calpaínas in vitro, y su sobreexpresión previene la activación de las calpaínas frente a un estímulo de nicotina (Xu & Deng, 2006b).

En neuronas, se ha observado que la activación de la PKA inhibe la actividad de las calpaínas en las neuritas (Mingorance-Le Meur & O'Connor, 2009). En el caso del miocardio preisquémico, se ha demostrado que la activación de la PKA previene la activación de las calpaínas durante la reperfusión (Inserte et al., 2004).

5.4.6.2. Otras modificaciones

Las calpaínas son susceptibles de sufrir modificaciones por nitrosilación, ya que se ha comprobado que la adición del donador de óxido nítrico S-nitrosoglutatión disminuye la actividad de la μ -calpaína (Liu et al. 2016). Además, en el contexto del cáncer, la supresión de la O-GlucosilNAcetilación del receptor de rianodina 1 (RYR1) mediante la secreción de miR-122 puede provocar la activación de la calpaína, lo que lleva a la rotura de filamentos de desmina y la destrucción miofibrilar (Yan et al. 2022). Estos hallazgos sugieren que la nitrosilación y la O-GlucosilNAcetilación pueden regular la actividad proteolítica de las calpaínas en distintas condiciones celulares, lo que puede tener importantes implicaciones en la patogénesis de enfermedades como el cáncer (Yan et al., 2022).

5.4.6.3. El estado redox

El estado redox también es un factor importante involucrado en la modulación de la actividad de las calpaínas (Guttmann & Johnson, 1998). De hecho, muchos eventos intracelulares se ha demostrado que están influenciados por

el estado redox de las calpaínas, incluyendo la regulación de los activadores transcripcionales p53, NF- κ B, y AP1 (Sun & Oberley, 1996).

La actividad de las cisteínas proteasa requiere el intercambio de electrones entre los residuos de Cys y His en el sitio activo (Carlin et al. 2006) y la reducción de los grupos sulfhidrilo de los residuos de Cys, es uno de los indicadores de la oxidación de proteínas. Además, se sabe que los residuos de sulfhidrilo en los aminoácidos que contienen azufre, son especialmente susceptibles de ser oxidados ya que son los objetivos principales de las especies reactivas de oxígeno (Ortuño-Sahagún et al., 2014).

Los resultados obtenidos sobre el estado redox de las calpaínas, se han centrado fundamentalmente en la isoforma CAPN1. Los estudios realizados *in vitro* con tratamientos de CAPN1 con moléculas prooxidantes como H₂O₂, que promueven el intercambio de electrones entre los residuos de Cys e His, parece aumentar la autólisis y la activación de CAPN1. Además, estos estudios muestran que el residuo de cisteína que se encuentra dentro del sitio activo de la CAPN1 es susceptible a la oxidación, y que su oxidación promueve la inhibición reversible de su actividad, sin alterar la conversión del heterodímero entre ambas subunidades ni su autólisis (Guttman & Johnson, 1998). Sin embargo, una oxidación excesiva de la Cys en el sitio activo de la CAPN1 puede provocar la formación de enlaces disulfuro entre Cys115 y Cys108, lo que cambia la configuración de la enzima y, a su vez, provoca una disminución de la actividad de CAPN1 (Lametsch et al., 2008). Todo parece indicar, hasta el momento que este mecanismo de oxidación es exclusivo para la CAPN1. Además, también se confirmó que la oxidación de CAPN1 provocaría cambios en la conformación espacial de la proteína, lo que provocaría su agregación, exponiendo y ocultando determinados residuos de su estructura y sitios activos y finalmente provocando cambios en la actividad de la enzima (P. Liu et al., 2021; Qin et al., 2020).

5.5. Factores implicados en el reconocimiento de los sustratos

Las calpaínas clásicas exhiben una amplia gama de sustratos que son proteolizados en sitios específicos, generando grandes polipéptidos que pueden experimentar cambios en su función, ya sea pérdida, mantenimiento o incluso aumento. Por lo tanto, la proteólisis mediada por calpaínas no tiene como objetivo principal la eliminación de proteínas, como en el caso del proteasoma y los lisosomas, sino más bien actúan como moduladores de la función de sus sustratos a través de diversos mecanismos (Goll et al., 2003).

5.5.1. La afinidad por su sustrato

La CAPN1 y CAPN2 presentan homogeneidad en cuanto a sustratos y su afinidad por ellos. El reconocimiento de puntos de corte por parte de las calpaínas se atribuye a la estructura de la cadena aminoacídica, la cual prefiere regiones sin estructura secundaria. Un estudio de sitios de lisis secuenciados de casi 50 sustratos ha identificado preferencias por ciertos aminoácidos en posiciones cercanas, incluyendo Leu, Val y Thr en P2, y Tyr, Lys y Arg en P1, así como Pro en P2'-P4'. La presencia de Proximidad al sitio de corte hidrolizado impide la formación de una estructura secundaria, lo cual coincide con la preferencia por regiones desestructuradas (Tompa et al., 2004).

Sin embargo, la estructura primaria no es el único factor que determina el reconocimiento de la proteólisis por las calpaínas. Los estudios con librerías de péptidos han demostrado que las secuencias diana no coinciden con los péptidos hidrolizados a una mayor velocidad *in vitro*, excepto en los residuos en P2. Esto sugiere que las secuencias diana no son óptimas y que existen otros mecanismos que regulan la susceptibilidad del sustrato a la proteólisis por

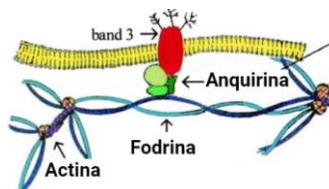
calpaínas. De hecho, se han observado cambios en la degradación de sustratos debido a la fosforilación del sustrato, la unión a fosfatidilinositoles (PIP3), la polimerización del sustrato y la unión de diversas proteínas con el sustrato (Tompa et al., 2004).

5.5.2. Sustratos marcadores de la actividad de las calpaínas

Más de cien proteínas diferentes han sido identificadas como sustratos, al menos in vitro, de la actividad de las calpaínas clásicas. Estas proteínas incluyen componentes del citoesqueleto (Fodrina, Talina, Anquirina, troponinas, desminas y distrofinas), cinasas (CaMKII, PKC y MLCK), fosfatasas (calcineurina y PTP-1B), factores de transcripción (c-Fos y p53), proteasas (Caspasas 7, 8, 9 y procaspasas 12), proteínas del ciclo celular (Ciclina D1 y p21), y transportadores y receptores de membrana (NCX y R-NMDA), entre otros. Además, se ha podido detectar la proteólisis de muchas de estas proteínas in vivo, asociada a varias funciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas (Franco & Huttenlocher, 2005; Goll et al., 2003)

5.5.2.1. La proteína fodrina

La fodrina es una proteína del citoesqueleto que desempeña un papel fundamental en la organización y estabilización de las estructuras celulares, siendo esencial para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional

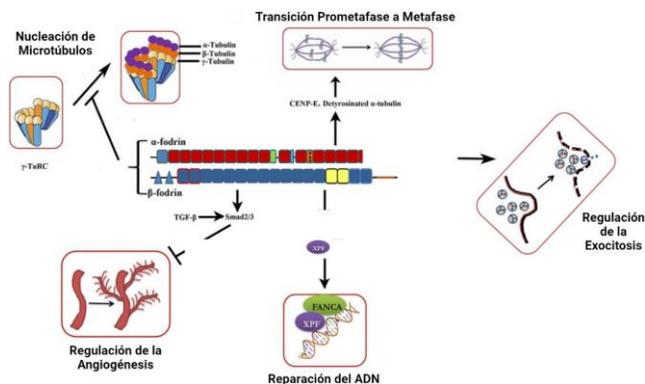


ESQUEMA 9. La *fodrina* forma una estructura de andamio junto con la *anquirina*, *actina* y otras proteínas, manteniendo la integridad estructural de las células. El esquema ha sido adaptado de (Rubtsov and Lopina 2000).

de la célula. Esta proteína es un tetrámero formado por dos subunidades α y dos subunidades β con un tamaño total de 293 kDa. La fodrina se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de los tejidos, especialmente en aquellos que presentan una alta tasa de renovación celular, como el músculo esquelético y el sistema nervioso (Sreeja et al., 2020a).

La función principal de la fodrina (del término griego que significa “forro”), en la célula es actuar como un andamio estructural que mantiene la integridad del citoesqueleto y la organización de las membranas plasmáticas (ver ESQUEMA 9).

También se ha demostrado, ESQUEMA 10, más recientemente, que la fodrina está involucrada en otras vías como son la señalización celular, la regulación del ciclo y la adhesión celular, regulación de exocitosis, transición de prometafase a metafase, regulación de angiogénesis y reparación del ADN (Baitinger & CHENEY Trun, 1987; Rubtsov & Lopina, 2000; Shashikala et al., 2013a; Sreeja et al., 2020a).

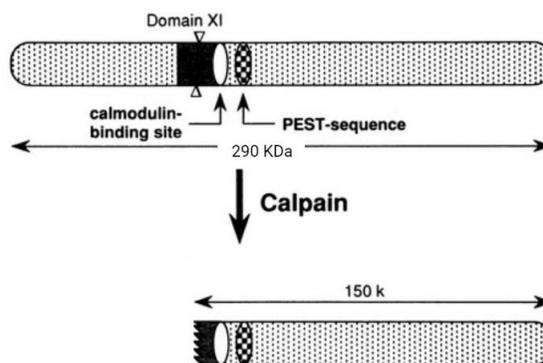


ESQUEMA 10. **Funciones de la fodrina.** Esquema adaptado de (Sreeja et al., 2020a)

Sin embargo, la fodrina es un sustrato importante de la actividad proteolítica de las calpaínas, y su proteólisis ha sido desde hace mucho tiempo ampliamente utilizada como un marcador específico de la actividad de estas

proteasas e incluso asociada al daño cerebral por isquemia/reperfusión (Fukuda et al., 1998).

La proteólisis de la fodrina por las calpaínas resulta en la fragmentación específica de la proteína en productos de degradación más pequeños de 150 y 145 KDa (ESQUEMA 11), lo que produce la pérdida de su capacidad para unirse a otras proteínas del citoesqueleto y membranas celulares. Esta proteólisis puede tener un efecto significativo en la función celular y se ha relacionado con varios procesos fisiopatológicos, como la lesión neuronal en la enfermedad de Alzheimer y la miopatía muscular (de la Fuente et al., 2020; Takeda et al., 1991).



ESQUEMA 11. Locus de escisión de fodrina mediada por calpaínas a través de la secuencia PEST originándose fragmentos de 150/145 KDa. Esquema adaptado del artículo. PEST: secuencias peptídicas ricas en residuos de Prolina (P), Ácido Glutámico (E), Serina (S) y Treonina (T).

5.5.2.2. La relación entre las calpaínas, la calpastatina y la caspasa-3

Durante el desarrollo del Sistema nervioso, se ha identificado que existe una relación inversa en los niveles de expresión de la CAPN1 y de Caspasa-3. Este hecho, coincidiría con los cambios en los mecanismos de muerte observados tras la lesión cerebral, siendo dependientes de Caspasa-3 en el cerebro de neonatos, a independientes de esta proteasa en adultos (Y. Li et al., 2009). Respecto a los niveles de expresión de proteínas y de ARNm de las

CAPN1, CAST, Casp-3 y CAPN2, los estudios realizados en rata demuestran un aumento similar en la expresión de CAPN1 y CAST entre los días 10 y 30 de edad postnatal, respecto a días tempranos del desarrollo (E18). Por el contrario, los niveles de expresión de la caspasa-3 son más altas en estadios embrionarios del desarrollo respecto a los observados en edad posnatal. A su vez, los niveles de expresión de CAPN2 permanecieron constantes a lo largo de los días de desarrollo embrionario, posnatal y adulto estudiados (desde E18 hasta p90)(Y. Li et al., 2009).

Por otro lado, se ha demostrado un fenómeno de retroalimentación positiva entre ambas proteasas, calpaínas y caspasa-3, ya que la activación de la calpaína parece activar la caspasa-3, a través de una serie de eventos bioquímicos complejos y a su vez, la activación de la caspasa-3 puede aumentar la actividad de la calpaína. Esta retroalimentación positiva puede ser beneficiosa en ciertas circunstancias, como en los procesos de eliminación de células dañadas, pero también puede ser perjudicial si se produce una activación excesiva y no controlada de la calpaína y la caspasa-3, lo que puede llevar a la muerte celular exacerbada.

Es importante destacar que esta retroalimentación positiva no es la única forma en que la calpaína y la caspasa-3 pueden interactuar en las células y que los mecanismos exactos de esta interacción aún no se comprenden completamente (Wang 2000).

HIPÓTESIS

La homeostasis celular se mantiene gracias a los sistemas de control de la síntesis y degradación de proteínas, como son el sistema ubiquitina-proteasoma, el de autofagia-lisosomal y las proteasas. En este sentido, las proteasas no lisosomales, conocidas como calpaínas, constituyen un sistema complejo de modulación de la función proteica durante el desarrollo de numerosas patologías, incluidas las neurológicas, como es la isquemia.

Junto a la excitotoxicidad, la entrada intracelular de calcio, el control en la estabilidad proteica y la generación de especies reactivas de oxígeno, la activación de las calpaínas es un factor clave implicado en la muerte neuronal inducida por la cascada isquémica. Por tanto, las estrategias neuroprotectoras encaminadas a la interrupción de los mecanismos que desencadenan este fenómeno y, en concreto, el sistema de las calpaínas puede tener una importante relevancia en la resistencia frente al daño isquémico. Nosotros pensamos que el preconditionamiento isquémico, una conocida herramienta de neuroprotección endógena, podría estar implicado en la regulación del sistema de las calpaínas y por lo tanto en la respuesta de tolerancia isquémica neuronal. Con estos antecedentes, y puesto de manifiesto la importancia que posee el control de la estabilización de las proteínas durante la isquemia, en la presente Tesis Doctoral nos hemos propuesto identificar la función de las calpaínas durante la tolerancia neuronal en respuesta al daño isquémico.

OBJETIVOS

En la presente Tesis doctoral, basándonos en los antecedentes y en la hipótesis descrita, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar la relevancia fisiológica del sistema de las calpaínas, en un modelo de preconditionamiento isquémico en ratón.
2. Establecer un modelo de preconditionamiento isquémico, con capacidad neuroprotectora, en neuronas corticales en cultivo de ratón y que permita identificar la posible función de las calpaínas en respuesta a la isquemia experimental.
3. Investigar la función de las calpaínas durante la tolerancia inducida por el preconditionamiento en respuesta al daño isquémico, así como establecer el mecanismo molecular implicado, en los cultivos primarios de neuronas corticales.

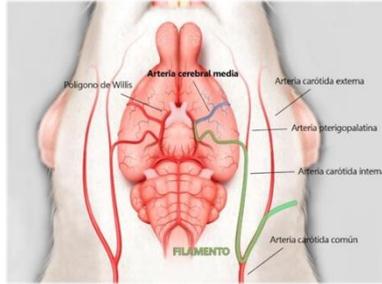
MATERIAL Y MÉTODOS

1. MODELOS DE PRECONDICIONAMIENTO Y DE ISQUEMIA EN CEREBRO DE RATÓN

1.1. Procedimiento quirúrgico de isquemia in vivo

Al inicio de los experimentos, todos los protocolos que implican el manejo de animales vivos se aprobaron por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca y siguiendo la normativa vigente de la Unión Europea 2007/526/EC, de 18 de junio de 2007 y española RD53/2013 de 1 de febrero de 2013. Los animales utilizados en los procedimientos quirúrgicos fueron machos C57/Bl/J6 de 3 meses de edad y un total de 3-5 animales por grupo experimental.

La inducción de condicionamiento isquémico in vivo, en cerebro de ratón, se desarrolló utilizando un modelo de procedimiento de cirugía validado previamente (F. Liu & McCullough, 2014; Vecino et al., 2018) y consistió en la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO; *transient middle cerebral artery occlusion*) utilizando un filamento de nylon de 6/0. Tras la oclusión de 6 minutos, se permitió la reperusión del tejido cerebral de 24 horas previo a la tMCAO dañina tras este periodo de recuperación, tal y como se indica en el ESQUEMA 12, se realizó de nuevo una oclusión transitoria de la ACM durante 45 minutos y seguida de reperusión posterior de 24 horas (IPC+tMCAO). Además, se realizó en un grupo de animales, este mismo procedimiento quirúrgico de tMCAO de 45 minutos, pero sin preconditionamiento previo, grupo de animales no preconditionados (SHAM+tMCAO). Paralelamente, se realizaron los grupos de animales control, sin oclusión de la ACM (SHAM+SHAM) y los animales preconditionados, pero sin daño posterior (IPC+SHAM).



ESQUEMA 12. Procedimiento quirúrgico consistente en la oclusión de la arteria cerebral media (tMCAO). Dibujo realizado por el Dr. Jesús Agülla Freire.

1.2. Extracción de las muestras de tejido cerebral

Tras el sacrificio de los animales, correspondientes a los grupos experimentales indicados en el apartado 1.1, se extrajeron los cerebros separándose ambos hemisferios: el ipsilateral (hemisferio dañado; IL) y contralateral (hemisferio contrario al dañado; CL); la corteza cerebral y el estriado se diseccionaron y se congelaron en nitrógeno líquido (-80°C) y en tampón de extracción RIPA (dodecilsulfato sódico; SDS al 1 %, EDTA 10 mM, Tritón Tx-100 al 1 % v/v, NaCl 150 mM, Na₂PO₄ 10 mM pH 7,0 y suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas). Posteriormente, los análisis de transferencia tipo *Western Blot* se realizaron tal y como se describe en el apartado 9.2 de Material y Métodos.

1.3. Análisis del volumen de la lesión cerebral

El volumen de infarto cerebral se analizó mediante tinción con la sal de tetrazolio (TTC), cuyo fundamento es la reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio en 1,3,5-trifenilformazán, mediante la acción de varias deshidrogenasas, lo que produce un color rojizo en el caso del tejido vivo. Sin

embargo, el TTC conserva su color blanquecino en el tejido muerto como consecuencia de la degradación de las enzimas (Bederson et al., 1986).

2. CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS CORTICALES DE RATÓN

Los cultivos primarios de neuronas corticales se obtuvieron a partir de embriones de ratones C57Bl/J6 de 14,5 días de gestación mediante protocolos estandarizados en el laboratorio (Bobo-Jiménez et al., 2017; Delgado-Esteban et al., 2013; Veas-Pérez De Tudela et al., 2015). Tras la extracción de los embriones, con la ayuda de unas pinzas y micro tijeras quirúrgicas se extrajeron los hemisferios corticales de los embriones por histerectomía. La disgregación celular hasta el sembrado de las células se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, Virginia, EE. UU.). Se disgregó el tejido mecánicamente con un bisturí y pipeta siliconada, y enzimáticamente con solución de tripsinización (EBSS, Earle's Balanced Salt Solution, NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 26 mM, NaH₂PO₄ -2H₂O 1,01 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/L suplementado con albúmina 0,3 % (p/v) y DNAsa tipo I 20 µg/ml, pH 7,2, tripsina 0,025 % p/v) a 37°C en un baño termostatzado durante 10 minutos agitando cada 2 o 3 minutos para evitar la decantación del tejido, la digestión enzimática se detuvo añadiendo un 10 % de suero fetal bovino, antes de una centrifugación del tejido (500 X g 5 minutos) en una microcentrífuga a temperatura ambiente. Finalmente, las células se sembraron en presencia de un medio de cultivo Neurobasal A (Glucosa 5,5 mM (Sigma), piruvato 2,25 mM (Sigma Aldrich), Glutamina 2 mM (Gibco), B27 (Thermofisher S.), Antibiótico (100 U/mL de penicilina G (Sigma), 100 µg/mL de estreptomocina (Sigma) y 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma) y un tratamiento de plasmocín (2,5 µg/mL) para evitar el crecimiento de

micoplasma), en placas de cultivo de diversas superficies dependiendo del diseño del experimento y los análisis posteriores. Las células se incubaron en un ambiente húmedo a 37°C y 5 % de CO₂, cambiando completamente el medio de cultivo cada 3 días para su mantenimiento. A los 8-9 días *in vitro* (DIV) se realizaron los distintos estudios experimentales y análisis posteriores.

La duración de los tratamientos con ácido okadaico (OA) (10 nM) (Sigma Aldrich); glutatión etil éster (GSH-EE) (1 mM, BACHEM, UK); H₂O₂ (60 uM, Sigma Aldrich); aparecen descritos en cada uno de los resultados correspondientes.

3. MODELOS DE PRECONDICIONAMIENTO E ISQUEMIA EN CULTIVOS DE NEURONAS CORTICALES DE RATÓN

En los últimos años, los estudios realizados en cultivos celulares han demostrado la eficacia en la neuroprotección inducida por el preconditionamiento isquémico (Dirnagl et al., 2003; Yang et al., 2016; Zhao et al., 2022)]. Tal y como se describe en el ESQUEMA 13, a los 8-9 días en cultivo primario, las neuronas se sometieron a un modelo de preconditionamiento o/y de isquemia experimental previamente validado (Barrio et al., 2021; Vecino et al., 2018). Para ello, se utilizó un incubador modelo *RUSKINN "in vivo 400"* (Cultek: 25INVIVO-001), equipado con una entrada de aire y otra de gaseado continuo de 95 % de N₂ y 5 % de CO₂ y que permite controlar las concentraciones de O₂. Pevio al inicio de los experimentos de isquemia, se incubaron dentro del incubador de hipoxia y en erlenmeyer, 50 mL del medio de isquemia (Neurobasal A (Gibco, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.) en presencia de Piruvato 2,25 mM,

antibiótico penicilina G 100 U/ml; estreptomicina 100 µg/ml; anfotericina B 0,25 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.), Plasmocin™ treatment (Invivogen)(1/10.000), glutamina 2 mM, y en ausencia de glucosa y de suplemento B27), durante 5 min (IPC) o bien durante 30 minutos en el caso de la condición de daño isquémico (*oxygen glucose deprivation*, OGD), con objeto de calibrar y mantener su porcentaje de O₂ por debajo del 1 % desde el inicio de las incubaciones. Existen estudios que demuestran como el ambiente de hipoxia junto con la ausencia de glucosa (OGD) es un modelo representativo de algunos de los aspectos metabólicos de la isquemia en distintos tipos celulares (Almeida et al. 2002; Juurlink and Hertz 1993; Reichert, Sook Kim-Han, and Dugan 2001).

Para ello, a los 8-9 DIV y previo a la isquemia se les retiró el medio de cultivo y se lavaron una vez con PBS atemperado. La isquemia se indujo incubando las células a 37°C en un incubador de hipoxia tal y como se ha explicado anteriormente. Tras la isquemia, ver ESQUEMA 13, las neuronas se incubaron durante un tiempo de reoxigenación total de 4 horas (OGD/R), en medio Neurobasal A (Gibco, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.) en presencia de Piruvato 2,25 mM, antibiótico: penicilina G 100 U/ml; estreptomicina 100 µg/ml; anfotericina B 0,25 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.), Plasmocin™ treatment (Invivogen) (1/10.000), glutamina 2 mM y glucosa 5,5 mM, pero en ausencia de suplemento B27 (Vecino et al., 2018).

Paralelamente, las neuronas se incubaron en condiciones de Normoxia (Nx) y en condiciones de IPC, seguida de 2h de reoxigenación en un medio (Neurobasal A (Gibco, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.) en presencia de Piruvato 2,25 mM, antibiótico penicilina G 100 U/ml; estreptomicina 100 µg/ml; anfotericina B 0,25 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.), Plasmocin™ treatment (Invivogen) (1/10.000), glutamina 2 mM y

apoptóticas a través de la fluorescencia emitida al unirse al fosfolípido localizado en el exterior de la célula. No obstante, la anexina V también es capaz de unirse a la PS situada en el interior de las células que han perdido su integridad de membrana (consideradas como necróticas). Por lo tanto, junto a la anexina V se utilizó 7-AAD, un colorante impermeable a la membrana plasmática que se une específicamente al ADN de las células necróticas. Así, solo aquellas células inmunorreactivas o positivas para anexina V y que mostraron ser negativas para 7-AAD (Anexina V⁺/7-AAD⁻) se consideraron células apoptóticas (Anexina V⁺/7-AAD⁻) (Veas-Pérez De Tudela et al., 2015; Vecino et al., 2018).

Tras las distintas incubaciones experimentales o tratamientos, se realizaron los análisis de la muerte por apoptosis mediante citometría de flujo. Para ello, primero las neuronas se recolectaron suavemente con EDTA tetrasódico 1 mM en PBS durante 1 minuto y se resuspendieron en tampón de conjugación (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH 7,4) y a continuación, se incubaron con una mezcla de anexina V-APC y 7-AAD durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente, tras la incubación, se añadió tampón de conjugación suficiente para conseguir una concentración celular de aproximadamente 10⁶ células/ml.

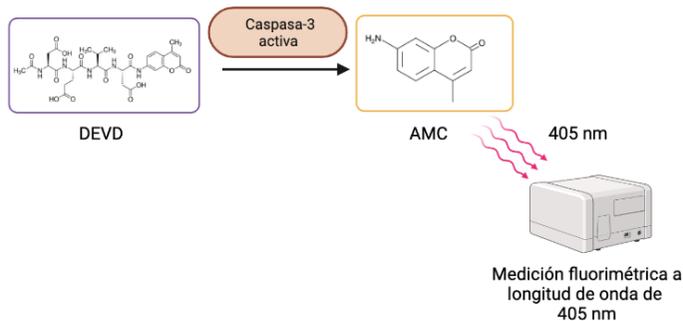
La detección de las señales correspondientes a la anexina V y del 7-AAD se realizó en los canales FL4 y FL3 respectivamente, en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15 mW. Se utilizó el programa CellQuest™ para la adquisición de eventos. El análisis de los resultados se realizó con el programa Paint-A-Gate™ PRO de BD Biosciences. El umbral del analizador se ajustó en el canal correspondiente del citómetro de flujo para excluir la mayoría de los restos o agregados celulares. Con ello, se descartó el ruido de fondo debido a la ruptura de neuritas y extensiones celulares, y a los dobletes o tripletes formados por uniones

intercelulares. Los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas apoptóticas, siendo éstas las células positivas para Anexina-V y negativas para 7-AAD (Anexina V⁺/7-AAD⁻). En cada ensayo experimental, se seleccionaron entre 50.000 y 100.000 eventos y se realizaron los análisis por triplicado por experimento o cultivo y para cada una de las condiciones estudiadas, en un total de 3 cultivos.

5. ANÁLISIS POR FLUORIMETRÍA DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3

La actividad de la caspasa-3 como marcador de la vía apoptótica intrínseca, se analizó mediante fluorimetría (Kit CASP3F, Sigma) en los extractos de lisados celulares, siguiendo las instrucciones del fabricante y a una longitud de onda de 405 nm. El método se basa en la liberación de la molécula fluorescente 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) a partir del DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) (ESQUEMA 14). La concentración de AMC se calcula utilizando un AMC estándar utilizado previamente en el grupo (Vecino et al., 2018) utilizando un espectrofotómetro Varioskan Flash (Thermo Fisher, Vantaa, Finland).

Paralelamente a estos ensayos de fluorimetría, la actividad de la caspasa-3 también se analizó mediante *Western Blot* (Sección 9 de Material y Métodos), utilizando un anticuerpo específico que reconoce la forma activa de la proteasa (Ver TABLA 3).



ESQUEMA 14. Fundamento del método fluorimétrico para el análisis de la actividad de la caspasa-3. DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) Y AMC (7-amino-4-methylcoumarin).

6. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE LOS NIVELES DE ARNm MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

6.1. Extracción de las muestras de ARN

La extracción del ARN se realizó utilizando el kit comercial Genelute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA). Las neuronas a los 6 DIV se lisaron con una mezcla de β -mercaptoetanol y solución de lisis en proporción 1:100 (v/v). El lisado de las distintas condiciones se filtró con Genelute Filtration Column, que permitió desechar el ADN y los restos celulares a través de una columna con filtro. Para la separación se centrifugó a 16.000 x g. Posteriormente, mediante el uso de etanol al 70 % en agua DEPC (Di-etil-pirocarbonato) libre de ARNasas se pasó a través de la columna donde estaba el ARN adherido. A continuación, se lavó una vez con Wash Solution 1. Una vez separado el ARN, se trató la columna con 100 U de DNasa I (DNase I, RNase-free, Roche), durante 15 minutos a temperatura ambiente en un tampón

compuesto por Tris-HCl 400 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM y CaCl₂ 10 mM; pH 7,9. Tras la incubación, para desechar los restos de ADN residual y evitar la amplificación del AND genómico, se lavaron las columnas tres veces, una con la solución de lavado (Wash Solution 1) y otra con Wash Solution 2 Concentrate/etanol, lo que permitió un secado completo de la columna. Por último, se eluyó en ARN en un tubo eppendorf libre de RNAsas en un volumen de 50 µl de solución de elución (Elution Solution) mediante centrifugado a 16.000 X g durante 1 minuto.

El ARN purificado quedó en el filtrado y se midió su concentración con un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). El ratio de absorbancia de 260 frente a 280 nm (A₂₆₀ / A₂₈₀), que se obtuvo estuvo comprendido entre 1,8–2, lo que determinó la pureza del ARN purificado para su posterior análisis por RT-qPCR.

6.2. Análisis de los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR)

6.2.1. Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción del ARN se realizó mediante el uso de cebadores aleatorios (“random primers”) y oligos dT (ADN sintético de 15 nucleótidos con base timina complementario a la terminación poliadenilada presente en el ARNm). Se incubó, en primer lugar, 1 µg de ARN total extraído junto con 0,5 µg de oligo dT en 10 µl de agua DEPC durante 10 minutos a 70°C. A continuación, se dejó 1 minuto en hielo y se incubó, en segundo lugar, con 1 µl de la transcriptasa reversa (AMV Reverse Transcriptase 40 U / µl, Promega), 2 µl del correspondiente tampón 10X (suplementado con MgCl₂ 25 mM), 1 µl de la mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs 10 Mm, Roche), y 1 µl de

un inhibidor de RNAsas, en un volumen final de 20 μ l, durante 50 minutos a 48°C.

6.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semicuantitativa

La expresión diferencial de los genes de interés (Ver TABLA 2) se realizó mediante la técnica de la RT-qPCR y se cuantificó de forma relativa respecto a un control interno de expresión constante (housekeeping gene).

La amplificación y detección es de forma simultánea gracias a la emisión de fluorescencia por parte de un fluorocromo, en concreto SYBR Green (Applied Biosystems), el cual se intercala entre las hebras de ADN bicatenario. De esta forma, la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado (amplicón).

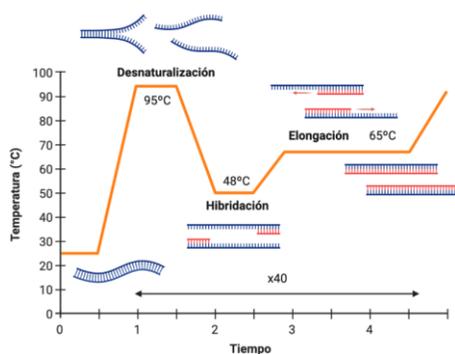
Previo al análisis de la expresión de los genes de estudio, se procedió a la puesta a punto de la concentración de cada oligonucleótido empleado como cebador o primer y se calcularon las eficiencias de amplificación de los cebadores diseñados con los softwares Geneious (Biomatters Limited, Auckland, Nueva Zelanda) y Amplifix (Universidad de Marsella, Marsella, Francia). Se consideraron óptimas las eficiencias comprendidas entre el 85 y el 115 % (Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, Applied Biosystems). Las eficiencias de cada primer son necesarias para poder comparar la expresión de los distintos genes mediante el Método Comparativo de Ct ($\Delta\Delta$ Ct).

Las condiciones en las que se emplearon los distintos oligonucleótidos se resumen a continuación en la TABLA 2:

GEN DIANA	Secuencia Forward 5'→3'	Secuencia Reverse 5'→3'	Concentración (μM)	Eficiencia (%)
capn1	CAAACACAAAGACCTG CGGA	TTCCACAGGATGTT GAACTCCA	0,2	85
capn2	GAAAGCTGACTACCAA GCTGTCGA	CCAACTGGGCAAAC AGTCTCCTG	0,3	83
fodrina	TCCGTGATTCTGATGA GCTC	GCCTCAAAGCCTG ATGCT	0,3	83
gapdh	TCAGCAATGCCTCCTG CACC	GCATGGACTGTGGT CATGA	0,3	108

TABLA 2. *Secuencias de los distintos genes de interés, capn1, capn2, fodrina y gapdh.*

La expresión de los genes se cuantificó mediante el uso del kit comercial Power SYBR Green RNA-to-Ct™ 1-Step Kit (Applied Biosystems, California, EE. UU.), acoplando el proceso de retrotranscripción y amplificación en un único paso. Inicialmente, se utilizaron 100 ng de ARNm un volumen final de 20 μl por reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador CFX96 (Bio-Rad Laboratories), llevando triplicados en cada una de las condiciones estudiadas.



ESQUEMA 15. *Perfil de reacción de qRT-PCR realizando secuencialmente: el proceso de desnaturalización, hibridación y elongación en el termociclador CFX96 durante 40 ciclos.*

El perfil de cada reacción mostrado en el ESQUEMA 15, se llevó a cabo a través de un ciclo de 30 minutos a 48 °C (etapa de retrotranscripción), un ciclo de 10 minutos a 95 °C (desnaturalización) y 1 minuto a 65 °C (anillamiento y elongación).

El valor que se obtuvo por cada reacción fue el Ct (*threshold cycle*), y hace referencia a la fluorescencia emitida en cada ciclo por el SYBR Green dentro de la fase lineal. Así, se obtuvo el Ct para cada uno de los genes de estudio, incluyendo el housekeeping (*gapdh*). El incremento de Ct (Δ Ct) es el valor de Ct de cada muestra normalizado frente al control interno (*gapdh*). El método comparativo de Ct relaciona el número de copias de ARNm entre las distintas condiciones, que se obtiene al final de una reacción optimizada empleando la fórmula siguiente (Bustin et al. 2009):

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$
$$2^{-[(Ct_{muestra} - Ct_{Gapdh}) - (Ct_{calibrador} - Ct_{Gapdh})]}$$

La expresión de los niveles de ARNm se comparó frente a la condición calibrador y los resultados se relativizaron respecto al mismo, dándole a éste un valor de 1. Aquellos niveles de expresión igual a 1 significan que la muestra de interés presenta el mismo nivel de expresión génica que el control. Sin embargo, estos niveles pueden ser superiores o inferiores a 1, siendo mayor o menor la expresión del gen de interés respectivamente. Los resultados se mostraron en unidades arbitrarias de expresión (*fold*) entre las muestras problema y un calibrador o control (en nuestro caso, el gen *gapdh*). Los resultados obtenidos de un triplicado por cada condición, de un total de 3 cultivos diferentes.

6.2.3. Electroforesis de ADN en geles horizontales de agarosa

Para separar los productos de digestión producidos por enzimas de restricción y poder distinguir diferentes fragmentos de ADN en función del tamaño hemos utilizado geles de agarosa al 0,8 %.

Previamente a la electroforesis, se adicionó a las muestras tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25 %, xileno cianol al 0,25 % y ficol al 15 %). Para realizar la electroforesis fue necesario introducir los geles de agarosa en una solución TAE 1X (TAE 50X; Tris-acético 2M, EDTA 0,05 M, acético glacial al 10 %, pH 8,0), a voltaje constante 120 V durante 30 minutos. El tamaño de las bandas se pudo discernir gracias al uso del marcador de peso molecular de 1 Kb Ladder Marker (Biotools, Madrid, España) presentando un patrón de bandas de peso conocido oscilando desde los 0,25 a 10 Kb.

La fabricación de los geles se realizó utilizando agarosa (Seakem® LE Agarose, Lonza) de baja electro endosmosis (menor número de grupos ácidos cargados a pH básico), para aumentar la movilidad electroforética del ADN, siendo la concentración variable de 0.8–2 % en función del tamaño de las bandas de interés.

Una vez atemperado el gel se adicionó Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Dueren, Alemania). Esta sonda fluorescente se excita a una longitud de onda de 350 nm y emite una luz verde a 540 nm cuando se intercala en el ADN. Estas bandas son visualizadas en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad Laboratories). El análisis de las imágenes se realizó mediante el uso digital de un sistema Gel Doc (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU).

7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS CORTICALES

La extracción de proteínas totales se realizó de la siguiente manera: primero las células se lavaron con PBS frío y a continuación se añadió tampón de lisis consistente en Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP-40 al 1 % [v/v] suplementado con una batería de inhibidores de proteasas (aprotinina 50 µg/ml, leupeptina 50 µg/ml, tripsina 50 µg/ml, Tosyllysine Chloromethyl Ketone hydrochloride [TLCK] 100 µM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF] 100 µM, anti-papaína 50 µM y de fosfatasas (Na₃VO₄ 1mM, NaF 50 mM, amastatina 50 µg/ml, bestatina 50 µg/ml y pepstatina 50 µg/ml). El proceso de extracción se realizó en frío, manteniéndolas en un orbital durante 20 minutos hasta su centrifugación a 13.000 X g a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un nuevo tubo y las muestras se congelaron a -80 °C hasta la determinación de la concentración de las proteínas y su posterior análisis mediante transferencia tipo *Western Blot* (ver apartado 9.2 de Material y Métodos). En el caso de los ensayos del estado oxidado de las proteínas, tras la recolección de los extractos celulares y proteicos con el trampón antes indicado, se le añadió el compuesto N-etil-maleimida 40 nM o NEM (Sigma Aldrich®). El NEM es un compuesto orgánico derivado del ácido maleico, alqueno y con grupo funcional imida que permite reaccionar con los grupos tioles de las proteínas. Su unión alquila a los grupos cisteína de las proteínas de forma irreversible, haciendo posible su uso en el estudio de los cambios de migración electroforética de los distintos estados de oxidación de las proteínas, en condiciones no reductoras (ausencia de β-mercaptoetanol) y comparándolas en condiciones reductoras (presencia de β-mercaptoetanol) (Delgado-Esteban et al., 2007).

8. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR: NÚCLEO Y CITOSOL

El fraccionamiento de los compartimentos núcleo y citosol procedentes de las neuronas, se realizó siguiendo el protocolo de fraccionamiento subcelular diferencial utilizado anteriormente en nuestro laboratorio (Delgado-Esteban et al., 2013; Gomez-Sanchez et al., 2011; Veas-Pérez De Tudela et al., 2015) y descrito en el ESQUEMA 14. Este método consiste en el uso de una solución de lisis débil (tampón de citosoles) dejando los núcleos íntegros, mientras que para la segunda fase de extracción se usa un tampón fuerte (tampón de núcleos) permitiendo la rotura de los núcleos celulares y la obtención de dichas proteínas.

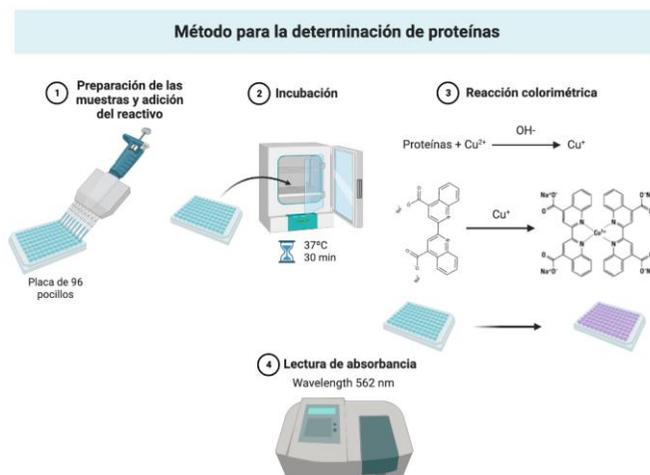
Para ello, durante la realización de los cultivos primarios, las neuronas se sembraron en placas de 60 cm² y tras los experimentos, se lavaron con PBS frío suplementado con MgCl₂ 1 mM a 4°C. Las células se lisaron y se recogieron en tampón de citosoles (HEPES 10 mM pH 7,9; MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, NP40 0,1 % [v/v] y sacarosa 300 mM) suplementados con inhibidores de proteasas y fosfatasas. La muestra se resuspendió 15 veces con micropipeta y se incubó en hielo durante 30 minutos, realizándose ciclos de resuspensión-reposo en frío cada 5 minutos. Posteriormente, se analizó la integridad de los núcleos y la rotura de las membranas citoplasmáticas con un microscopio de campo claro. A continuación, se realizó una centrifugación de 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C con el objetivo de separar el contenido citosólico (sobrenadante) del nuclear (precipitado). Tras la recolección de la fracción citosólica a un nuevo tubo eppendorf, se resuspendió la fracción nuclear en el tampón de núcleos (HEPES 50 mM pH 7,9; MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, NaCl 0,5 mM, EDTA 1 mM, NP40 0,1 % [v/v]) suplementado con inhibidores de

proteasas y fosfatasa. Las muestras se agitaron en un vórtex durante 10 segundos y se congelaron a -80°C . Tras ese ciclo de congelación/descongelación, las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se sonicaron durante 10 minutos. En todos los casos se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación a -80°C con objeto de romper la envoltura nuclear (Veas-Pérez De Tudela et al., 2015; Vecino et al., 2018).

9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

9.1. Determinación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se cuantificó mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA; Pierce, ThermoScientific, Illinois, EE. UU.) basado en la reducción del Cu^{2+} (azul) a Cu^{1+} en presencia de proteínas y medio alcalino (Reacción de Biuret) resumido en el ESQUEMA 16. El Cu^{+} reducido es

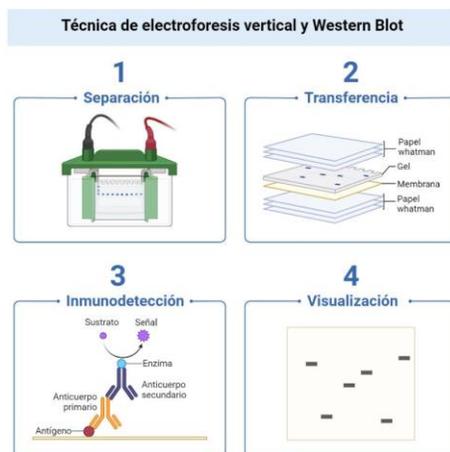


ESQUEMA 16. Método para la determinación de proteínas mediante el método del ácido bicinonínico o BCA.

directamente proporcional a la cantidad de proteína presente. Por lo tanto, el Cu^+ generado reacciona con el BCA, originándose un color púrpura el cual se midió espectrofotométricamente en un Multiskan Ascent (Thermo Electron Corp, Basingstoke, Reino Unido) y se calcularon las concentraciones a través de la recta patrón la cual se usaron concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

9.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes

Tras obtener los extractos proteicos tal y como se explicó en el apartado 7 de Material y Métodos, se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (solución de acrilamida/bisacrilamida 29:1; Bio-Rad Laboratories S.A., California, EE. UU.) a distintos porcentajes 6, 8, 10, 12 o 15 % dependiendo del peso molecular de la proteína de interés.



ESQUEMA 17. Técnica de electroforesis vertical y transferencia tipo Western Blot. 1) Separación por tamaño en gel de acrilamida/bis-acrilamida; 2) Transferencia del gel hacia la membrana mediante transferencia vertical; 3 y 4) Incubación con los anticuerpos primarios y secundarios y detección mediante un revelador en presencia de peroxidasa de rábano (Ver TABLA 3).

Para discernir entre los distintos pesos moleculares se usó un marcador de peso molecular (page Ruler TM Plus prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific) o Dual Colors R (Bio-Rad Laboratories). Las proteínas se separaron a través de un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean-3R, Bio-Rad Laboratories,) en un tampón (Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1 % p/v, pH 8,3). Tras finalizar la electroforesis se continuó con la electrotransferencia y la inmunodetección como se observa en el ESQUEMA 17.

9.3. Electrotransferencia e inmunodetección de proteínas

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (HybondR, Amersham Biosciences, Nueva Jersey, EE. UU.), utilizando el sistema Mini-Transblot (Bio-Rad Laboratories) y tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 % v/v, pH 8,3) (Burnette, 1981). A continuación, se bloquearon las membranas durante 1 hora con leche desnatada (Sveltesse, Nestlé, Vevey, Suiza) al 5 % (p/v) en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0,1 % v/v; pH 7,5) a temperatura ambiente.

El proceso de incubación de las membranas se realizó a 4 °C, durante toda la noche en una solución de TTBS y leche al 5 % (p/v), que contenía el anticuerpo de interés (Ver TABLA 3). Como control de carga, se utilizó para extractos totales y citosólicos, anti-GAPDH (Ambion, Austin, Texas, EE. UU.), y para extractos nucleares Lámina B. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con TTBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente

(Ver TABLA 3), conjugado con la peroxidasa de rábano (HRP), en TTBS con leche al 2 % durante una hora a temperatura ambiente.

<u>Anticuerpos primarios</u>	<u>Especie</u>	<u>Dilución</u>	<u>Clon (Referencia)</u>	<u>Casa comercial</u>
Calpastatina	Conejo	1:1000	ab28252	Abcam
Caspasa-3 activa	Conejo	1:1000	9661S	Cell Signaling
CAPN1	Ratón	1:1000	MBS9200385	Quimigen
CAPN1	Conejo	1:1000	ab28258	Abcam
CAPN2	Ratón	1:1000	MBS9231851	Quimigen
CAPN2	Conejo	1:1000	ab39165	Abcam
CSS1/CSS2	Ratón	1:1000	MA1-34966	Invitrogen
Flag	Conejo	1:1000	ab1162	Abcam
Flag	Ratón	1:1000	MA1-91878-D488	Invitrogen
Fodrina	Ratón	1:2000	ab11755	Abcam
GAPDH	Ratón	1:40000	AM4300	Ambion
Lamina B	Ratón	1:100	sc-374015	Santa Cruz
p35	Conejo	1:1000	2680	Cell Signaling
<u>Anticuerpos Secundarios</u>				
Anti-IgG de conejo	Cabra	1/10.000	Sc-2030	Santa Cruz
Anti-igG de ratón	Cabra	1/10.000	170-6515	Bio-Rad

TABLA 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección durante la realización de la transferencia vertical tipo Western blot.

Tras lavar las membranas 3 veces con TTBS, y una con TBS (TTBS sin Tween-20), las membranas se incubaron, según la proteína a detectar, con los reactivos de quimioluminiscencia (Ver TABLA 4) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Finalmente, las membranas se expusieron a una película de auto-radiografía (*Super RX photographic film*; Fujifilm, Tokio, Japón) para detectar la señal.

Reactivo	Casa comercial
Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate	Merck Millipore
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific™
Super Signal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific™
Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific™
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology

TABLA 4. Reactivos utilizados durante la fase de revelado de las membranas durante el análisis de transferencia tipo Western Blot.

En algunas ocasiones, tras finalizar el proceso de revelado, las membranas de nitrocelulosa se reutilizaron y se incubaron de nuevo con un anticuerpo primario distinto al de la primera incubación. Para ello, se realizó el proceso de *stripping* de las mismas, de tal manera que las membranas se incubaron con un tampón *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Scientific) durante 8 minutos.

A continuación, se lavaron durante 5 minutos con TTBS y se bloquearon de nuevo durante 20 minutos con leche al 5 % (p/v). Por último, se reincubaron con el anticuerpo de interés, siguiendo la TABLA 3 para la inmunodetección y transferencia tipo Western Blot.

10. INMUNOCITOQUÍMICA

La realización de los ensayos de inmunocitoquímica, se diseñó durante la realización del cultivo de neuronas corticales de ratón, sembrando las neuronas en placas de plástico que contenían cristales esterilizados a la llama y tratados con una solución de poli-L-ornitina 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich) y fibronectina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos y posterior lavado con el doble de volumen de agua ultrapura estéril.

Tras las distintas condiciones experimentales, las neuronas se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (v/v) en PBS durante toda la noche en la cámara fría y agitación suave. Tras la fijación se trataron con glicina 0,1 M en PBS durante 30 minutos y se permeabilizaron las membranas con Tritón X-100 al 0,25 % (v/v) en PBS durante 7 minutos. A continuación, se incubó con una la solución de bloqueo (Tritón X-100 al 0,1 % v/v y suero de cabra al 10 % v/v en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora y media.

La solución de los anticuerpos primarios se preparó con suero de cabra al 5 % en PBS y se añadieron sobre las muestras durante toda la noche a 4 °C en agitación suave. Posteriormente, se lavaron las muestras 2 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Cy2 y Cy3 a una dilución 1/500 (Jackson InmunoResearch, Pennsylvania, EE. UU.) en suero de cabra al 5 % en PBS. La incubación se realizó a temperatura ambiente protegida de la luz durante 1 hora y en agitación suave.

Para retirar el anticuerpo residual, se lavaron 3 veces con PBS y se procedió a la tinción de los núcleos con el marcador fluorescente DAPI 30 μM (Sigma-Aldrich). Los anticuerpos utilizados durante las incubaciones de inmunodetección se resumen en la TABLA 5.

<u>Anticuerpos primarios</u>	<u>Especie</u>	<u>Dilución</u>	<u>Clon (Referencia)</u>	<u>Casa comercial</u>
Calpastatina	Conejo	1:1000	ab28252	Abcam
Caspase-3 activa	Conejo	1:1000	9661S	Cell Signaling
CAPN1	Ratón	1:1000	MBS9200385	Quimigen
CAPN1	Conejo	1:1000	ab28258	Abcam
CAPN2	Ratón	1:500	MBS9231851	Quimigen
CAPN2	Conejo	1:1000	ab39165	Abcam
CSS1/CSS2	Ratón	1:200	MA1-34966	Invitrogen
Fodrina	Ratón	1:1000	ab11755	Abcam
Flag	Conejo	1:1000	ab1162	Abcam
Flag	Ratón	1:1000	MA1-91878-D488	Invitrogen
MAP2	Ratón	1:500	M1406	Sigma
MAP2	Conejo	1:1000	ab32454-100	Abcam
<u>Anticuerpos Secundarios</u>				
IgG Cy2	Conejo	1/500	115.225.003	Jackson ImmunoResearch
IgG Cy2	Ratón	1/500	111.225.003	Jackson ImmunoResearch
IgG Cy3	Conejo	1/500	111.165.003	Jackson ImmunoResearch
IgG Cy3	Ratón	1/500	111.175.003	Jackson ImmunoResearch

TABLA 5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de inmunocitoquímica.

A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS y un último lavado con agua estéril para el posterior montaje sobre los portaobjetos utilizando el reactivo Slow Fade Antifade[®] (Molecular Probes, Oregon, USA) para evitar la pérdida de fluorescencia. La adquisición de las microfotografías de fluorescencia se llevó a cabo utilizando el microscopio invertido *Nikon Eclipse Ti-E* (Nikon, Tokio, Japón) y un equipo de microscopía confocal *spinning disk Roper Scientific* con microscopio Olympus IX81 (Olympus[®], Tokio, Japón). Las imágenes se procesaron con el software *ImageJ64*.

11. MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN Y DE ACTIVIDAD DE LAS CALPAÍNAS

Con objeto de modular los niveles de expresión y de actividad, se siguieron dos estrategias diferentes: 1) La técnica de silenciamiento génico se utilizó para disminuir o silenciar la expresión de las isoformas CAPN1 y CAPN2 y 2) La actividad de las calpaínas se moduló utilizando inhibidores específicos.

11.1. Silenciamiento génico

El silenciamiento génico se realizó mediante la utilización de siRNA (small interfering RNA) específicos de cada isoforma siCAPN1 y siCAPN2, y el uso del reactivo catiónico *Lipofectamina RNAiMAXTM* (Invitrogen, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. La Lipofectamina se diluyó previamente en Opti-MEM (Gibco) y paralelamente se prepararon diluciones con el siRNA diana y siRNA control a una proporción 1:1. La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para facilitar la transfección

mediante la formación de liposomas con el siRNA. Finalmente, se añadió la solución de siRNA-Lipofectamina sobre el medio de cultivo, a una concentración final de 9 nM (Barrio et al., 2021; Jimenez-Blasco et al., 2015; Maestre et al., 2008).

El silenciamiento de ambas isoformas se realizó transfectando la línea celular humana HEK-293T y las neuronas corticales en cultivo primario. En ambos tipos celulares los niveles de ARNm, de CAPN1 y CAPN2 disminuyeron entre un 35-40 %, observados tras su análisis posterior mediante qRT-PCR y transferencia tipo *Western blot*. Los siRNAs comerciales utilizados se muestran en la TABLA 6:

siRNA	DIANA	Secuencia sentido 5' → 3'	REF	Casa Comercial
siControl	Control negativo N°1 Silencer™ Select. Sin similitud significativa con secuencias genéticas de rata y humano	-	AM4611	Ambion® Invitrogen®
siCAPN1	CAPN1	GAAUUGGAAUAC CACAUUUt	s63303	Ambion® Invitrogen®
siCAPN2	CAPN2	GGACGAAGAUUC AGAAAUAtt	s63306	Ambion® Invitrogen®

TABLA 6. *Secuencias de los ARN de interferencia utilizados. siControl, siCAPN1 y siCAPN2.*

11.2. Inhibición farmacológica

La inhibición de la actividad de las calpaínas se realizó tratando las neuronas con un inhibidor específico de calpaínas, el inhibidor ALLN (Ac-LLnL-CHO), también conocido como MG101 (CAS 110044-82-1-Calbiochem, Sigma Aldrich). El inhibidor ALLN se utilizó a una concentración de 0,6 μ M, concentración a la cual se verificó previamente, su eficiencia inhibidora, y se descartó su efecto neurotóxico como posible inductor de apoptosis. El tiempo total del tratamiento fue el de la duración de todas las condiciones experimentales, es decir de 6 h y 45 min.

12. ENSAYO DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

Los ensayos de interacción entre proteínas se realizaron utilizando la técnica de la inmunoprecipitación, que permite el aislamiento de las proteínas que se encuentran en una muestra mediante la unión específica de un anticuerpo unido a unas bolas magnéticas (dynabeads) y el uso de un dinal o soporte magnético.

12.1. Unión del anticuerpo a las Dynabeads®

Previamente a la realización del procedimiento de co-inmunoprecipitación se realizó un protocolo de *crosslinking*, en presencia de BS3 (Sulfosuccinilmidil suberato; Thermo Scientific) 5 mM. Se realizó la unión covalente del anticuerpo de interés con los gránulos o bolas magnéticas (Dynabeads®), evitando de esta forma una posterior co-elución con la proteína de interés.

Para ello, se resuspendieron las Dynabeads® en una solución de BS3 5 mM (bisulfosuccinilimidil suberato; Thermo Scientific) preparada en tampón de conjugación (Tetraborato sódico 0,3 M, ácido bórico 0,1 M, pH 9,0) y durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo Tris HCl 1 M pH 7,5 durante 15 min y realizando un lavado posterior con tampón (tetraborato sódico 0,1 M, ácido bórico 0,1 M, pH 8,0) y finalmente, se almacenó a 4°C hasta su uso.

12.2. Extracción de proteínas e inmunoprecipitación

Las células se lavaron con PBS frío y se fijaron con PFA 1,25 %. Posteriormente se retiró el PFA 1,25 % y se realizaron dos lavados con glicina 1,25 M y 0,1 M. Por último, se lisaron las células añadiendo el tampón de lisis (NP40 1 %, DTT 1mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) y en presencia de los inhibidores de proteasas y fosfatasa.

La inmunoprecipitación de proteínas se realizó usando proteína A (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.), compuesta por gránulos superparamagnéticos uniformes de 2,8 µm con proteína A recombinante (aproximadamente 45 KDa) unida por enlace covalente a la superficie.

Se lavó 3 veces con PBS pH 8,0 en un volumen cuatro veces mayor al volumen de las Dynabeads® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), y la eliminación del sobrenadante se realiza usando el soporte conocido como dynal, DynaMag™ (DynaMag™-2, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway), cuya superficie imantada permite la retención del material unido a las Dynabeads®. Tras esto, se incubó la solución de gránulos magnéticos unidos al anticuerpo específico de la proteína a inmunoprecipitar, en PBS pH 8,0 durante toda la noche a 4 °C en agitación orbital y descrito en el apartado siguiente 12.3.

12.3. Inmunoprecipitación de proteínas

Los extractos proteicos (100 µg) recolectados en tampón de extracción (ver apartado 12.2 de Material y Métodos) se incubaron con 10 µl de *DynabeadsTM protein A* unidas a 2,5 µg de los anticuerpos anti-Calpastatina (ab28252) o anti-CAPN2 (ab39165) a 4 °C en orbital durante toda la noche. A continuación, se extrajeron los sobrenadantes con el dynal (DynaMagTM-2), que es todo aquello que no se ha unido a las beads. Se realizan lavados del inmunoprecipitado con PBS a pH 8 y se añade tampón de carga 2X. La elución se realizó en el termobloque a 70 °C durante 10 minutos. Finalmente, los inmunoprecipitados se detectaron por análisis mediante transferencia tipo *Western Blot* (Ver apartado 9.2 de Material y Métodos).

Las *Dynabeads*® se lavaron y conservaron en tampón de almacenamiento pH 8 (B₄Na₂O₇ x 10 H₂O 0,1 M, H₃BO₃ 0,1M) a 4 °C, para su posterior reutilización 2 veces más.

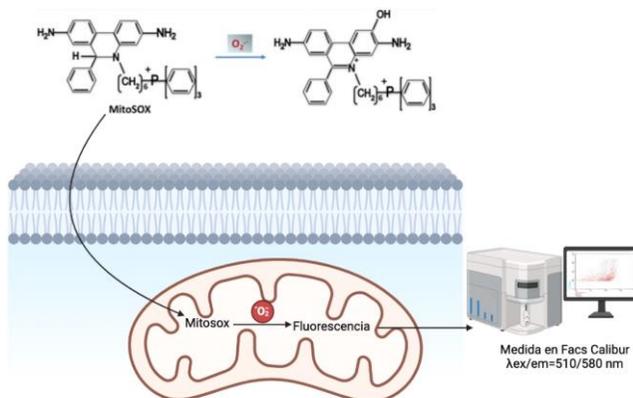
13. ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE HETERODÍMEROS

En el estudio de la formación de posibles heterodímeros entre la subunidad catalítica y reguladora (CAPN2/CCSS1-CSS2) indicadoras de la estabilidad de la calpaína CAPN2, se realizó un protocolo de *crosslinking* descrito en el apartado 12.2 de Material y Métodos. La extracción de muestras se realizó con tampón de extracción que contenía (NP40 1 %, DTT 1mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5). Se analizaron mediante la electrotransferencia tipo Western Blot descrita en el apartado 9.1 y 9.2 de Material y Métodos. Los anticuerpos utilizados para la inmunodetección fueron: para la subunidad

catalítica el anti-CAPN2 (ab39165) y para la subunidad reguladora el anti-CSS1-CSS2 (MA1-34966), descritos en la TABLA 3 del apartado 9.2 de Material y Métodos. Dicho anti-CAPN2 es capaz de reconocer el Dominio III de la subunidad catalítica y que permite identificar todas las estructuras conformacionales de la proteína.

14. ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La determinación de la producción mitocondrial de las especies reactivas de oxígeno se realizó mediante el uso de la sonda comercial MitoSOX[®] Red (Invitrogen[™] Molecular Probes[™], Thermo Fisher Scientific, Ref. M36008 (Sánchez-Morán et al., 2020; Veas-Pérez De Tudela et al., 2015) . Este reactivo, derivado del bromuro de etidio (BrEt), es permeable a las células vivas y contiene un grupo catiónico cuya función es dirigirlo selectivamente a las mitocondrias. Una vez dentro, el indicador MitoSOX[®] se oxida por la acción del superóxido formándose 2-hidroxi-5-(trifenilfosfonio) hexiletidio, tal y como se muestra en el ESQUEMA 18.



ESQUEMA 18. Fundamento de la técnica de análisis de generación de ROS mitocondriales usando la sonda fluorescente (MitoSOX[®]) y posterior análisis por citometría de flujo.

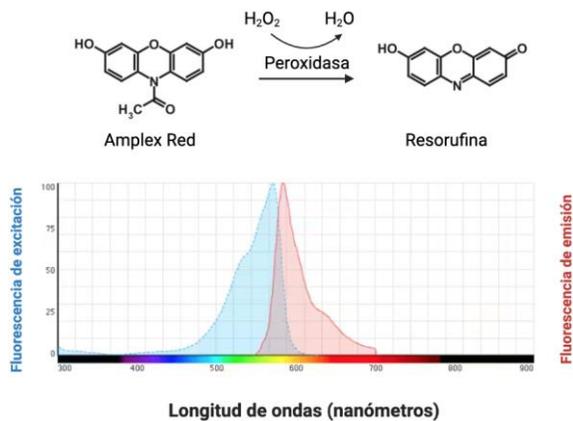
Sin embargo, no se oxida por otras especies de oxígeno y/o nitrógeno. Las modificaciones de su molécula no reducen la capacidad intercalante del BrEt, así la sonda una vez oxidada se une al ADN mitocondrial, facilitando la detección de su fluorescencia (λ_{em} 580 nm) en el interior de la célula.

Para registrar MitoSOX[®] mediante citometría de flujo, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron (5 minutos a 500 x g) tras una tripsinización. En el análisis por citometría se registraron 50.000 eventos para cada triplicado de cada condición en un total de 3 cultivos celulares.

La señal de la sonda MitoSOX[®] se analizó en el canal FL4 del citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un haz laser de argón de 15 mW sintonizando a 510 nm. La adquisición de eventos se obtuvo a través del programa CellQuest[™] y el análisis de los eventos por Paint-A-Gate[™] PRO. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias respecto al valor obtenido tras el tratamiento durante 45 minutos con antimicina A (10 μ M) utilizado como control de generación de especies reactivas de oxígeno.

15. DETECCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE H₂O₂

La determinación de la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en células se detectó mediante el uso de la sonda luminiscente *AmplexRed[™]* (A22188, Invitrogen). Esta sonda (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina) reacciona estequiométricamente (1:1) con peróxido de hidrogeno, y en presencia de peroxidasa de rábano se produce un compuesto oxidado resorufina fluorescente (λ_{exc} 571 nm; λ_{em} 585 nm), como se indica en el ESQUEMA 19.



ESQUEMA 19. **Fundamento metodológico de la técnica de AmplexRed™** basada en la formación de resorufina en presencia de peroxidasa de rábano y H_2O_2 . El diagrama muestra la longitud de onda a la que se recogen los espectros de excitación y emisión.

La determinación de H_2O_2 en neuronas corticales de cultivos primarios se realizó de la siguiente forma: se incubó cada muestra procedente de un precipitado inicial de 10^6 de células en $180 \mu\text{l}$ en tampón Krebs-Ringer fosfato (medio KRPG; NaCl 145 mM, Na_2PO_4 5,7 mM, KCl 4,86 mM, $CaCl_2$ 0,54 mM, $MgSO_4$ 1,22 mM y glucosa 5,5 mM, pH 7,4) y se hicieron 9 alícuotas de $20 \mu\text{l}$ (300.000 células). A continuación, se añadieron $100 \mu\text{l}$ de la mezcla de reacción que contenía la sonda *AmplexRed™* 50 μM y peroxidasa de rábano 0,1 U/ml en medio KRPG. La luminiscencia se registró durante un tiempo total de 2 horas, midiéndose en intervalos de 30 minutos en un espectrofluorímetro *Varioskan Flash* (Thermo Fisher, Vantaa, Finlandia), con una longitud de onda de excitación de 538 nm y de emisión 604 nm. El experimento se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Nunc) y se realizaron 8 medidas para cada condición. La novena alícuota se recogió en $20 \mu\text{l}$ de NaOH 0,1 M con objeto de normalizar las pendientes obtenidas en cada condición, es decir las velocidades de producción de H_2O_2 , se expresaron frente a la concentración de proteínas de cada condición cuantificadas mediante BCA. Paralelamente a las muestras se realizó una recta patrón de concentraciones conocidas 10 μM , 7,5 μM , 5 μM ,

2,5 μM , 1 μM , 0,25 μM) y seriadas de H_2O_2 . Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias o en $\text{pmol/h} \times \mu\text{g}$ de proteína.

16. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

La expresión ectópica de *CAPN2* se realizó utilizando el plásmido comercial p3XFlag-CAPN2 (Addgene plasmid # 60942; <http://n2t.net/addgene:60942>; RRID: Addgene_60942) y se incorporó a las neuronas mediante la técnica de la transfección. El plásmido permite expresar la fracción catalítica de la proteína CAPN2 fusionada en el C terminal con la proteína 3XFlag y bajo el promotor de expresión constitutiva de citomegalovirus. La etiqueta 3XFlag permite distinguir la localización celular de la proteína de una forma más sensible que las etiquetas Flag convencionales, ya que posee 3 secuencias Flag repetidas en tándem.

16.1. Construcción del plásmido 3Xflag-Vacío

La construcción del plásmido vacío se realizó a partir del plásmido comercial p3XFlag-CAPN2, utilizando la enzima BgIII (ER0082, Thermofisher Scientific), que permitió obtener un péptido truncado de CAPN2 obteniéndose un producto final de 262 aminoácidos, y de 30 KDa de tamaño.

	Bactotripton (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	NaCl (g/L)	Agar (g/L)
LB	10	5	10	-
LB-Agar	10	5	10	20

TABLA 7. Composición de los medios de cultivos empleados para el crecimiento de *E. coli* DH-5 α .

La extracción y la purificación de los plásmidos amplificados en las bacterias previamente mencionadas, se llevó a cabo mediante el sistema *Wizard Plus Midipreps* de Promega (Madison, Wisconsin, EE. UU.). La purificación del ADN en geles de agarosa (Sigma-Aldrich), se realizó mediante el uso de un kit comercial (GenElute, Sigma-Aldrich).

16.3. Expresión ectópica mediante transfecciones celulares

Las células de las líneas celulares humanas procedentes del neuroblastoma SHY5Y y de riñón embrionario HEK-293T, se transfectaron 24 horas antes de los análisis de la sobreexpresión mediante inmunocitoquímica y transferencia tipo *Western blot*.

La transfección se realizó utilizando el reactivo catiónico *Lipofectamina LTX Plus Reagent™* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, EE. UU.), al que se le añadió el plásmido p3XFlag-CAPN2 comercial, a una concentración final de 1,5 $\mu\text{g}/10^6$ células. Paralelamente, se transfectaron las líneas celulares con el plásmido control o vacío (3XFlag) realizado a partir del plásmido p3XFlag-CAPN2 comercial en el laboratorio, tal y como se describió en el apartado 16.3 de Material y Métodos. La transfección se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La Lipofectamina® se diluyó en el medio Opti-MEM® y se prepararon diluciones del plásmido control y del plásmido de expresión

ectópica de CAPN2. Ambas soluciones se mezclaron en proporción 1:1 y se incubaron 5 minutos, facilitando la formación de los liposomas que contendrán el ADN plasmídico en su interior.

Finalmente, el complejo plásmido-Lipofectamina® se añadió al cultivo. La expresión se verificó mediante transferencia tipo *Western Blot*.

16.4. Mantenimiento de las líneas celulares HEK-293T y SHSY5Y

Las HEK-293T son una línea celular inmortalizada específica derivada de células renales embrionarias humanas (HEK; *human embryonic kidney*) que se cultivan en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma) suplementado con suero fetal a una concentración final del 10 % [v/v]. Los cultivos se mantuvieron mediante subcultivos a una proporción 1:3 cada 2 o 3 días. Para los experimentos de silenciamiento y sobreexpresión, la resiembra de las células se realizó en placas de poliestireno, tratadas previamente con PDL a una densidad de 10^5 células/cm².

Las SHY5Y son una línea celular inmortalizada específica de un neuroblastoma humano que se cultivan en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma) suplementado con suero fetal a una concentración final del 10 % [v/v] previamente inactivado a 55°C durante 1 hora. Los cultivos se mantuvieron mediante subcultivos a una proporción 1:3 cada 2 o 3 días. Para los experimentos de sobreexpresión, las células se sembraron en placas de poliestireno, tratadas previamente con colágeno a una densidad de 10^5 células/cm².

17. PREDICCIÓN IN SILICO DE SECUENCIAS NLS

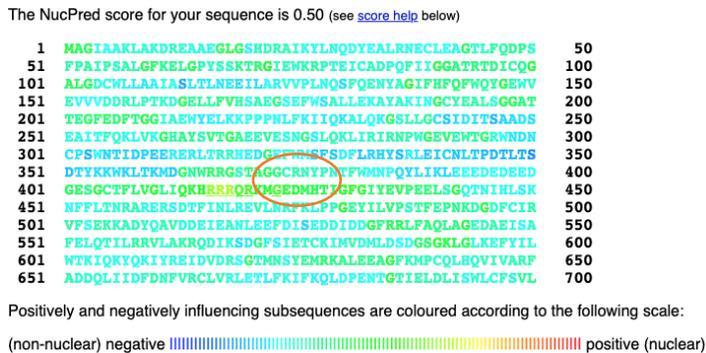
Con objeto identificar posibles secuencias de localización nuclear (NLS) utilizamos la base de datos Eucaryotic Linear Motif (ELM; <http://elm.eu.org/>).

Esta herramienta contenía información sobre secuencia de exportación nuclear (NES) descrita sólo en CAPN2, tal y como se muestran en el ESQUEMA 21.

TRG_NES_CRM1_1	DEIEANLEEFDISEDD EIEANLEEFDISEDD	514-529 [A] 515-529 [A]	514- 529 515- 529
----------------	-------------------------------------	----------------------------------	----------------------------

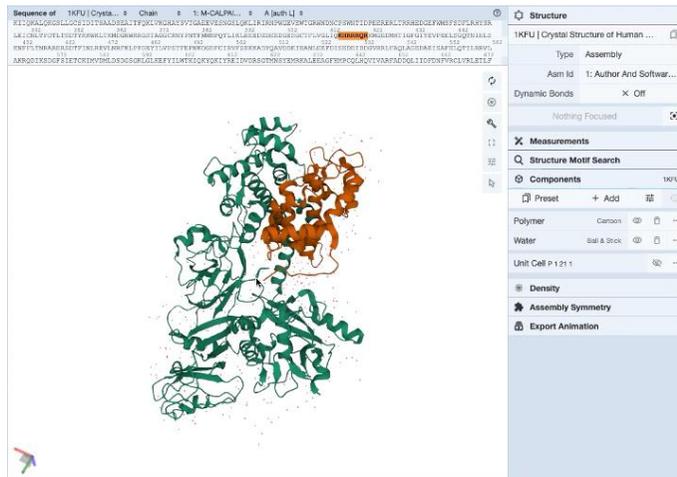
ESQUEMA 21. Algunas proteínas exportadas del núcleo contienen una señal de exportación nuclear (NES) rica en glicina con especificidad de interacción a la proteína exportada CRM1.

La predicción de la secuencia NLS se realizó utilizando una herramienta predictiva conocida como NucPred (<https://nucpred.bioinfo.se/nucpred/>) describiendo un score indicativo de predicción (Ver ESQUEMA 22).



ESQUEMA 22. Secuencia de CAPN2 donde se identifican posibles sitios de localización nuclear (NLS). Se indica en un círculo rojo la posible secuencia de localización nuclear.

La localización tridimensional de la posible secuencia NLS se analizó mediante una herramienta bioinformática proveniente de la base de datos Proteina Data Base (PDB; <https://www.rcsb.org/>), en concreto Ligand Explorer (ver ESQUEMA 23).



ESQUEMA 23. Estructura tridimensional de la m-calpaína en humano analizada mediante la herramienta Ligand Explorer.

Para analizar si esta secuencia se conserva en distintas especies y en la isoforma de la calpaína CAPN1, se utilizó la herramienta de alineamiento “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó de la siguiente manera: Los resultados obtenidos en el modelo in vivo se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (S.E.M.) de 3-5 animales por condición.

Los resultados obtenidos en los cultivos de neuronas corticales de ratón, se expresaron como la media \pm S.E.M. procedentes de 3-5 cultivos independientes.

La significatividad estadística se evaluó utilizando la prueba de la t de Student (para comparar dos únicos grupos de valores). El test de ANOVA de una sola vía se utilizó en el caso de comparaciones entre 4 grupos diferentes de valores.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ en todos los casos, indicando en cada pie de figura específico las significatividades (p.e) *respecto Normoxia o #respecto isquemia/reoxigenación). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 9.5.1 (528) (Universidad de Oxford).

RESULTADOS

1. EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA ESTABILIZACIÓN DE LAS CALPAÍNAS Y SU ACTIVIDAD, LO QUE REDUCE LA LESIÓN CEREBRAL TRAS LA ISQUEMIA

El cerebro es un órgano que requiere un aporte constante de oxígeno y de glucosa para el correcto funcionamiento y generación de energía que le permita mantener el potencial sináptico neuronal (Mergenthaler et al., 2013). Un transporte incorrecto de estos componentes, como consecuencia por ejemplo en la alteración del flujo sanguíneo cerebral durante la isquemia, puede provocar si se mantiene en el tiempo un daño irreversible y la muerte neuronal (Bolaños, 2016; Mergenthaler et al., 2013).

En este mismo contexto, en los últimos años y gracias a numerosos estudios, se ha demostrado la existencia del fenómeno de tolerancia o resistencia inducido por estímulos subtóxicos capaces de generar la protección del tejido en respuesta a un daño isquémico subsiguiente (Easton et al., 2009; Tomai et al., 1999). En el cerebro, los estudios indican que éste fenómeno neuroprotector, se produce como consecuencia de la activación de mecanismos adaptativos endógenos inducidos tras la exposición previa de un estímulo de baja intensidad o preconditionamiento (PC) (Gidday, 2006)(Kirino, 2002; Stenzel-Poore, Stevens, King, & Simon, 2007; Wang et al., 2015), lo que se acompaña de una reducción del volumen de infarto cerebral inducido por el daño isquémico (Vecino et al., 2018; Zhao et al., 2022). Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares que median la tolerancia isquémica asociada al preconditionamiento. Por lo tanto, el desarrollo de un modelo de IPC robusto constituye una herramienta experimental eficaz para el estudio de

los mecanismos moleculares implicados en la respuesta de protección endógena del cerebro frente a diferentes daños como son la isquemia (Dirnagl et al., 2009; Stetler et al., 2008).

En primer lugar, con objeto de estudiar la posible función in vivo que tienen las calpaínas en la tolerancia isquémica mediada por IPC frente al daño isquémico y por lo tanto comprobar su posible relevancia fisiológica. Realizamos un modelo de preconditionamiento isquémico en cerebro de ratón validado y basado en la cirugía de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO), y que a una mayor duración de la oclusión también es ampliamente utilizado como modelo de daño isquémico cerebral focal (Koizumi et al., 1986; Longa et al., 1989; Masada et al., 2001).

1.1. El preconditionamiento reduce el tamaño de infarto cerebral inducido tras la isquemia

En primer lugar y con objeto de corroborar el efecto neuroprotector del IPC en cerebro, se realizó el procedimiento quirúrgico basado en la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) durante 6 minutos y posterior reoxigenación de 24 horas, previo al daño isquémico de 45 minutos de oclusión (IPC+tMCAO). Tal y como se describió en el apartado 1 de Material y Métodos, los cuatro grupos de animales experimentales fueron: 1) los animales control SHAM+SHAM, 2) los animales preconditionados sin daño posterior (IPC+SHAM), o 2) con daño isquémico posterior (IPC+tMCAO) y los animales con daño isquémico, pero sin IPC (SHAM+tMCAO). Tras 1 o 2,5 días de reperusión tras la isquemia, se realizaron cortes en sección coronal de 2 mm de espesor que se tiñeron con sal de tetrazolio (TTC) con el fin de determinar el volumen de infarto cerebral (Bederson et al. 1986). En la FIGURA 1 se muestra la tinción con TTC de las secciones de cerebro de animales

precondicionados (IPC+tMCAO) y no preconditionados tras la isquemia (SHAM+tMCAO). En la misma FIGURA 1 se muestran los resultados de las cuantificaciones comparando la zona contralateral (CL o zona control sin daño) con la zona ipsilateral (IL o zona con daño o infarto). Estos resultados muestran que en la zona IL, de los animales preconditionados se reduce el volumen de infarto cerebral, tal y como se observa en los valores corregidos por edema como en los porcentajes y que se inducen tras la isquemia y en comparación con la zona control (CL), desde 1 día de reperusión. El efecto de reducción de la lesión isquémica se mantuvo a los 2,5 días de la reperusión tal y como se observa en la FIGURA 1, tanto en la corteza cerebral como en el estriado, principales áreas que se afectaron tras el procedimiento quirúrgico de la isquemia (tMCAO).

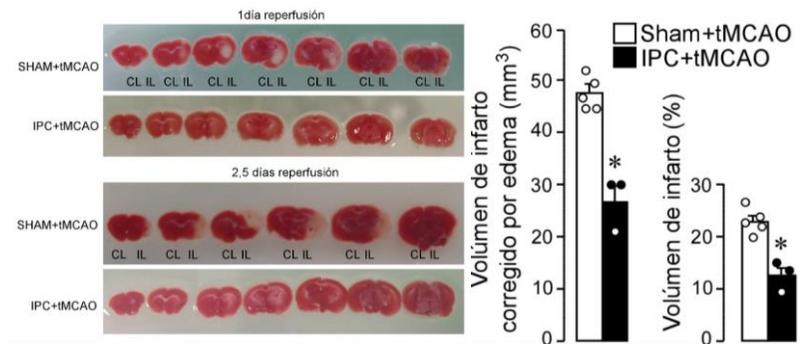


FIGURA 1. Secciones coronales del cerebro de ratones sometidos a isquemia sin preconditionamiento (SHAM+tMCAO) y ratones con preconditionamiento previo al daño isquémico (IPC+tMCAO). Tras 1 y 2,5 días de reperusión respectivamente. Las imágenes muestran la tinción con TTC (izq) con objeto de cuantificar el volumen de infarto (dcha). * $p < 0,05$ respecto a los animales isquémicos sham+tMCAO.

1.2. El preconditionamiento promueve la desestabilización de las calpaínas CAPN1 y CAPN2 y previene el aumento en su actividad en respuesta a la isquemia

Una vez comprobado que el IPC previene in vivo el aumento en el volumen de infarto y por lo tanto protege al cerebro de ratón del daño isquémico (ver FIGURA 1 del apartado 1.1 de Resultados). A continuación, quisimos analizar el papel que tienen las calpaínas durante la tolerancia cerebral asociada al IPC y en respuesta a la isquemia. Para ello, se extrajeron los hemisferios corticales, previamente divididos en zona contralateral (CL o zona control sin daño) y zona ipsilateral (IL o zona con daño o infarto). Se obtuvieron los extractos de proteínas de cerebro, recogidos y se cuantificaron las concentraciones tal y como se indicó en el apartado 9.1 de Material y Métodos, respectivamente.

A continuación, con los extractos de proteínas se analizaron los niveles de expresión de las proteínas de interés mediante transferencia tipo *Western Blot* (ver 9.1 y 9.2 de Material y Métodos).

En primer lugar, comparamos la expresión de ambas isoformas, CAPN1 y CAPN2 en los animales con daño (tMCAO) frente a los controles sin daño (SHAM). En la FIGURA 2, los resultados obtenidos muestran que, tras 24 horas de reperusión, la isquemia induce, en la zona IL, el aumento en los niveles de expresión de la isoforma CAPN2 y CAPN1, respecto a la zona CL y en comparación a los animales control sin daño (SHAM).

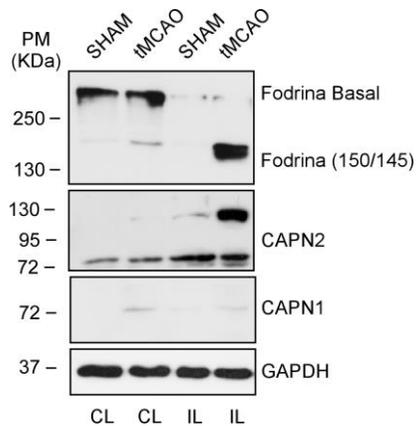


FIGURA 2. Niveles de expresión de CAPN1 y CAPN2 y de la proteólisis de fodrina; fragmentos (150/145), como marcador de la actividad de las calpaínas. Muestras de tejido cerebral de ratones control (SHAM) y ratones tras reperusión de 24 h después de la cirugía de isquemia (tMCAO). Muestras analizadas mediante transferencia tipo Western Blot.

Junto a la expresión de ambas isoformas de las calpaínas, analizamos la proteólisis de fodrina (FIGURA 2), y en concreto la aparición de los fragmentos (150/145), como marcador específico de la proteólisis de esta proteína mediado por la actividad de las calpaínas (Siman et al., 1984), tal y como se describe en el apartado 5.5.2.1 de la Introducción. Tras 24 h de reperusión, los resultados obtenidos muestran como los animales sometidos a la isquemia (tMCAO) presentan en la zona IL un aumento en los fragmentos 150/145 de fodrina frente a la zona CL y respecto al control sin daño (SHAM), lo que demuestra un aumento en la actividad de las calpaínas en estos animales.

A continuación, quisimos investigar in vivo, la posible función de las calpaínas durante el IPC y en respuesta a la isquemia.

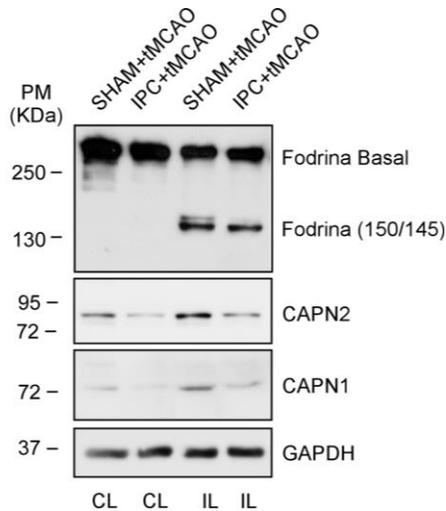


FIGURA 3. Análisis de los niveles de la expresión y de la actividad de las calpaínas. Muestras de tejido cerebral de ratones sometidos a un modelo de isquemia, sin preconditionamiento (SHAM+tMCAO) o con preconditionamiento previo (IPC+tMCAO) al daño isquémico. Muestras analizadas mediante transferencia tipo Western Blot.

Como se muestra en la FIGURA 3, los animales preconditionados presentaban en la zona IL, niveles de expresión y de actividad de CAPN1 y CAPN2 inferiores respecto a los animales no preconditionados (SHAM+tMCAO), en respuesta a 24 h de perfusión tras la isquemia y en comparación con los niveles observados en la zona CL del mismo animal.

Tras analizar los fragmentos (150/145) de fodrina generados por las calpaínas a los 2,5 días de perfusión, se observó en la FIGURA 4, que la proteólisis de fodrina, y por lo tanto la actividad de las calpaínas aumentó, respecto a 1 día de perfusión en los animales con daño isquémico (SHAM+tMCAO). Sin embargo, en los animales preconditionados la actividad de las calpaínas se mantuvo reducida tras los 2,5 días de perfusión después de la isquemia

(IPC+tMCAO), resultados que concuerdan con los obtenidos en el análisis de volumen de la lesión mostrados en la FIGURA 1.

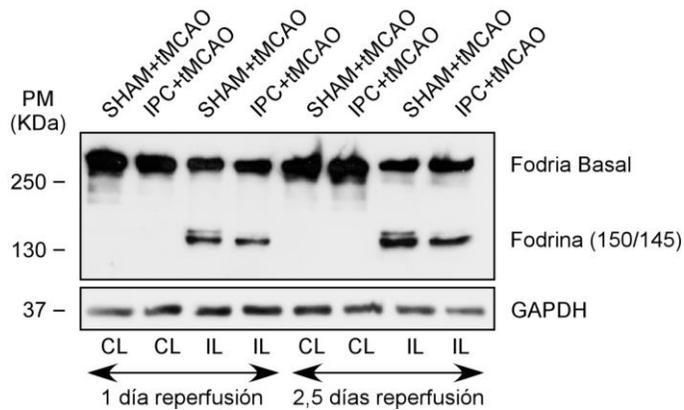


FIGURA 4. La actividad de las calpaínas mediante el análisis de la proteólisis de fodrina (fragmentos 159/145) a 1 y 2,5 días de reperusión. Muestras de tejido cerebral analizadas mediante transferencia tipo Western blot procedentes de ratones de ratones sometidos a un modelo de isquemia, sin preconditionamiento (SHAM+tMCAO) o con preconditionamiento (IPC+tMCAO).

Todos estos resultados ponen de manifiesto la relevancia fisiológica de la actividad de las calpaínas en la resistencia cerebral mediada por el preconditionamiento y en respuesta al daño de isquemia/reperusión.

2. EL PRECONDICIONAMIENTO PROMUEVE LA TOLERANCIA NEURONAL, A TRAVÉS DE LA DESESTABILIZACIÓN DE LAS CALPAÍNAS, EN RESPUESTA AL DAÑO ISQUÉMICO

En trabajos previos, se ha demostrado el efecto neuroprotector del preconditionamiento en respuesta a la isquemia, tanto en un modelo farmacológico con tratamiento subtóxico de los receptores NMDA de glutamato (Gidday, 2010; Lai et al., 2014; Severino et al., 2011; Vecino et al., 2018), como en un modelo de preconditionamiento isquémico (Barrio et al., 2021).

Una vez comprobamos en el tejido cerebral la función protectora del preconditionamiento isquémico y la relevancia fisiológica de la función de las calpaínas en la tolerancia frente al daño isquémico (Sección 1 de Resultados; FIGURAS 1, 2 y 3), quisimos investigar el posible mecanismo implicado en la función de las calpaínas durante la neuroprotección y la tolerancia mediada por el preconditionamiento.

Al inicio del desarrollo de la presente Tesis Doctoral pusimos a punto un modelo más fisiológico de preconditionamiento y de isquemia experimental en cultivo de neuronas corticales de ratón. Para ello, utilizamos un incubador de hipoxia RUSKINN in vivo que permite controlar y mantener las concentraciones de O₂ inferiores al 1 %, tal y como se explicó en la Sección 3 de Material y Métodos. Tras 8-9 DIV las neuronas corticales en cultivo primario se sometieron a los protocolos de isquemia y de preconditionamiento isquémico experimentales y se realizaron los análisis que se describen a continuación.

2.1. El IPC previene la muerte neuronal por apoptosis inducida tras la isquemia experimental, promoviendo la neuroprotección

En los trabajos previos basados en la isquemia y en el preconditionamiento experimentales y realizados por el grupo, se utilizó un incubador de la empresa Thermofisher, el cual permitía monitorizar los porcentajes de oxígeno al 1 % y de dióxido de carbono al 5 % (Almeida et al., 2002; Barrio et al., 2021). En este trabajo, hemos puesto a punto un modelo experimental utilizando un incubador “RUSKINN in vivo 400” cuya diferencia fundamental, respecto al incubador anterior, es el sellado de la cámara, lo que permite mantener y controlar los porcentajes de O₂ y CO₂ durante toda la duración del experimento, es decir, desde el momento en el que se introducen las células hasta que finaliza el tiempo de isquemia.

En este sentido, utilizamos tal y como hemos descrito con anterioridad en el apartado 3 de Material y Métodos, a los 8-9 días en cultivo, las neuronas se sometieron a un modelo de preconditionamiento basado en la aplicación de un estímulo isquémico de una duración corta de 5 minutos (ESQUEMA 11 de Material y Métodos). Tras 2 horas de reoxigenación, las neuronas preconditionadas se sometieron a un daño de isquemia experimental de 30 minutos seguidas de 4 horas de reoxigenación (IPC+OGD/R).

Con el objetivo de comprobar el posible efecto neuroprotector frente a la isquemia del modelo de IPC puesto a punto, se determinó la apoptosis neuronal utilizando el kit de BD Anexina/7ADD y posterior análisis por citometría de flujo, tal y como se explicó en el apartado 4 de Material y Métodos. En la Tesis se usó el incubador “RUSKINN in vivo 400” y se comparó con el incubador convencional de Thermo. A diferencia del incubador convencional, el incubador de hipoxia RUSKINN permitió mantener el

porcentaje de oxígeno y CO₂ deseado desde el momento en el que se introducen las células. Como se muestra en la FIGURA 5, y tras comparar los resultados obtenidos en el incubador “Thermo” y el incubador “RUSKINN”, los resultados muestran un efecto similar a diferentes tiempos de incubación. No obstante, se redujeron los tiempos de incubación en el incubador RUSKINN respecto al incubador convencional. Así, un tiempo de 90 min fue capaz de inducir la muerte neuronal por apoptosis o daño isquémico (OGD/R) en el incubador THERMO, pero en el de RUSKINN fue tan solo de 30 min. En ambas incubaciones, se observó en las neuronas OGD/R, un aumento proporcional similar en los niveles de la muerte neuronal por apoptosis frente a la condición control (Normoxia; Nx). Además, en ambos casos, en las neuronas preconditionadas (IPC+OGD/R) se observaron porcentajes cercanos a la condición de Nx, y se previno el aumento en la muerte neuronal por apoptosis inducida tras la isquemia experimental.

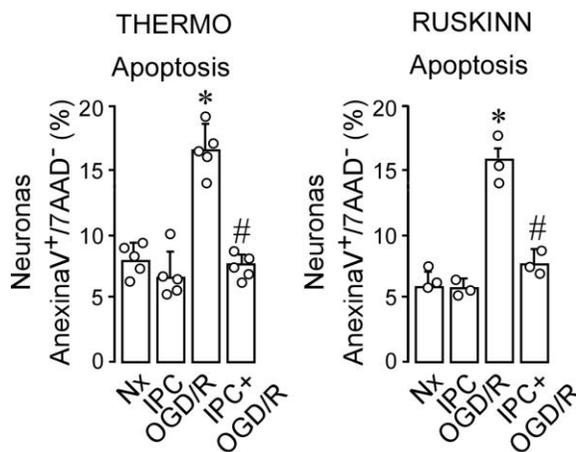


FIGURA 5. **Análisis de la muerte neuronal por apoptosis** mediante el kit de BD (AnnexinaV/7AAD) y posterior análisis por citometría de flujo, realizados en neuronas a 8-9 DIV y en las cuatro condiciones estudiadas (Nx, IPC, OGD/R y IPC+OGD). Resultados obtenidos de las medias de 3-5 cultivos diferentes. t-Student* $p < 0,05$ respecto a Nx y # respecto OGD/R.

Con objeto de comprobar estos resultados utilizamos otro parámetro de muerte neuronal por apoptosis. Para ello, se analizó mediante fluorimetría, la actividad de la caspasa-3, proteasa y efector final de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis neuronal (Elmore, 2007), tal y como se explicó en el apartado 5 de Material y Métodos. De este modo, pudimos comprobar que la isquemia experimental (OGD/R) indujo la activación de la caspasa 3 y que el IPC previno su activación de la caspasa-3 inducida a las 4 horas de reoxigenación y después de la isquemia (IPC+OGD/R) (Ver FIGURA 6), lo que confirmó los resultados obtenidos en los análisis de citometría de flujo (FIGURA 5).

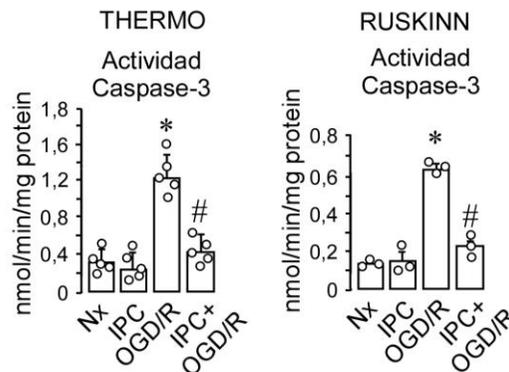


FIGURA 6. Actividad de la caspasa-3 analizada por fluorimetría en las neuronas a 8-9 DIV y en las distintas condiciones. Comparación entre los dos incubadores utilizados en la isquemia y preconditionamiento experimental, Thermo y RUSKINN. *t-Student** $p < 0,05$ respecto a Nx y # respecto OGD/R.

En resumen, los resultados obtenidos fueron similares utilizando ambos tipos de incubadores (Thermo y RUSKINN) tal y como se muestra en la FIGURA 5 y 6. Sin embargo, con objeto de realizar un modelo con tiempos de incubación más reducidos y un modelo de isquemia y preconditionamiento más fisiológico, todos los experimentos posteriores se realizaron utilizando el incubador de hipoxia RUSKINN.

Todos estos resultados demuestran la función neuroprotectora del modelo de preconditionamiento utilizado en respuesta al daño isquémico.

2.2. El IPC induce la desestabilización de las calpaínas en respuesta a la isquemia experimental

Tal y como se mencionó en los apartados 2 y 5.3 de la Introducción, entre las proteínas clave del proceso de apoptosis neuronal inducido por la cascada isquémica, la activación de las calpaínas juega una función esencial. Incluso se ha demostrado que la activación de estas proteasas está implicada en el desarrollo de numerosas alteraciones que afectan al cerebro, entre ellas las enfermedades neurodegenerativas y los procesos patológicos como es la isquemia (Takeda et al., 1991; J. J. Weber et al., 2018; Wright & Vissel, 2016). Las calpaínas se activan y se acumulan en situaciones de daño neuronal como la excitotoxicidad o la isquemia cerebral y la implicación de estas proteasas, dependientes de calcio, en la célula es entre otras la modulación de la función biológica a su vez de otras proteínas a través de su reconocimiento y su escisión posterior (Goll et al., 2003). De hecho, se sabe que las estrategias de inhibición de las calpaínas confieren resistencia frente al daño isquémico (J. J. Weber et al., 2019a).

Por ello, una vez establecido un modelo de preconditionamiento isquémico experimental capaz de prevenir la muerte por apoptosis e inducir la tolerancia isquémica neuronal en respuesta al daño isquémico (FIGURAS 5 y 6), decidimos estudiar en nuestras condiciones experimentales, los posibles cambios en la expresión de las dos isoformas principales de calpaínas en el cerebro, CAPN1 y CAPN2.

2.2.1. El IPC y la isquemia no inducen cambios significativos en los niveles de ARN mensajero de CAPN1 y CAPN2

Primero, analizamos los niveles de ARN mensajeros de CAPN1 y CAPN2 mediante q-RT-PCR, en las neuronas a 8-9 DIV y en las 4 condiciones experimentales (Nx, IPC, OGD/R e IPC+OGD/R) y descritas en el apartado 3 de Material y Métodos (ESQUEMA 13).

Así, tras las 4 horas de reoxigenación los resultados muestran que ninguna de las condiciones produjo cambios significativos en los niveles de ARN mensajero de ambas isoformas (FIGURA 7).

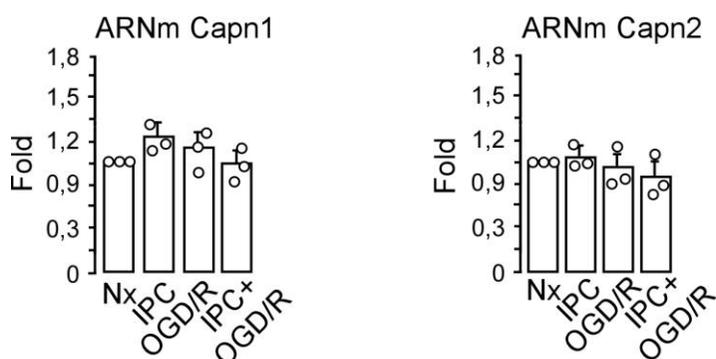


FIGURA 7. Niveles de ARN mensajero de CAPN1 y CAPN2 analizados mediante qRT-PCR en las distintas condiciones experimentales Nx, IPC, OGD/R e IPC/OGD/R. Media de 3 cultivos distintos.

A la vista de estos resultados nos planteamos analizar los niveles de expresión de ambas proteínas CAPN1 y CAPN2. Tal y como se observa en la FIGURA 8, tras el análisis de transferencia tipo *Western Blot*, en los extractos de neuronas precondicionadas (IPC+OGD/R) se previno el aumento en la expresión de CAPN1 y CAPN2 inducida tras 4 horas de reoxigenación después de la isquemia.

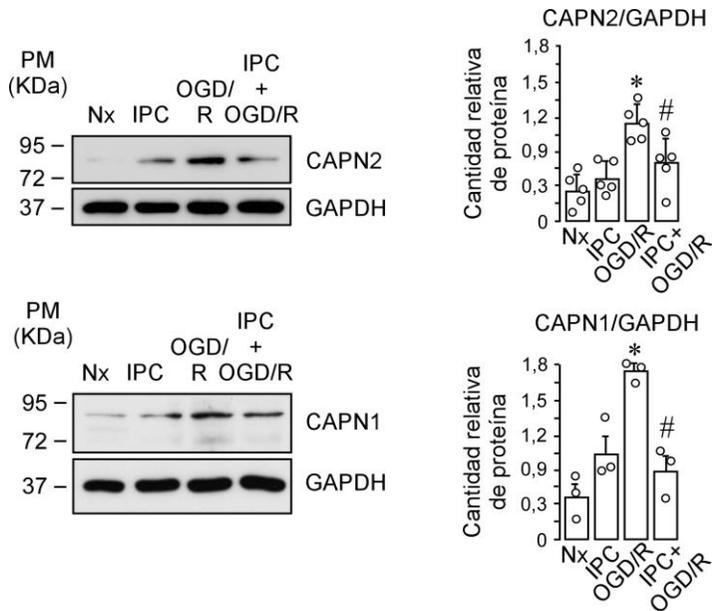


FIGURA 8. Niveles de expresión de las proteínas CAPN1 y CAPN2 en las distintas condiciones. Las gráficas de cuantificación de cada proteína (dcha). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía de un total de 3-5 cultivos diferentes. * $p < 0,05$ respecto a Nx y # respecto OGD/R.

2.2.2. El IPC previene la formación del heterodímero CAPN2/CSS1-CSS2 y promueve su desestabilización en respuesta a la isquemia

En la Introducción se describió en el apartado 5.1.2. que la subunidad reguladora de las calpaínas CAPN1 y CAPN2, interviene en su activación, a través de la formación heterodimérica con la subunidad catalítica. Por lo tanto, lo que hicimos fue analizar la posible formación de heterodímeros

CAPN2/CSS1-CSS2, mediante un método de extracción basado en el *crosslinking* y explicado en el apartado 13 de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la FIGURA 9, donde se observa que la formación de heterodímeros ocurre mayoritariamente durante la isquemia (OGD/R) y que estos se previenen en las neuronas preconditionadas.

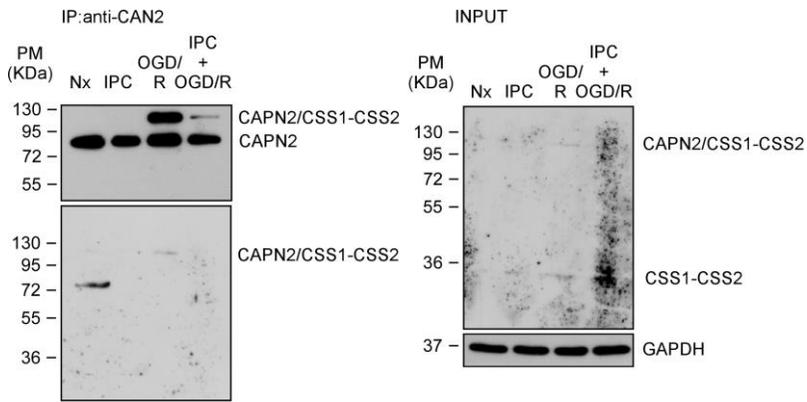


FIGURA 9. Formación de heterodímeros CAPN2/CSS1/2 en las distintas condiciones Nx, IPC; OGD/R e IPC+OGD/R. inmunoprecipitación con anti-CAPN2 de rabbit y análisis posterior con anti-CSS1-CSS2 y anti-CAPN2 (izq). Input con anti-CSS1-CSS2 (dcha).

Todos estos resultados ponen de manifiesto que, en las neuronas corticales, el preconditionamiento promueve la desestabilización de CAPN1 y CAPN2, debido a que previene la formación de los heterodímeros, pero sin promover cambios en los niveles de ARNm tras las 4 h de reoxigenación después de la isquemia.

3. EL IPC PREVIENE LA ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS NEURONALES INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA EXPERIMENTAL

Existen estudios que demuestran la existencia de una relación clara entre el aumento en la actividad de las calpaínas y la degeneración neuronal (Inserte et al., 2004). Esta relación se ha demostrado que se debe, al menos en parte, a la inducción de la cascada de muerte por apoptosis, a través de diferentes mecanismos que incluyen la activación de proteínas efectoras de muerte neuronal como lo son las caspasas y las calpaínas (K. K. W. Wang et al., 1998). En su conjunto estas proteasas, están implicadas en la desestabilización mitocondrial promoviendo la liberación del citocromo C (Chang et al., 2015), en la pérdida de la función biológica de proteínas implicadas en el mantenimiento del citoesquelético neuronal, como es la fodrina (Siman et al., 1984).

Tal y como muestran los resultados previos, el IPC previno la estabilización inducida tras la isquemia/reoxigenación, de las isoformas CAPN1 y CAPN2 (FIGURA 8), lo que se acompañó de la inhibición de la muerte neuronal por apoptosis (FIGURA 5) y de la caspasa-3 (FIGURA 6) inducidas tras la isquemia/reoxigenación. Con objeto de evaluar si el IPC produce cambios en la actividad de las calpaínas, analizamos la proteólisis de fodrina, como marcador de dicha actividad, a través del análisis mediante transferencia western blot de los fragmentos 150/145 específicos de la actividad de estas proteasas (Introducción apartado 5.5.2.1).

Así, las neuronas corticales en cultivo primario 8-9 DIV se incubaron a distintos tiempos de isquemia sin reoxigenación o tras 4 h de reoxigenación y se analizó la aparición de los fragmentos 150/145 de α -fodrina.

Los resultados obtenidos muestran en la FIGURA 10, un aumento en la aparición de los fragmentos 150/145 de fodrina, de forma tiempo-dependiente de ischemia/reoxigenación acompañada de una disminución en los niveles basales de la proteína. En concreto, la mayor actividad se observó a los 30 minutos de OGD y tras 4 horas de reoxigenación. Estos mismos tiempos se correlacionan con los utilizados durante la puesta a punto del modelo (FIGURA 5 y 6). Por lo tanto, elegimos estos tiempos de ischemia y reoxigenación como la condición de daño experimental de ischemia (OGD/R) en los experimentos posteriores.

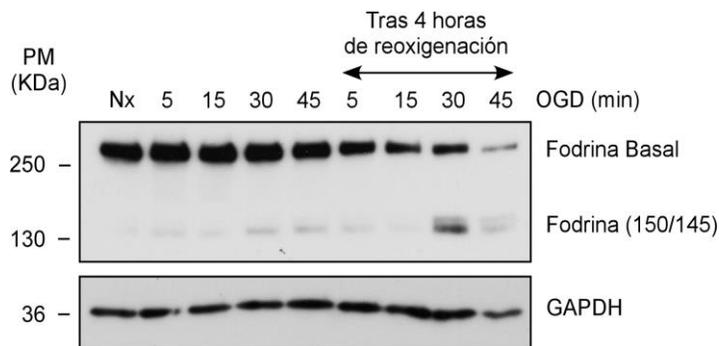


FIGURA 10. Actividad de las calpaínas neuronales tras análisis Western Blot. Análisis de la proteólisis de la α -fodrina, mediante aparición de los fragmentos específicos 150/145.

Además, decidimos analizar los niveles de ARN mensajero de la diana molecular de calpaínas, la α -fodrina, mediante qRT-PCR (apartado 6.2 de Material y Métodos) en las 4 condiciones experimentales.

Como se muestra en la FIGURA 11, no se observaron cambios significativos en los niveles de ARN mensajero de fodrina en las distintas condiciones estudiadas.

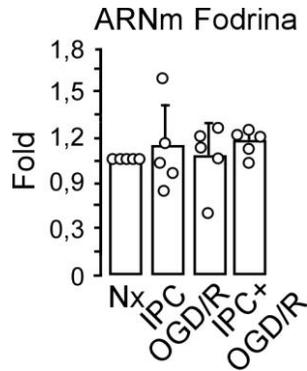


FIGURA 11. Niveles de ARN mensajero de fodrina en las distintas condiciones mediante qRT-PCR. Media de 5 cultivos distintos.

Por lo tanto, el siguiente objetivo fue analizar en las neuronas 8-9 DIV, la actividad de las calpaínas durante las condiciones de Nx, IPC, OGD/R e IPC+OGD/R.

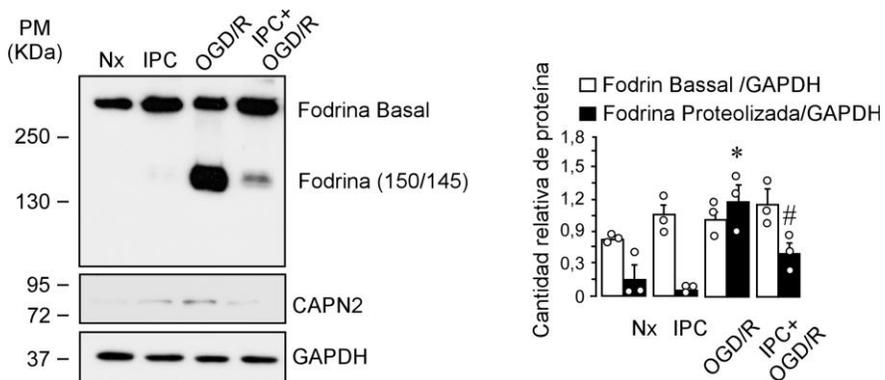


FIGURA 12. Análisis de la actividad de las calpaínas en neuronas 8-9 DIV sometidas a las 4 condiciones de estudio, mediante Western Blot. La cuantificación se muestra en la gráfica de la derecha * $p < 0,05$ respecto a Nx y # respecto a OGD/R, de un total de 3-4 cultivos.

Como se muestra en la FIGURA 12, tras el análisis de los extractos proteicos mediante transferencia tipo *Western Blot*, observamos que el IPC produjo la desestabilización de CAPN2 y redujo la aparición de los fragmentos proteolizados 150/145 de la fodrina, es decir previno la proteólisis de fodrina mediada por las calpaínas inducida tras la OGD/R.

Por lo tanto, este resultado demuestra que el IPC previene la actividad de las calpaínas, lo que al menos en parte ayudaría a mantener la integridad citoesquelética neuronal tras el daño de isquemia/reoxigenación.

Otra de las dianas específicas de las calpaínas que nos permitió estudiar la actividad de las calpaínas, fue la proteína p35, molécula que se proteoliza en presencia de calpaínas dando lugar a una proteína de 25 KDa, p25. Dichos fragmentos han demostrado ser tóxicos para la célula ya que produce la formación del complejo Cdk5-p25, como se ha descrito en el apartado 10.1 de la introducción (Iadecola, 2016). Los resultados obtenidos fueron similares a los de fodrina (resultados no mostrados).

3.1. El silenciamiento génico de CAPN2 mimetiza la neuroprotección del preconditionamiento en respuesta al daño isquémico

Una vez demostrado que el IPC previene la estabilización y la activación de las calpaínas inducidas tras la isquemia/reoxigenación. A continuación, utilizamos la técnica de silenciamiento génico o ARN de interferencia (ARNi), con objeto de disminuir la expresión en ambas isoformas de las calpaínas. Para ello utilizamos siCAPN1 y siCAPN2, secuencias indicadas en la TABLA 6 de Material y Métodos.

Primero fue necesario comprobar que los ARNi eran funcionales y analizamos la eficiencia de silenciamiento mediante qRT-PCR (apartado 6.2 de Material y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la FIGURA 13, las neuronas de 6 DIV se transfectaron con *Lipofectamina RNAiMAX™* (Sección 11.1 de Material y Métodos) y a los 3 días post-transfección (DPT) se realizaron las incubaciones en las distintas condiciones de estudio experimentales.

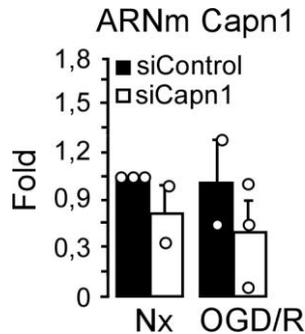


FIGURA 13. Niveles de ARN mensajero de CAPN1 mediante silenciamiento génico y empleo de siControl y siCAPN1 durante una OGD/R y en condiciones de Normoxia (Nx) y posterior análisis mediante qRT-PCR. Media de 2-3 cultivos distintos.

En las FIGURA 13 y 14 se muestra que en las neuronas transfectadas a los 6 DIV y tras 3DPT sometidas a OGD/R, el siCAPN1 o siCAPN2 redujeron en un 35-40 % los niveles de ARNm de ambas proteínas.

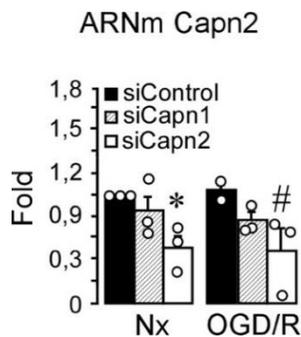


FIGURA 14. Niveles de ARN mensajero de CAPN2, en las neuronas 6DIV transfectadas mediante RNA de interferencia con siControl y si CAPN2 y sometidas 3DPT a OGD/R y Nx. * $p < 0,05$ respecto a siControl en Nx y # respecto a siControl en OGD/R, de un total de 2-3 cultivos diferentes.

En la FIGURA 13, se muestra como el siCAPN1 silencia, de forma específica, la isoforma CAPN1 sin alterar los niveles de ARNm de CAPN2 (FIGURA 14). Por lo tanto, podemos decir que el silenciamiento es efectivo y específico de cada isoforma.

A continuación, decidimos comprobar tras el silenciamiento génico y posterior análisis mediante transferencia tipo *Western Blot*, la expresión de las proteínas CAPN1 y CAPN2 y la proteólisis de fodrina, tal y como se muestra en la FIGURA 15.

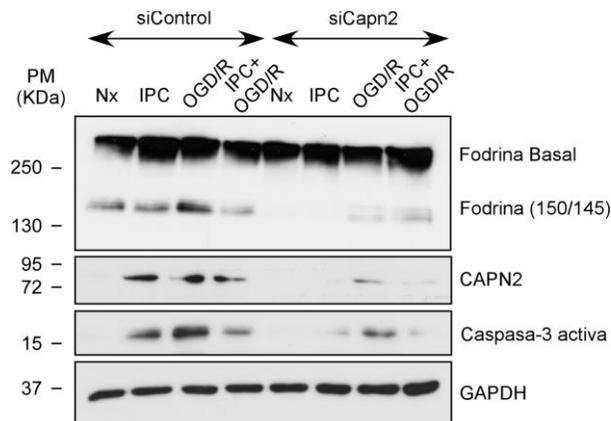
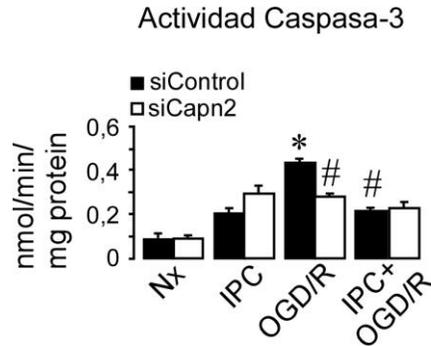


FIGURA 15. Análisis de la actividad de CAPN2, caspasa-3 activa y la expresión de CAPN2 en neuronas transfectadas (6DIV) con siCapn2 o siControl, y posterior análisis mediante transferencia tipo Western Blot.

Por otra parte, analizamos en estas mismas condiciones la expresión de la caspasa-3 activa, efector final de muerte celular por apoptosis.

Los resultados mostrados en la FIGURA 15 demuestran que la fodrina es diana específica de CAPN2, debido a que se observó en las neuronas siCapn2 de la misma manera que las neuronas preconditionadas y sometidas a OGD/R, una reducción de los fragmentos 150/145 KDa respecto a neuronas siControl en isquemia.

Por otra parte, observamos una disminución en los niveles de caspasa-3 activa, tanto en las neuronas preconditionadas como en las neuronas siCapn2, respecto a las siControl tras la OGD/R. Debido a esto decidimos corroborar este efecto mediante fluorimetría.



*FIGURA 16. Análisis por fluorimetría de la actividad de la caspasa-3 en neuronas siControl o siCapn2 y sometidas a las 4 condiciones experimentales. * $p < 0,05$ respecto a siControl en Nx y # respecto a siControl en OGD/R, de un total de 3 cultivos diferentes.*

Los resultados de la FIGURA 16 demuestran que, durante la OGD/R en las neuronas, el silenciamiento de CAPN2 disminuye los niveles de actividad de la caspasa-3 de forma significativa llegando a unos niveles similares al resto de condiciones, Nx, IPC e IPC+OGD/R.

Además, estos resultados se corroboraron mediante el análisis de la muerte neuronal por apoptosis mediante citometría de flujo, analizando el porcentaje de neuronas Annexina V⁺/7AAD⁻, tal y como se describió en el apartado 4 de Material y Métodos. En la FIGURA 17, se muestran los resultados obtenidos en neuronas durante el silenciamiento génico de ambas isoformas siCAPN1/siCAPN2 50:50 o al 100 % para cada una de las dos isoformas.

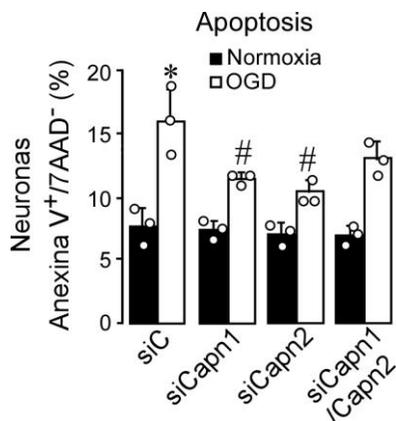


FIGURA 17. **Análisis de la muerte celular por apoptosis mediante citometría de flujo.** Neuronas de 6 DIV transfectadas siControl, siCapn1 y siCapn2 y a los 9 DIV sometidas a condiciones de OGD/R y Nx. Resultados de 3 cultivos diferentes. * $p < 0,05$ respecto a siControl en Nx y # respecto a siControl en OGD/R, de un total de 3 cultivos diferentes.

Los resultados muestran en la FIGURA 17, que el silenciamiento simultáneo de ambas isoformas al 50 % (siCapn1/siCapn2) durante la isquemia previene la muerte neuronal por apoptosis de forma no significativa. Sin embargo, neuronas siCapn1 o siCapn2 por separado presentan porcentajes de muerte por apoptosis significativamente muy inferiores a las observadas en las neuronas siControl y expuestas a OGD/R.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el silenciamiento génico de CAPN1 o CAPN2 mimetiza el efecto neuroprotector observado durante el preconditionamiento en las neuronas corticales de ratón promoviendo la tolerancia neuronal en respuesta al daño de isquemia/reoxigenación.

3.2. La inhibición farmacológica de las calpaínas mimetiza el efecto neuroprotector del preconditionamiento

En los resultados del apartado 2.4 se ha demostrado como el silenciamiento a nivel génico de las calpaínas mimetiza el efecto neuroprotector del IPC frente al daño isquémico. Así que, decidimos utilizar otra técnica que permitiera modular la actividad de las calpaínas con objeto de corroborar la su implicación durante la tolerancia isquémica neuronal inducida por el IPC. Para ello las neuronas 8-9 DIV se incubaron en presencia de un inhibidor farmacológico de las calpaínas, conocido como Ac-LLnL-CHO (ALLN), descrito en el apartado 11.2 de Material y Métodos.

El primer paso fue identificar la concentración del inhibidor a la cual las neuronas corticales de ratón presentaban unos niveles de actividad bajos sin afectar a la viabilidad neuronal durante la isquemia experimental. Primero se analizó la dosis-respuesta con distintas concentraciones de inhibidor mediante la expresión de la caspasa-3 activa por transferencia tipo *Western Blot* y la aparición de los fragmentos 150/145 de fodrina.

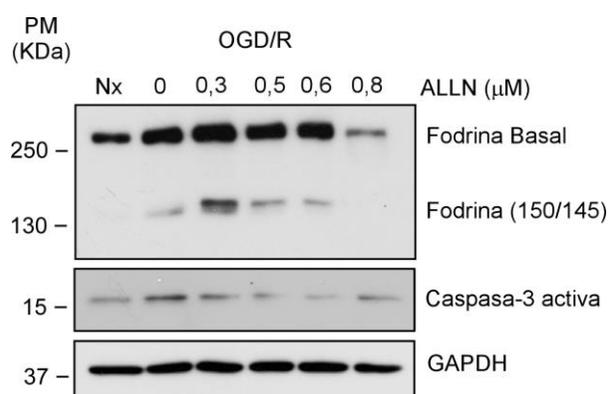


FIGURA 18. Análisis de la inhibición de la actividad de las calpaínas mediante el uso del inhibidor farmacológico ALLN, siendo la concentración óptima 0,6 μM.

Los resultados muestran que en las neuronas el tratamiento con la concentración 0,6 μM de ALLN previno la proteólisis de fodrina sin incrementar los niveles de caspasa-3 activa frente a la OGD/R y analizados mediante *Western Blot*.

Estos resultados nos permitieron comprobar que la inhibición farmacológica de las calpaínas mimetiza el efecto neuroprotector observado en las neuronas precondicionadas en respuesta a la isquemia/reoxigenación.

4. EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE CAPN2

Entre los sistemas de regulación de las calpaínas se han descrito entre otros, los niveles de calcio, su localización celular o la interacción con su inhibidor endógeno, la calpastatina (Baudry, 2019; Goll et al., 2003; Wendt et al., 2004) y revisados en el apartado 5.4 de la Introducción.

En el apartado 2.2.1 de Resultados, hemos demostrado que el IPC no promueve cambios en los niveles de ARNm, pero sí que existen diferencias a nivel proteico y que la actividad de las calpaínas está reducida en las neuronas precondicionadas tras la isquemia/reoxigenación (apartados 2 y 3 de Resultados). En consecuencia, podemos decir que todos estos cambios podrían ser debidos a modificaciones que ocurren a nivel postraduccional de la proteína.

4.1 El preconditionamiento isquémico previene la localización nuclear de CAPN2

De hecho, y ya que uno de los sistemas de regulación de las calpaínas es su localización subcelular (Chang et al., 2015; Goll et al., 2003), pensamos que las diferencias observadas en la actividad de las calpaínas neuronal y mediada por el preconditionamiento isquémico podrían estar promovidas por una menor accesibilidad de las calpaínas a sus dianas moleculares.

Por todo ello, nos propusimos investigar en primer lugar la localización subcelular de CAPN1 y CAPN2 en las neuronas corticales en cultivo primario mediante inmunocitoquímica (apartado 10 de Material y Métodos) y en las distintas condiciones experimentales. En la FIGURA 19 se muestran las microfotografías de fluorescencia donde se observa que CAPN1 se encuentra mayoritariamente localizada en el citosol y en la envuelta perinuclear en todas las condiciones estudiadas.

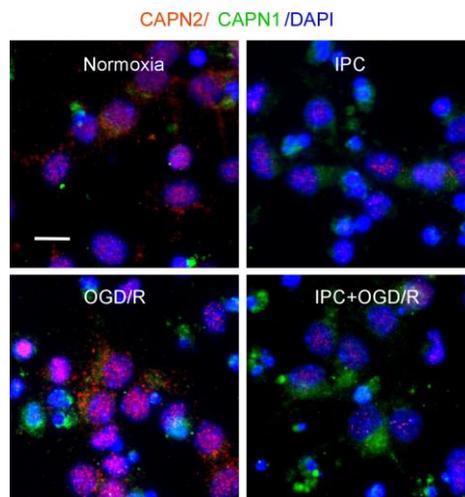


FIGURA 19. Localización celular de CAPN1 (verde) y CAPN2 (rojo) en neuronas corticales de ratón sometidas a Nx, IPC, OGD/R e IPC+OGD/R. Las microfotografías realizadas en un microscopio de fluorescencia son representativas de un total de 6-10 fotos por condición de un total de 3 cultivos diferentes.

A su vez, hemos observado que durante la isquemia (OGD/R) CAPN2 se localiza principalmente en el núcleo, en comparación a la condición Normoxia. Sin embargo, el IPC (IPC+OGD/R) previno la localización nuclear de CAPN2 inducida tras 4 horas de reoxigenación después de la isquemia.

Este resultado, nos permitió enfocarnos principalmente en la isoforma CAPN2, donde hemos comprobado que las diferencias en los cambios de localización en los compartimentos estudiados eran significativas.

En consecuencia, surgió la necesidad de analizar la localización de CAPN2 y su diana molecular, la fodrina, mediante inmunocitoquímica (apartado 10 de Material y Métodos). En la FIGURA 20 se observa que en condiciones de Normoxia, la fodrina se encuentra principalmente en el citosol, en los conos axónicos y en las neuritas, sin embargo, observamos que durante la OGD/R en las neuronas existe una reducción en la expresión de fodrina en las neuritas, lo parece indicar neurodegeneración neurítica que acompaña a este tipo de

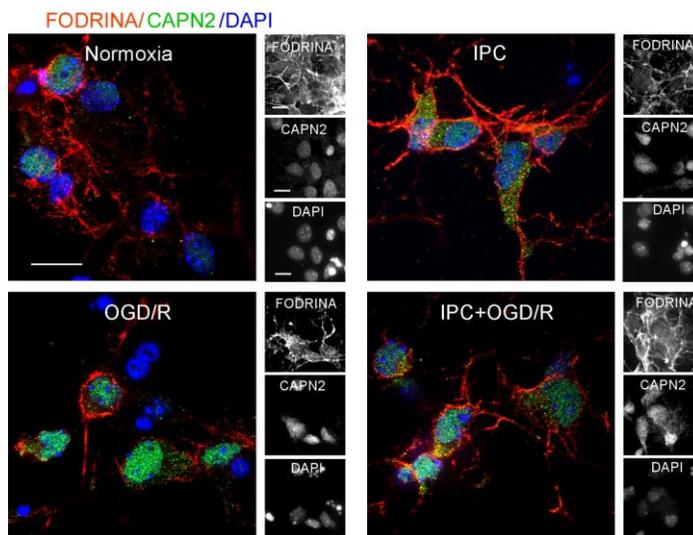


FIGURA 20. Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando la localización celular de Fodrina (rojo) y CAPN2 (verde) mediante el método de Inmunocitoquímica. Microfotografías representativas de un total de 5-6 por condición y de un total de 3 cultivos de neuronas corticales en cultivo primario en las 4 condiciones experimentales. Se muestran cada canal de fluorescencia por separado para cada proteína de interés.

procesos isquémicos y que ya hemos podido observar en situaciones similares (Barrio et al., 2021).

Estudios previos han demostrado que la fodrina tiene una importante función nuclear (apartado 5.5.2.1 de la Introducción). Es por ello, que el siguiente objetivo fue analizar mediante el uso de un microscopio de mayor resolución, la posible co-localización de CAPN2 y Fodrina.

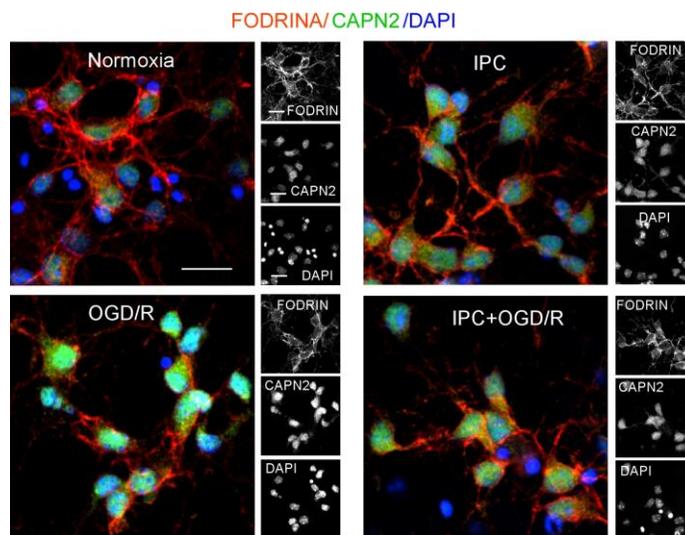


FIGURA 21. Microfotografías obtenidas con microscopio confocal Dragon-Fly donde se observa la Localización subcelular de Fodrina (rojo) y CAPN2 (verde). Microfotografías representativas de un total de 2-3 por condición y de un total de 3 cultivos de neuronas corticales en cultivo primario en las 4 condiciones experimentales. Se muestran por separado cada canal de fluorescencia y para cada proteína de interés.

La FIGURA 21 muestra que durante la isquemia existe co-localización nuclear de fodrina y CAPN2. Sin embargo, el IPC previno la traslocación nuclear de CAPN2 desencadenando la co-localización Fodrina-CAPN2, principalmente en la zona citosólica y en los conos axónicos.

4.2. El preconditionamiento previene la proteólisis de fodrina tras el daño isquémico, lo que previene la formación del complejo Fodrina/CAPN2 nuclear

Una vez comprobada la existencia de una diferente localización celular de CAPN2 en las distintas condiciones estudiadas. El siguiente análisis que realizamos fue comprobar este efecto mediante la técnica de fraccionamiento subcelular, para lo cual analizamos los compartimentos de núcleo y de citosol (apartado 8 de Material y Métodos) mediante transferencia tipo *Western Blot*.

Así, comprobamos la presencia nuclear de CAPN2 y fodrina en las neuronas tras la OGD/R, y que el IPC prevenía tanto la localización de CAPN2 como la proteólisis de fodrina en el núcleo (FIGURA 22).

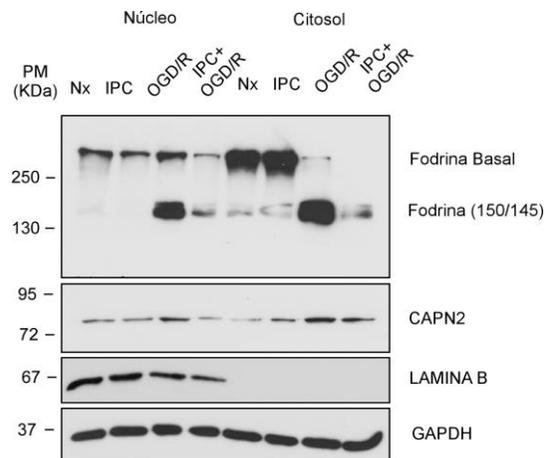


FIGURA 22. Niveles de expresión de CAPN2 y actividad de las calpaínas analizadas por Western Blot, en los distintos compartimentos subcelulares. Muestras obtenidas mediante fraccionamiento subcelular de núcleo y citosol en las neuronas corticales sometidas a las 4 condiciones experimentales.

Los resultados mostrados en la FIGURA 22, reflejan una mayor localización nuclear de CAPN2 durante la OGD/R, que se acompañó de una mayor presencia de los fragmentos 150/145 de fodrina respecto a la Nx. El IPC previno la actividad de las calpaínas en ambos compartimentos celulares, lo que se acompañó de una reducción en los niveles de expresión de CAPN2 nuclear.

4.3. El silenciamiento génico de CAPN2 mimetiza el efecto del preconditionamiento

Como se describe en el apartado 5.5.2.1 de la introducción, recientemente se han descrito numerosos procesos en los que participa la fodrina nuclear: en la reparación del ADN, el anclaje y andamiaje de proteínas citoesqueléticas además de formar parte de la membrana nuclear (Baitinger & CHENEY Trun, 1987; Rubtsov & Lopina, 2000; Shashikala et al., 2013a; Sreeja et al., 2020a). Por este motivo, decidimos que la proteólisis de fodrina podría estar mediada por CAPN2 en el núcleo y para ello se realizó un fraccionamiento nuclear silenciando CAPN2.

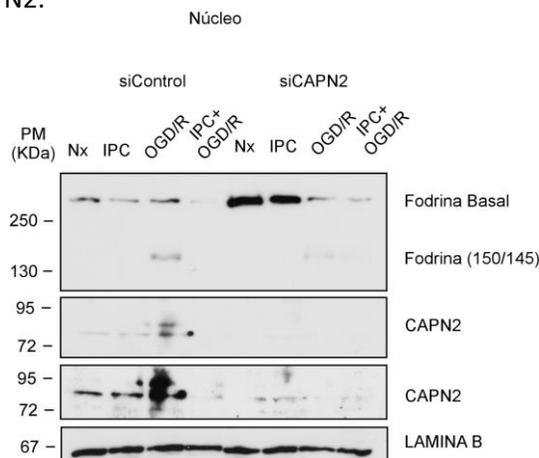


FIGURA 23. Análisis mediante Western Blot de los niveles de expresión de CAPN2 y de la actividad en el núcleo en neuronas 6 DIV transfectadas con siControl o siCAPN2 en las cuatro condiciones experimentales. Se muestran dos exposiciones diferentes para la proteína CAPN2.

En la FIGURA 23 se observó que en neuronas siCapn2 existe menor proteólisis de fodrina nuclear, durante la OGD/R respecto a las siControl. Con estos resultados, podemos concluir que el IPC previno la localización nuclear de CAPN2, lo que produjo una menor accesibilidad a la fodrina nuclear.

Estos resultados indican que el IPC es capaz de reducir la formación del complejo Fodrina/CAPN2 nuclear y que éste es uno de los mecanismos implicados en el desencadenamiento de la TI neuronal subsiguiente en respuesta a las 4 horas de reoxigenación tras la isquemia.

5. EL PRECONDICIONAMIENTO PREVIENE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO CAPN2/CAST, EVITANDO LA PROTEOLISIS DE CAST INDUCIDA TRAS LA ISQUEMIA

Existen estudios que describen como la inhibición óptima de las calpaínas mediada por su único inhibidor endógeno conocido, la calpastatina (CAST) ocurre eficientemente cuando existen flujos no prolongados de Ca^{2+} , tal y como se describe en el apartado 5.4.4 de la Introducción. Sin embargo, cuando ese flujo de Ca^{2+} se mantiene prolongado en el tiempo como puede ser el caso de la OGD/R, la CAST, que se encuentra unida a las calpaínas se convierte en sustrato de las calpaínas, dando lugar a su proteólisis y originando fragmentos más pequeños de aproximadamente 43 KDa. Estos fragmentos proteolizados de CAST se caracterizan porque pierden la función inhibitoria, pero no su interacción con CAPN2, lo que a su vez evita la unión con otras moléculas de CAST intactas y por lo tanto su posible inhibición. Además, como consecuencia, de la proteólisis de CAST, y unión de la calpaína a estos fragmentos pequeños,

estas proteasas adquieren su actividad máxima (Lange et al., 2007; Mosammaparast & Pemberton, 2004).

5.1. El IPC previene la formación de los fragmentos proteolizados de CAST, conservando su función inhibitoria frente a CAPN2

Los resultados mostrados en el apartado anterior demuestran que el IPC previene el cambio de localización nuclear de CAPN2 inducido por la isquemia, por lo tanto, es necesario saber si el inhibidor endógeno natural, la calpastatina, estaba secuestrando de alguna forma esta proteína.

Para ello, analizamos los niveles de expresión de la CAST y su interacción con CAPN2 mediante ensayo de inmunoprecipitación (apartado 12 de Material y Métodos). En la FIGURA 24 se muestra que durante la OGD/R existe un distinto patrón de expresión de CAST, existiendo mayor presencia de fragmentos pequeños de la CAST frente a la Nx. A su vez, el IPC previene la formación de los fragmentos pequeños de CAST y la formación del complejo CAST/CAPN2 inducidos tras la OGD/R.

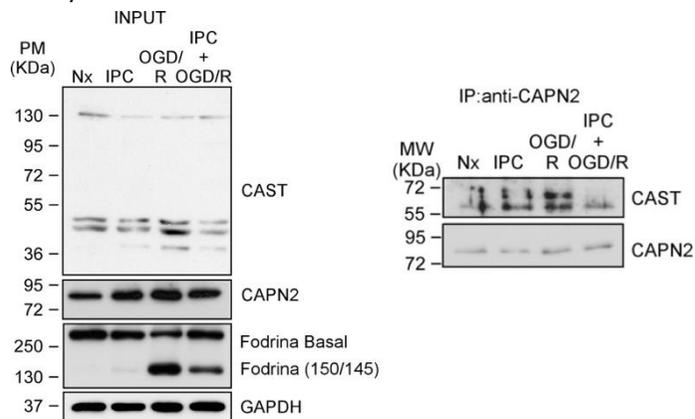


FIGURA 24. Patrón de expresión de la proteína Calpastatina, inhibidor endógeno de las calpaina, actividad de las calpaina y expresión de CAPN2 en el INPUT (izq) y la expresión de la CAST, obtenido tras el ensayo de inmunoprecipitación con anti-CAPN2 (dcha). Extractos de neuronas 8-9 DIV en las cuatro condiciones.

La presencia de fragmentos pequeños de CAST podría ser resultado de la interacción prolongada de CAST con CAPN2, y por lo tanto la formación estable del complejo CAPN2/CAST, mecanismo que podría estar implicado con los cambios de localización nuclear (FIGURA 19, 20, 21 y 22 de Resultados).

Así, decidimos analizar la interacción de estas dos proteínas en las cuatro condiciones experimentales. Tal y como se muestra en la FIGURA 24 (dcha) mediante tras la aplicación de la técnica de inmunoprecipitación (apartado 12 de Material y Métodos y posterior transferencia vertical tipo *Western Blot*).

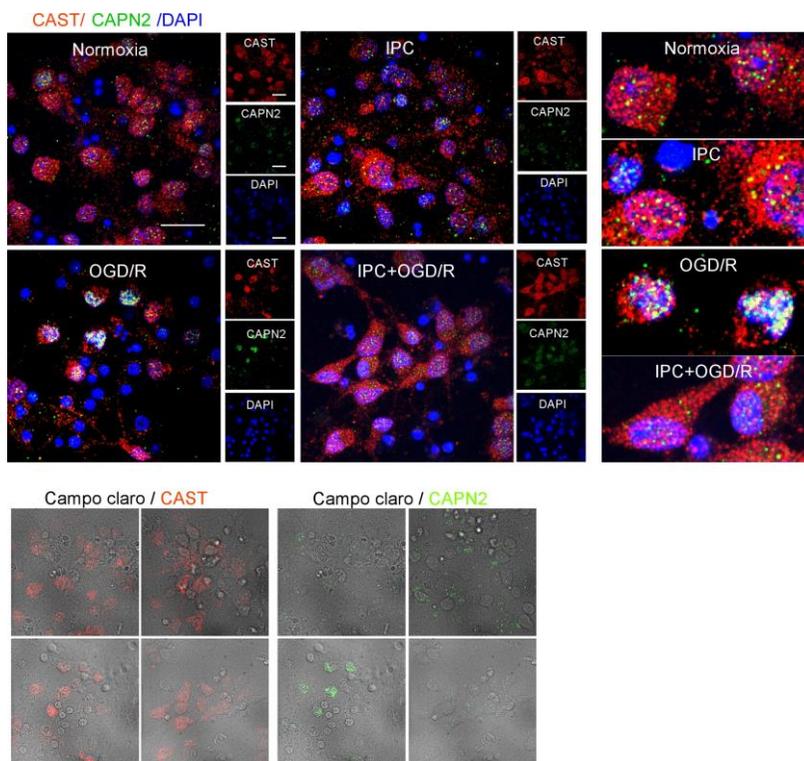


FIGURA 25. Microfotografías de microscopía confocal donde se muestra la localización de CAPN2 y CAST en las distintas condiciones. Se observa la co-localización de CAPN2 y CAST nuclear y citosólica en las neuronas OGD/R. La imagen inferior es microscopía en campo claro donde se observa mayor presencia de CAST y CAPN2 en el núcleo durante la OGD/R. Neuronas de 8-9 DIV sometidas a las 4 condiciones experimentales.

Con objeto de corroborar la formación del complejo *CAPN2/CAST*, realizamos la inmunocitoquímica mostrada en la FIGURA 25.

Finalmente, el siguiente estudio que realizamos fue el de comprobar si a formación del complejo *CAPN2/CAST* podría estar implicada en la translocación nuclear de *CAPN2*. Para ello, fue necesario indagar sobre el mecanismo de traslocación de *CAPN2* al interior nuclear y el papel de la *CAST* en este proceso.

5.2. Los cambios en el estado de fosforilación/defosforilación podrían afectar a la tolerancia isquémica neuronal

Hemos observado que la interacción del complejo *CAPN2/CAST* se previene con el IPC en respuesta a la isquemia, por lo que en esta condición podría haber una menor accesibilidad del inhibidor con *CAPN2*. Por lo tanto, el siguiente paso fue indagar acerca del mecanismo de traslocación de *CAPN2* durante el IPC frente a la OGD/R.

Primero comprobamos si alterando el estado de fosforilación/defosforilación afectaba a la traslocación nuclear de la proteína. Para ello, las neuronas de 8-

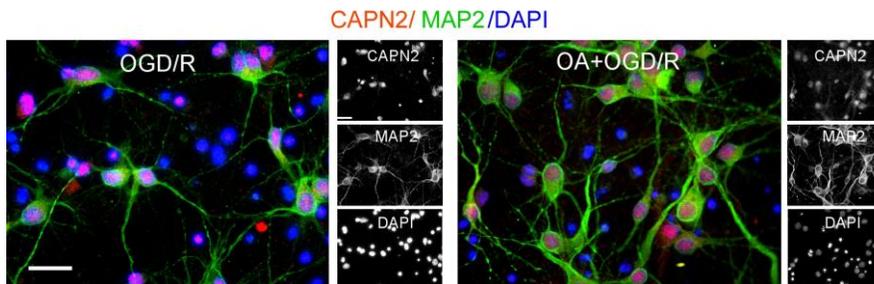


FIGURA 26. Neuronas 8-9 DIV tratadas con ácido okadaico (OA) o no previo a la isquemia. Microfotografías de fluorescencia mostrando MAP2 (en verde) y CAPN2 (en rojo), de un total de 3 cultivos diferentes.

9 DIV se trataron con ácido okadaico (OA) 10 nM durante 10 minutos previos a la isquemia, con objeto de inhibir las fosfatasa.

Los resultados mostrados en la FIGURA 26 indican que en las neuronas tratadas con OA se prevenía en parte la translocación nuclear inducidas tras la isquemia. Además, las neuronas presentaban una mejor integridad de las neuritas (marcadas con MAP-2, indicador de diferenciación neuronal). Esto parece indicar que los cambios en los mecanismos de fosforilación/desfosforilación de la CAPN2 y de sus proteínas relacionadas, podrían afectar a la respuesta neuronal frente al daño isquémico.

6. Estudios realizados in sílico predicen una posible secuencia de localización nuclear en CAPN2

Las calpaínas CAPN1 y CAPN2 están principalmente formadas por dos subunidades conocidas y descritas en el apartado 5.1 de la Introducción. Una de ellas está estrechamente relacionada con el procesamiento de los sustratos, en concreto la subunidad catalítica (80 KDa) explicada en el apartado 5.1.1 de Introducción, mientras que una de las funciones principales de la subunidad reguladora (28 KDa) está implicada en los cambios de localización subcelular descrito en el apartado 5.1.2 de Introducción.

Es por ello, que otro de nuestros objetivos fue la identificación de las posibles secuencias implicadas en la traslocación nuclear con el objetivo de demostrar si la TI neuronal está estrechamente relacionada con una secuencia de localización nuclear (NLS).

6.1. El posible NLS interacciona con la subunidad reguladora implicada en cambios de localización

Utilizamos una base de datos conocida como Eukaryotic Linear Motif (ELM) descrito en el apartado 17 de Material y Métodos. Esta base de datos proporcionó una secuencia específica descrita en la TABLA 8 conocida como “Nuclear Export Signal” (NES).

Secuencia	Aminoácidos	Función
DEIEANLEEFDISEDD	514-529	Algunas proteínas exportadas del núcleo al citosol contienen secuencias de exportación nuclear ricas en leucina que interaccionan con la exportina CRM1
EIEANLEEFDISEDD	515-529	

TABLA 8. Secuencia de exportación nuclear descrita en la base de datos ELM.

Sin embargo, no encontramos ninguna secuencia de importación nuclear descrita, así que, el siguiente paso fue utilizar “NucPred” que es una herramienta de predicción de posibles secuencias de localización nuclear conocido en inglés como “Nuclear Localization Sequence” (NLS) y está descrita en el apartado 17 de Material y Métodos. En la TABLA 9 se muestra la posible secuencia NLS y el porcentaje de probabilidad.

Secuencia	Aminoácidos	Probabilidad de acierto	Especies
KHRRRQR	413-419	+90%	Humano/Ratón

TABLA 9. Posible secuencia de localización nuclear de CAPN2 en humano y ratón.

El resultado obtenido de la base de datos de la TABLA 9 muestra que existe más de un 90 % de probabilidad de que la secuencia (KHRRRQQR) localizada en el dominio III de la subunidad catalítica (Goll et al., 2003) sea un posible NLS.

Con objeto de conocer más sobre la secuencia rica en argininas mostrada en la TABLA 9 hemos comprobado mediante el uso de la base de datos “Protein Data Base” (PDB) (explicada en el apartado 17 de Material y Métodos) la

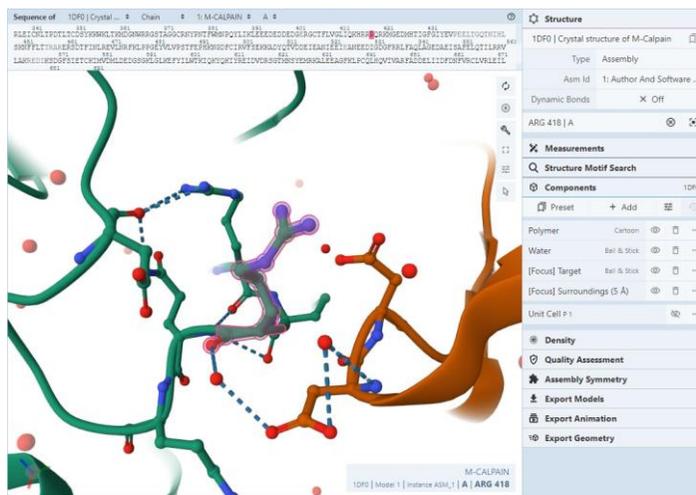


Ilustración 1. Residuo Arg417 del posible NLS interactuando con la subunidad reguladora implicada en cambios de localización celular. Ilustración obtenida de Ligand explorer.

localización en la estructura cristalográfica de CAPN2. Los resultados predictivos de las bases de datos que se muestran en la Ilustración 1 indican que la secuencia “KHRRRQQR” se encuentra interactuando con la subunidad reguladora, que como se explica en el apartado 5.1.1. de la introducción está implicada en los cambios de localización celular. Por lo tanto, la conservación de la secuencia proteica en distintas especies y la interacción estrecha con la subunidad reguladora proporciona a esta secuencia una gran importancia biológica.

6.2. La *Arg417* del posible NLS queda libre en el espacio cuando interacciona con CAST

El IPC previene la interacción de calpastatina con CAPN2 mostrados en el apartado 5.1 de Resultados y la translocación nuclear de CAPN2 mostrado en el apartado 4.1 de Resultados.

Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue analizar qué relación existe entre la calpastatina, con CAPN2 y su subunidad reguladora (CSS1/CSS2). Los resultados obtenidos de la búsqueda in silico entre la formación trimérica de m-calpaína y CAST mostrados en la Ilustración 2 parecían indicar que el residuo Arg417 permanecía libre en el espacio, permitiendo la interacción con otro tipo de proteínas implicadas en la importación nuclear como por ejemplo la importina CRM1(Chang et al. 2015) .

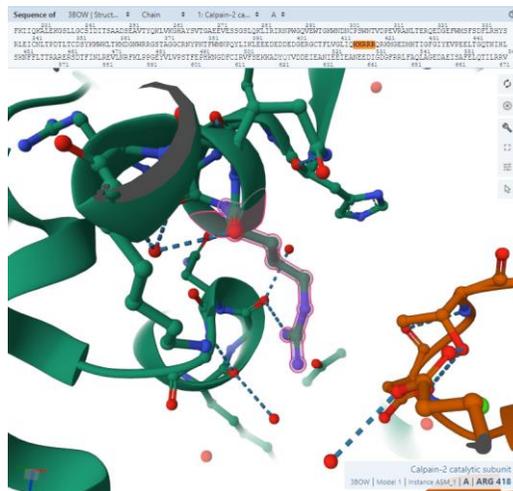


Ilustración 2. Estructura cristalográfica del complejo m-calpain y su inhibidor endógeno Calpastatina.

Como se muestra en la Ilustración 2 la formación del complejo m-calpaína y calpastatina permite que la *Arg418* de la subunidad catalítica, CAPN2, permanezca libre en el espacio, como consecuencia podría quedar accesibles a otras moléculas como importinas (Chang et al. 2015) y estos resultados entre la interacción del inhibidor, la formación del heterodímero y el NLS podrían estar estrechamente relacionados e implicados en el tráfico nucleocitoplasmático de CAPN2, promoviendo la tolerancia isquémica neuronal asociada al preconditionamiento. La sobreexpresión de CAPN2 en las líneas celulares

El objetivo principal fue analizar si el IPC estaba afectando a la localización nuclear de CAPN2, a través del posible NLS y como consecuencia el tráfico nuclear de esta isoforma promueve la TI neuronal. Para ello recurrimos a la herramienta de sobreexpresión de CAPN2 descrito en el apartado 16 de Material y Métodos.

6.3. La sobreexpresión de CAPN2 promueve la toxicidad celular

El primer paso fue testar el plásmido en células donde la eficiencia de transfección fuese superior al 80 %. Para ello decidimos sobreexpresar el plásmido mediante transfección en las líneas celulares 293T y SHY5Y (apartado 16 de Material y Métodos).

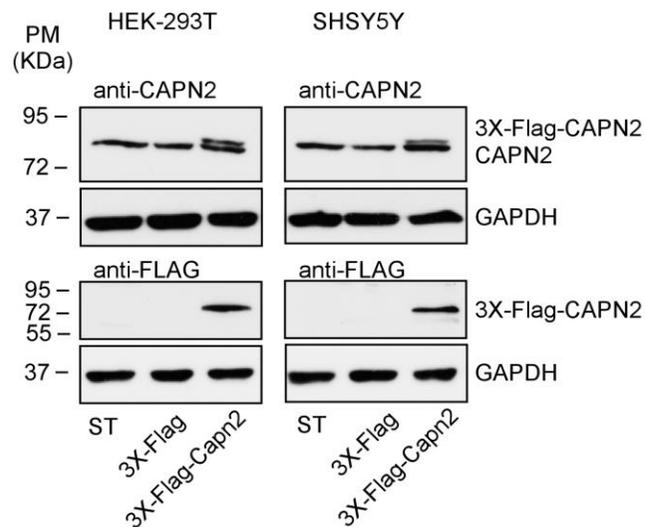


FIGURA 27. Validación de la sobreexpresión de CAPN2 en las líneas celulares HEK-293T y SHY5Y.

En la FIGURA 27 se utilizó el anticuerpo de calpaína 2 donde permitió reconocer la proteína endógena y ectópica. Los resultados obtenidos mostraron en la FIGURA 27, que CAPN2 se sobreexpresa en ambos tipos celulares tras su análisis mediante transferencia tipo *Western Blot*.

El siguiente paso fue comprobar en HEK-293T la toxicidad asociada a la sobreexpresión de CAPN1 y su localización nuclear durante la OGD/R.

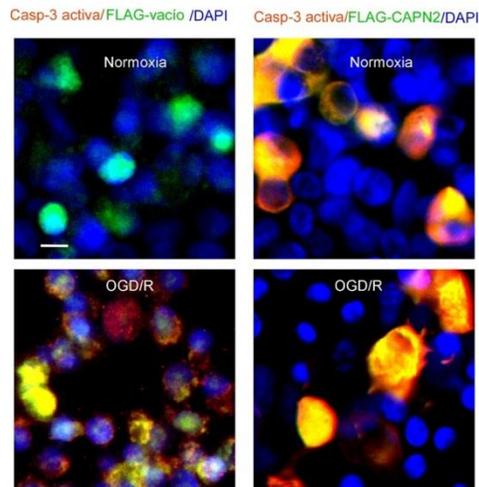


FIGURA 28. Sobreexpresión de CAPN2 en HEK-293T donde se observa un aumento en el número de las células positivas para caspasa-3 activa (rojo) en condiciones de Nx.

En la FIGURA 28 se observa que en condiciones de Normoxia la sobreexpresión de CAPN2 aumenta el número de células HEK-293T caspasa-3 positivas. Además, se observa que durante la OGD/R hay una mayor localización nuclear de CAPN2 con respecto a la Nx. Con estos datos, podemos concluir que el plásmido es funcional.

7. El preconditionamiento previene la formación de especies reactivas de oxígeno

Durante la isquemia existen mecanismos implicados en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan (apartado 4.2. de Introducción).

Sin embargo, cuando existe un desbalance entre la formación y la eliminación de los ROS se produce una acumulación de estas, que acaba siendo desencadenando el estrés oxidativo que conlleva a la muerte celular. Por lo tanto, nuestro objetivo siguiente fue analizar la formación de especies reactivas de oxígeno, midiendo la formación de anión superóxido (O_2^-) y de peróxido de hidrógeno H_2O_2 tal y como se describió en el apartado 14 y 15 respectivamente de Material y Métodos.

7.1. El preconditionamiento previene la formación de anión superóxido inducido tras la isquemia

Para evaluar el O_2^- mitocondrial producido en neuronas corticales en las cuatro condiciones se utilizó la sonda MitoSOX[®] Red y posterior análisis mediante citometría de flujo (Ver apartado 14 de Material y Métodos).

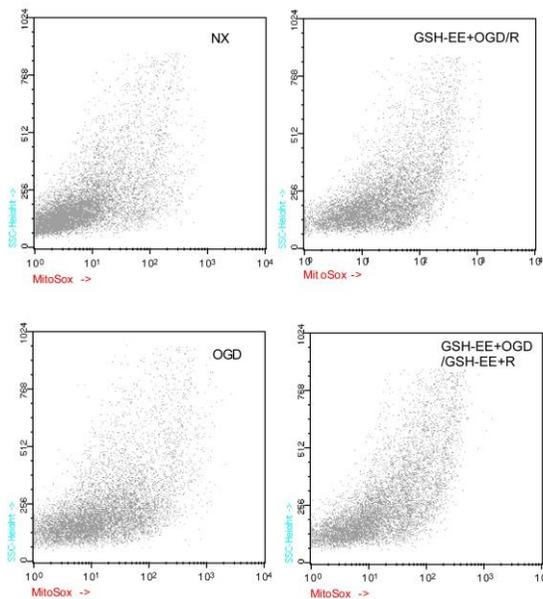


FIGURA 29. Registros tipo de citometría de flujo donde se muestra la formación de ROS mitocondriales mediante el uso de la sonda MITOSOX[®]. Nx: condición control; OGD/R: Condición de daño; GSH-EE+OGD/R o GSH-EE+OGD/GSH-EE+R.

La oxidación de la sonda MitoSOX[®] se desplaza a la derecha en los registros de citometría de flujo correspondientes a neuronas sometidas a la isquemia experimental, tal y como se muestra en la FIGURA 29.

Para realizar el ensayo de determinación en la generación de especies reactivas de oxígeno mitocondriales, las neuronas a los 8-9 DIV se les trato con la molécula antioxidante glutatión-etil éster (GSH-EE) 1 mM durante 10 minutos antes de las 4 horas de reoxigenación e inducción de la isquemia experimental (GSH-EE+OGD/R) o durante todo el tiempo de isquemia (GSH-EE+OGD/GSH-EE+R). Paralelamente las neuronas se incubaron en condiciones de normoxia (Nx) o en isquemia/reoxigenación experimental (OGD/R) sin tratamiento con el antioxidante.

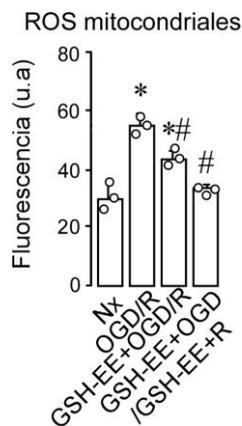


FIGURA 30. Formación de ROS mitocondriales. Nx: condición control; OGD/R: Condición de daño; GSH-EE+OGD/R: En esta condición solo se ha aplicado el glutatión etil éster durante el tiempo de isquemia; GSH-EE+OGD/GSH-EE+R: Esta condición esta tratada con GSH durante el tiempo de isquemia; GSH-EE+OGD/GSH-EE+R: Esta condición esta tratada con GSH durante la OGD y la reoxigenación (4 horas y 30 minutos). * $p < 0,05$ respecto a Nx y # respecto a OGD/R de tres cultivos diferentes.

En la FIGURA 30 se observa que la isquemia/reoxigenación induce la acumulación del anión superóxido mitocondrial y el tratamiento con el antioxidante glutatión reducido (GSH-EE) lo previene.

Una vez corroboramos que existe una acumulación de anión superóxido durante la OGD/R, el siguiente paso fue analizar si el IPC previene el aumento en la generación de anión superóxido inducido tras la isquemia (FIGURA 31).

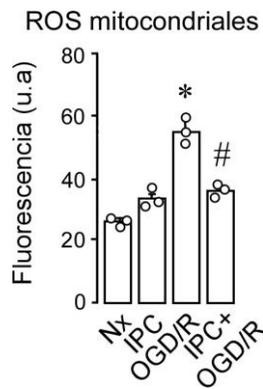


FIGURA 31. Formación de especies reactivas de oxígeno en las 4 condiciones. Expresado en unidades arbitrarias y en el análisis estadístico se realizó ANOVA one-way * $p < 0,05$ respecto a Nx y # respecto a OGD/R, de un total de 3 cultivos diferentes.

En la figura 31 se observó que durante la OGD/R hubo un incremento en la producción de ROS mitocondriales mientras que el IPC rescataba la acumulación de ROS. Por lo tanto, podría existir una implicación del sistema antioxidante en la tolerancia isquémica neuronal asociada al preconditionamiento.

7.2. El preconditionamiento previene la acumulación de H_2O_2 tras la isquemia

Con objeto de analizar otra de las principales especies prooxidantes celulares, a continuación, analizamos la formación de peróxido de hidrógeno durante la isquemia utilizando la sonda AMPLEX-RED y posterior análisis mediante espectrofluorimetría (apartado 15 de Material y Métodos).

Para ello, las neuronas de 8-9 DIV se sometieron a las 4 condiciones experimentales.

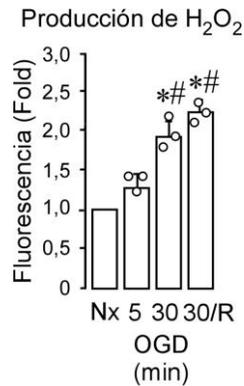


FIGURA 32. Niveles de H_2O_2 en las neuronas sometidas a Nx u OGD a diferentes tiempos 5 y 30 min sin reoxigenación o con reoxigenación de 4 h (30/R). Fluorescencia emitida por la oxidación de Amplex Red donde se observa una mayor oxidación durante 30 minutos de OGD tras 4 horas de reoxigenación. * $p < 0,05$ respecto a Nx y # respecto a OGD 5 min, de un total de 3 cultivos diferentes.

En la FIGURA 32 observamos que existen cambios significativos durante 30 minutos de OGD a 0 horas de reoxigenación (30). Sin embargo, el periodo de reoxigenación promueve una mayor acumulación de H_2O_2 (30/R).

El siguiente estudio fue comprobar si el IPC previene la acumulación de H_2O_2 inducida tras la isquemia experimental.

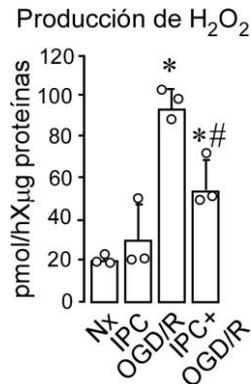


FIGURA 33. **Producción de Peróxido de hidrógeno.** Las neuronas sometidas a las 4 condiciones experimentales y utilizando la sonda AMPLEX-RED y posterior análisis por espectrofluorimetría. * $p < 0,05$ respecto a Nx y # respecto a OGD/R, de un total de 3 cultivos diferentes.

En la FIGURA 33 observamos como el IPC previene la formación de H₂O₂ frente a la isquemia.

Está descrito que la oxidación de la CAPN2 mediada por la formación de H₂O₂ promueve su translocación nuclear (Chang et al., 2015). Por lo tanto, el siguiente objetivo fue analizar si la presencia de H₂O₂ promovía cambios en la localización subcelular de CAPN2.

7.3. El antioxidante glutatión previene la traslocación nuclear de CAPN2

En la FIGURA 34 se observa que en neuronas tratadas con H₂O₂ 60 µM durante 4 horas se promueve la translocación nuclear de CAPN2, mientras que, el

tratamiento previo con a GSH-EE 1 mM previene el efecto de translocación inducido tras la isquemia experimental.

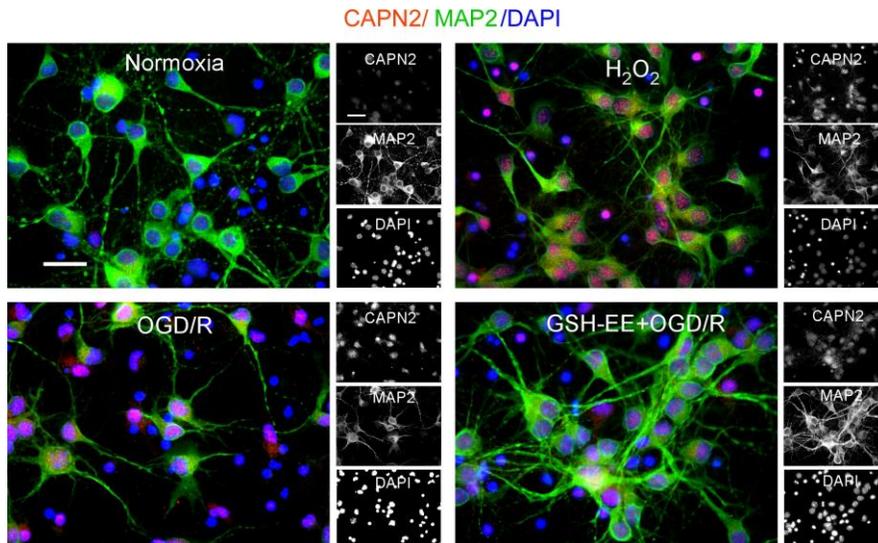


FIGURA 34. Microscopía de fluorescencia donde se observa la Translocación de CAPN2 al núcleo tras la OGD/R y el tratamiento con H₂O₂ a 60 μ M durante 6,5 horas. El uso de una molécula antioxidante, el glutatión etil éster (GSH-EE) 1 mM 10 min previo a las OGD/R previene la translocación nuclear.

Además, no solo se ha demostrado por inmunocitoquímica, también se ha demostrado mediante transferencia tipo *Western Blot* tras realizar un fraccionamiento núcleo y citosol explicado en el apartado 8 de Material y Métodos (FIGURA 35).

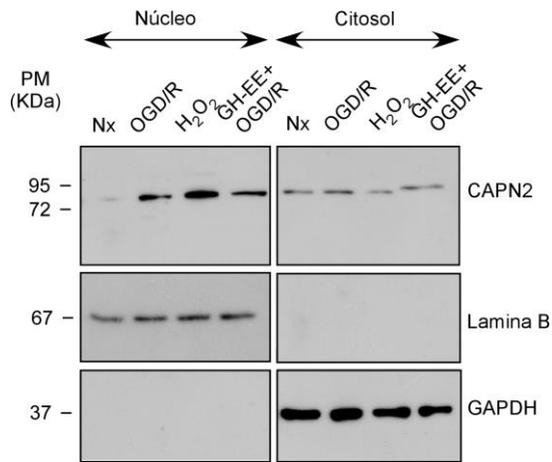


FIGURA 35. Fraccionamiento subcelular núcleo y citosol e Inmunotransferencia tipo Western Blot donde se observa la translocación de CAPN2 al núcleo tras la OGD/R y el tratamiento con H₂O₂ a 60 μ M durante 6,5 horas. El uso de una molécula antioxidante, el glutation etil éster (GSH) 1 mM previene la translocación nuclear.

Todos estos resultados, parecen indicar que el uso de antioxidantes y, por lo tanto, la prevención en la generación de especies reactivas y en concreto de la formación de la molécula H₂O₂ durante IPC podría estar directamente relacionada con la translocación nuclear de CAPN2 inducida tras el daño isquémico.

7.4. Oxidación de CAPN2

Una de las posibles modificaciones postraduccionales de CAPN2, podrían ser cambios en la oxidación de la molécula, lo que influiría en cambios conformacionales de la misma. Estos cambios estarían directamente implicados en la interacción de CAPN2 con otras proteínas, tales como la

subunidad reguladora CSS1/CSS2, su inhibidor endógeno CAST y afectando su unión y reconocimiento de sus dianas moleculares como la fodrina.

Las calpaínas son proteasas neutras características por ser ricas en cisteínas siendo estos residuos fácilmente oxidables de forma en la que los grupos tioles se oxidan para dar lugar a puentes disulfuro (Lametsch et al., 2008). En concreto, en m-calpaína existen 13 residuos de cisteína.

Con objeto de estudiar los posibles cambios en los niveles de oxidación de CAPN2, las neuronas 8-9 DIV se sometieron a las 4 condiciones experimentales, se recogieron en tampón extracción que contenía NP40 1% y N-etil-maleimida (NEM) 40 nM, tal y como se ha explicado en el apartado 7 de Material y Métodos

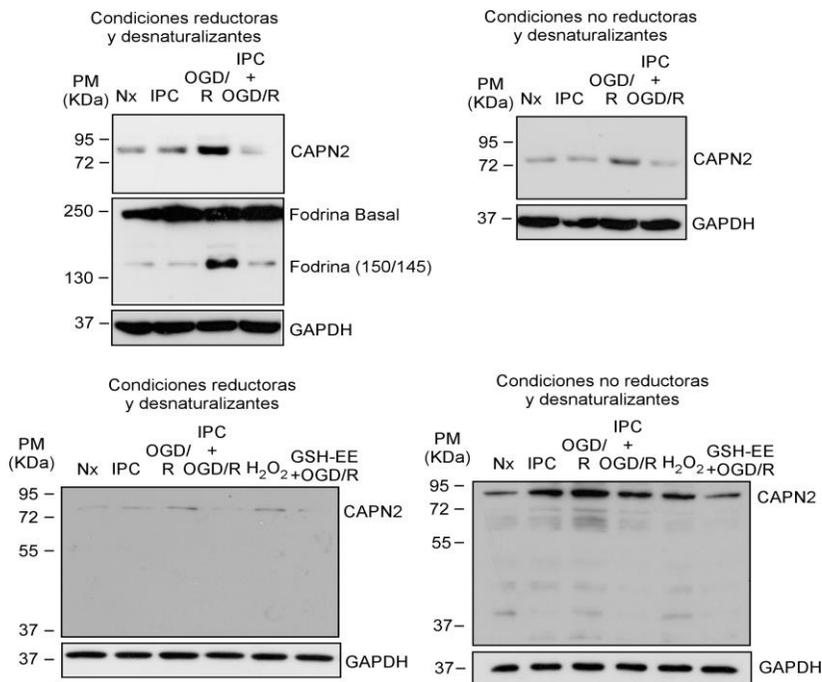


FIGURA 36. Análisis de la oxidación de CAPN2 mediante Western Blot en condiciones desnaturalizantes y reductoras de muestras procedentes de neuronas 8-9 DIV sometidas a las 4 condiciones experimentales y en presencia de H₂O₂ (60 μM) durante 4 hora o de GSH-EE 1 mM durante 10 minutos antes de la OGD/R.

Los resultados de la FIGURA 36 muestran que en condiciones reductoras, a través de la aplicación de carga negativa, las proteínas migran al mismo nivel. Sin embargo, en condiciones no reductoras existen cambios de movilidad electroforética durante la OGD/R respecto a la Nx. Los estados de oxidación de CAPN2 observados en las neuronas sometidas a isquemia, se previnieron tanto en neuronas precondicionadas como en neuronas previamente tratadas con el antioxidante GSH-EE.

Por lo tanto, podría ser que durante el IPC el control nucleocitoplasmático de CAPN2 podría estar mediado por cambios en el estado oxidado de la proteína.

DISCUSIÓN

En el campo de la neuroprotección frente a los trastornos neurológicos como el ictus isquémico, la tolerancia isquémica cerebral inducida por los estímulos de condicionamiento se ha convertido en una importante estrategia para tener en cuenta. Los mecanismos moleculares endógenos que se activan en respuesta a la isquemia son el objetivo clave para identificación de biomarcadores y la búsqueda de terapias neuroprotectoras novedosas (Gomez-Sanchez et al., 2011; Jimenez-Blasco et al., 2015; Maestre et al., 2008; Rodríguez et al., 2017). Así, en la presente Tesis hemos corroborado como el IPC promueve la TI isquémica neuronal reduciendo casi a la mitad el volumen de infarto en un modelo de oclusión de la arteria cerebral media de ratón. Aunque los mecanismos de neuroprotección asociada al preconditionamiento se desconocen, el control de la estabilidad proteica durante el preconditionamiento parece jugar un papel esencial frente a la isquemia. En concreto, estudios previos han demostrado como el IPC promueve una fosforilación temprana de Akt a través de la kinasa PI3K, como consecuencia se facilita la interacción nuclear de MDM2 con p53 desestabilizándose este factor de transcripción apoptótico vía proteasoma y promoviendo la TI neuronal (Barrio et al., 2021; Vecino et al., 2018).

La Tolerancia isquémica neuronal frente a la isquemia está mediada por la desestabilización e inhibición de CAPN2 y CAPN1

Al igual que el sistema proteasoma, el sistema de las proteasas conocido como calpaínas, también desempeña un papel crucial en el control de la estabilidad de las proteínas durante el proceso de protección inducida por la isquemia en ratones y en neuronas corticales. Específicamente, hemos observado que el preconditionamiento induce una disminución en la expresión proteica de las formas más abundantes de calpaínas en el cerebro, CAPN1 y CAPN2, en respuesta a la isquemia. Mientras que los niveles de ARN mensajero de ambas isoformas permanecen sin cambios, lo que sugiere la existencia de posibles

cambios postraduccionales inducidos por el preconditionamiento. Además, se ha observado que el IPC también reduce la actividad de las calpaínas como se ha obtenido tras el análisis de la proteólisis específica de unos de los sustratos más conocidos de estas proteasas, la fodrina (Kitagawa et al., 1999a; Siman et al., 1984).

El apartado 5.5.2. de la introducción describe que la fodrina es una proteína crucial en la organización y estabilización de las estructuras celulares, y es esencial para mantener la integridad estructural y funcional de la célula (Sreeja et al., 2020a). Sin embargo, la proteólisis de la fodrina mediada por calpaína puede causar una desestabilización estructural del citoesqueleto y, como resultado, una pérdida de la homeostasis celular que desencadena en la respuesta apoptótica (Baitinger & CHENEY Trun, 1987; Kitagawa et al., 1999b; Shashikala et al., 2013a; Siman et al., 1984).

Relación entre la activación de las calpaínas y la caspasa-3

Tanto la disminución en la expresión como la actividad de las calpaínas se han asociado con una disminución en la muerte celular por apoptosis y la activación de la caspasa-3. En este sentido, se ha descubierto que la calpaína y la caspasa poseen un mecanismo de retroalimentación positiva que promueve la activación de ambas (Wang, 2000) y proporcionando más evidencias del papel perjudicial que tiene la activación de las calpaínas en la muerte neuronal, como se describe en la isquemia (Curcio et al., 2016) y en enfermedades neurodegenerativas (Baudry & Bi, 2016; Wright & Vissel, 2016; Zurawa-Janicka et al., 2017). De hecho, nuestros resultados demuestran que la modulación de los niveles de ambas isoformas de calpaínas mediante el silenciamiento génico o a nivel farmacológico disminuye la proteólisis de fodrina, formación de caspasa-3 y una mayor viabilidad celular durante la isquemia. Por lo tanto, la inhibición de las calpaínas durante la isquemia mimetiza el efecto de preconditionamiento.

Formación de los heterodímeros: su relación con la estabilidad y la localización subcelular de CAPN2

El hecho de que exista una menor actividad proteolítica y una disminución en la expresión de ambas isoformas puede ser debido a la disociación del heterodímero de CAPN/CSS1/2 ya que hemos observado que el preconditionamiento previene la formación del heterodímero y como consecuencia la desestabilización de las calpaínas, lo que parece estar de acuerdo con estudios previos obtenidos en diferentes estudios (Franco & Huttenlocher, 2005; Goll et al., 2003; Spinozzi et al., 2021). Además, como se explica en el apartado 5.1.2 de la Introducción, la subunidad reguladora de las calpaínas está implicada en los cambios compartimentales de las calpaínas mediante la interacción del dominio V hidrofóbico y el dominio VI de unión a calcio y reconocimiento (Bever & Neumar, 2008; Franco & Huttenlocher, 2005; Goll et al. 2003; Spinozzi et al. 2021). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por inmunocitoquímica donde la isquemia promueve la translocación nuclear de CAPN2 mientras que el preconditionamiento isquémico rescata el efecto de translocación nuclear. Por lo tanto, todo parece indicar que la subunidad reguladora está participando en el proceso de estabilidad y localización celular de CAPN2. Sin embargo, CAPN1 no sigue el mismo patrón de localización que CAPN2. Esto puede ser debido a que ambas isoformas tienen funciones distintas tal y como se ha descrito previamente en (Costa, Sarmiento-Ribeiro, and Gonçalves 2023; Baudry and Bi 2016; Franco and Huttenlocher 2005). Por ejemplo, en células endoteliales se ha descrito que CAPN1 tiene una mayor implicación mitocondrial escindiendo proteínas como Bid, liberando el citocromo C, produciendo una desestabilización de las membranas mitocondriales y desencadenando la cascada apoptótica (Smith & Schnellmann, 2012). Sin embargo, otros estudios han publicado que la translocación de CAPN2 desempeña una importante función en el núcleo mediante la proteólisis de la CAMIVK en cardiomiocitos de rata y de la CAMIIK

en neuronas cerebelares, actuando sobre estas dianas que actúan como moduladores positivos de la expresión de genes antiapoptóticos (Chang et al., 2015).

El complejo fodrina/CAPN2 nuclear

A su vez, los resultados obtenidos muestran como el silenciamiento de CAPN2 previene la proteólisis de fodrina, siendo diana específica de CAPN2 en el núcleo. El núcleo alberga no solo el genoma sino también un complejo grupo de proteínas que se asocian con el nucleoesqueleto y que contribuyen a la complejidad estructural y funcional del núcleo. Esta red de proteínas es esencial para la integridad estructural del núcleo, así como para la regulación adecuada del metabolismo del ADN, la replicación, la transcripción y la reparación. Entre estas proteínas se encuentra la fodrina a la que recientemente se le ha implicado en la reparación del ADN y la estabilidad cromosómica, ya que se ha descrito que interactúa directamente con el ADN dañado y con proteínas involucradas en la reparación del ADN. Además, la fodrina se asocia con proteínas estructurales en el nucleoesqueleto, como lamina, emerina, actina, proteína 4.1 y miosina nuclear, y a través de estas interacciones se piensa que hace una importante contribución a la integridad estructural del núcleo y su elasticidad en células proliferativas (Lambert, 2018; Shashikala et al., 2013b; Sreeja et al., 2020b), pero se desconoce su papel en células posmitóticas como lo son las neuronas.

Localización subcelular diferencial entre CAPN1 y CAPN2

En vista a estos resultados obtenidos en el laboratorio y a través de la bibliografía, el hecho de que la localización compartimental de CAPN1 sea citosólica en todas las condiciones, pero el IPC afecte específicamente a la localización de CAPN2 hizo que nos centráramos en esta isoforma. Así, utilizando una base de datos conocida como ELM descrito en el apartado 17

de Material y Métodos, conocimos de la existencia de una secuencia de CAPN2 con un sitio de exportación nuclear (NES) ya descrito. Por lo tanto, decidimos usar una herramienta in silico predictora de posibles sitios de importación nuclear (NLS) NucPred, descrito en el apartado 17 de Material y Métodos. Analizando la estructura cristalográfica de CAPN2/CSS1-CSS2 observamos que el Dominio NLS se encuentra en el Dominio III explicado en el apartado 5.1.1 de la Introducción donde se describe que el dominio está implicado en interacción con fosfolípidos de membrana y sitio de unión a calcio siendo similar a un sitio calmodulina que interviene en la activación de las calpaínas. Lo más novedoso de este punto, es que el preconditionamiento podría estar afectando directamente a la posible secuencia de localización nuclear y mediar su interacción con la subunidad reguladora, que como se explicó en el apartado 5.1.2 de la Introducción está implicada en cambios de localización subcelular. Sin embargo, al analizar la interacción cristalográfica del heterodímero con la calpastatina, observamos que uno de los residuos del NLS se mantiene libre en el espacio, lo que le permitiría interactuar con el sistema de importinas u otro tipo de proteínas implicadas en la localización nuclear (Chang et al., 2015; Chu et al., 2007.; Lange et al., 2007; Mosammaparast & Pemberton, 2004). Además, el plásmido de sobreexpresión de CAPN2 sobreexpresado en células humanas aumenta la estabilidad de CAPN2 nuclear y la subsiguiente activación de la caspasa-3.

Desestabilización del Complejo CAST/CAPN2 durante la tolerancia isquémica neuronal

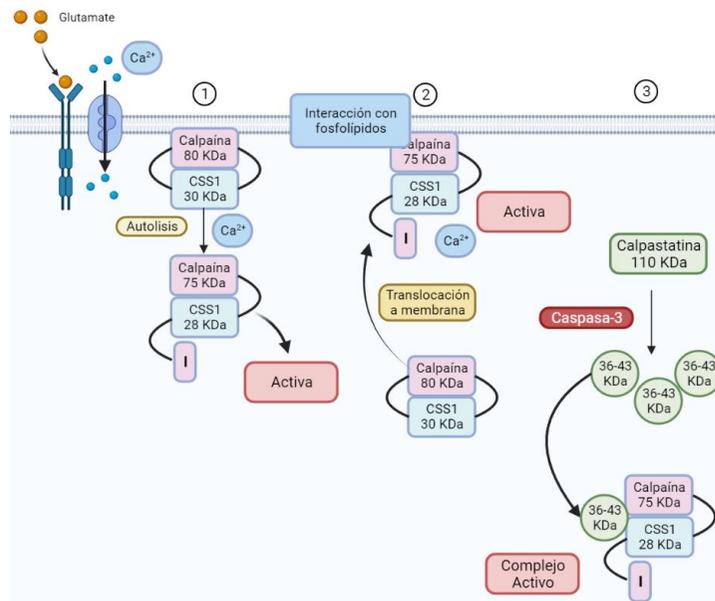
Nuestros resultados demuestran que existe un incremento en los fragmentos proteolizadas de la calpastatina de 43 KDa durante la OGD/R y que el preconditionamiento isquémico lo previene. En el apartado 5.4.4 de la Introducción se describe que el inhibidor endógeno interacciona con las calpaínas en presencia de calcio. Sin embargo, se ha demostrado que durante

el flujo prolongado de calcio la calpastatina llega a convertirse en un sustrato de las calpaínas. Existe así una retroalimentación positiva que proteoliza la calpastatina en fragmentos de 43 KDa que carecen de función inhibitoria, pero son capaces de unirse a la calpaína impidiendo que los fragmentos que poseen capacidad inhibitoria puedan inhibirla y formen un complejo completamente activo (Wang, 2000). Por lo tanto, existen 3 formas distintas de activación de las calpaínas conocidas hasta el momento (Ver el ESQUEMA resumen MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LAS CALPAINAS).

El primer modo de **activación ocurre a través del calcio** donde las calpaínas se activan mediante calcio promoviéndose la proteólisis y una localización citosólica (Goll et al., 2003). El segundo mecanismo es la **translocación a membrana citosólica** tras su activación promovida por calcio y permite su interacción con fosfolípidos de membrana (Telechea-Fernández et al., 2018). El último modelo de activación es el que hemos identificado en los resultados de la Tesis, donde encontramos una mayor formación del **complejo CAPN2/CAST** durante la isquemia, además de una mayor activación de calpaína y de la caspasa-3, tal y como se ha descrito en otros modelos celulares (J. J. Weber et al., 2019a).

Estos tres modelos de activación no son incompatibles entre sí, pero en nuestros resultados, el modelo que podemos demostrar que se produce es la formación del complejo CAPN2/CAST, acompañado además de una presencia nuclear y citosólica del complejo durante la isquemia.

Sin embargo, el IPC no solo previene la interacción del complejo CAPN2/CAST, sino que también previene la localización nuclear de complejo. Este resultado aporta evidencias sobre el residuo arginina 416 (ver apartado 6.2 de Resultados) que se encuentra libre en el espacio al interactuar con calpastatina, pudiendo facilitar la translocación nuclear del complejo CAPN2/CAST mediado por importinas (ver apartado 5.2. de Introducción).



RESUMEN DE LOS MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS.

A través de calcio. 1) Proteólisis de calpaína y liberación al citoplasma; 2) Presencia citosólica y activación mediante translocación; 3) Activación del complejo CAPN/CAST con una conformación activa.

Modificaciones postraduccionales y localización nuclear de CAPN2

La prevención de la formación del complejo CAPN2/CAST durante el preconditionamiento podría ser debido a la accesibilidad del inhibidor o de la proteasa. Existen estudios que avalan que los estados fosforilados de la calpastatina promueven la formación de agregados que no están accesibles para inhibir calpaínas. Por ejemplo, se ha descrito que durante la OGD/R existe una activación de fosfatasa y kinasa y como consecuencia esto permite que el estado soluble de la calpastatina se mantenga (apartado 5.4.4 de la Introducción) y la interacción entre calpaína-2 y calpastatina y adquiera una conformación activa óptima (De Tullio et al., 2014; J. J. Weber et al., 2019a). Como se describe en el apartado 5.4.1 de Introducción las calpaínas pueden

formar estados agregados mediante la formación de puentes sulfhidrilo. Por lo tanto, estos estudios se corresponden con los resultados obtenidos donde aparentemente se observan que las neuritas tienen una mayor integridad, pero que el ácido okadaico previene en parte la translocación nuclear, por lo tanto, podemos decir que el IPC podría interferir en los estados agregados y solubles del inhibidor endógeno, para lo cual serían necesarios la realización de nuevos experimentos.

Antioxidantes, ROS y traslocación nuclear de CAPN2

Otro de los mecanismos que se han identificado y que están implicados en la translocación nuclear de CAPN2 es la acumulación de especies reactivas de oxígeno, en cardiomiocitos de ratas (apartado 5.4 de la Introducción), donde el uso del Isoproterenol induce la formación de H_2O_2 y como consecuencia se produce la translocación nuclear de CAPN2 (Chang et al., 2015). Existen evidencias acerca de la inducción de moléculas antioxidantes con la aplicación del estímulo de preconditionamiento (Colàs-Campàs et al., 2020; Ravati et al., 2000). En base a estos estudios, decidimos abordar como afecta el IPC a la acumulación de especies reactivas de oxígeno donde el IPC previo disminuye las ROS, tanto la formación de anión superóxido como de peróxido de hidrógeno. De hecho, nuestros resultados no muestran cambios de movilidad electroforética entre condiciones, sin embargo, si se observan diferentes estados oxidados de CAPN2 en neuronas tras la isquemia y como el IPC previene su aparición. Además, en nuestros resultados se ha identificado que la localización nuclear de CAPN2 se induce por peróxido de hidrógeno.

Los niveles elevados de ROS, que surgen tras la entrada de calcio, generan estrés oxidativo inducido tras la isquemia, ya que se superan los mecanismos antioxidantes intracelulares, se produce un desequilibrio en la homeostasis del oxígeno y un entorno oxidativo dentro de la célula. Entre los radicales libres, se encuentran el anión superóxido y H_2O_2 , que pueden generar daño oxidativo

a través de diversos mecanismos, ya que la oxidación de los lípidos puede dañar las estructuras celulares y provocar la muerte prematura de las células. La interacción con los ácidos nucleicos mitocondriales y nucleares también puede causar mutaciones o ruptura de doble cadena (Birch-Machin and Bowman 2016).

En el caso concreto de NUP88, una nucleoporina diana específica de calpaínas que se encuentra exclusivamente en contacto con el citoplasma (Köhler et al. 2010), la hace más vulnerable al estrés oxidativo. Además, la oxidación provoca la acumulación de agregados proteicos en el poro nuclear, compuestos por NUPs y proteínas transportadoras que podría conducir a un aumento de la reactividad de estas (Kodiha et al. 2008).

A pesar de que hemos comprobado que el peróxido de hidrógeno promueve la translocación nuclear de CAPN2 en neuronas corticales de ratón y que el tratamiento antioxidante lo previene, no se conoce el mecanismo por el cual CAPN2 se transloca al núcleo mediado por la formación de ROS.

En virtud de los hallazgos obtenidos y la literatura consultada, se puede afirmar que el preconditionamiento isquémico influiría en la regulación de las calpaínas, mediante la expresión génica y su actividad a través del control del heterodímero entre CAPN2/CSS1-CSS2, impidiendo la interacción prolongada del complejo CAPN2/CAST. Asimismo, se restringiría la translocación nuclear debido a la pérdida de accesibilidad del residuo Arg417.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral nos permiten realizar las siguientes conclusiones:

1. El modelo de preconditionamiento isquémico realizado in vivo, reduce el volumen de infarto inducida por la isquemia/reperfusión de manera tiempo-dependiente, lo que confirma la función protectora del preconditionamiento en el cerebro de ratón en respuesta al daño isquémico.

El efecto protector in vivo, se acompaña de la reducción en la expresión de las isoformas de calpaínas mayoritarias en cerebro, la calpaína 1 y la calpaína 2, al mismo tiempo que promueve la disminución en su actividad en respuesta al daño isquémico. Todo ello, pone de manifiesto la relevancia fisiológica del sistema de las calpaínas durante la tolerancia isquémica neuronal inducida por el preconditionamiento.

2. El preconditionamiento previene el aumento en los niveles de expresión de ambas isoformas de calpaínas, calpaína-1 y calpaína-2, sin afectar a los niveles de ARNm, inducida tras la reoxigenación de 4 horas después de la isquemia experimental. Estos resultados parecen indicar que el preconditionamiento podría inducir modificaciones postraduccionales que serían responsables de los cambios observados en las neuronas corticales.
3. En las neuronas corticales, y tras 4 horas de reoxigenación, la isquemia experimental induce, de manera tiempo-dependiente, la activación de las calpaínas, analizada a través de la proteólisis de fodrina. Sin embargo, las neuronas preconditionadas presentaron reducida la actividad de las calpaínas en respuesta al daño isquémico.

4. La modulación de la expresión de CAPN1 y CAPN2, mediante el uso de la técnica de RNA de interferencia, en las neuronas corticales redujo los niveles de expresión y de actividad de las calpaínas, lo que previno la apoptosis neuronal tras la isquemia experimental. Dicho efecto se confirmó mediante una aproximación farmacológica con el tratamiento de inhibidores específicos de la actividad de las calpaínas. Por tanto, ambas estrategias mimetizan el efecto neuroprotector asociado al preconditionamiento en neuronas corticales de ratón y ponen en evidencia nuevamente la función esencial de las calpaínas durante la tolerancia isquémica neuronal.
5. Los resultados muestran la traslocación nuclear de CAPN2, pero no de CAPN1, tras la isquemia, que se previene con el preconditionamiento isquémico. De hecho, gracias a las herramientas de predicción in silico, hemos identificado un posible sitio de localización nuclear de CAPN2 hasta el momento no conocido.
6. El preconditionamiento previene la formación del heterodímero entre la subunidad catalítica de CAPN2 y la reguladora CSS1-CSS2 y, en consecuencia, promueve la desestabilización de CAPN2 y los cambios de localización observados en respuesta a la isquemia experimental.
7. El aumento en los niveles de desfosforilación de CAPN2 promueve parcialmente la tolerancia neuronal sin afectar a los cambios de localización de la proteína. Estos resultados demostrarían que el equilibrio en los mecanismos de fosforilación/desfosforilación de CAPN2, podrían estar implicados en los cambios de agregación/solubilidad observados durante el condicionamiento previo a la isquemia.
8. El preconditionamiento isquémico ejerce un efecto preventivo sobre la formación de especies reactivas de oxígeno, incluyendo el peróxido de hidrógeno. Además, se ha observado que este proceso favorece la

translocación de CAPN2 hacia el núcleo. En contraposición, el tratamiento antioxidante con glutatión previene tanto el aumento en la expresión, el estado oxidado de CAPN2 y su localización nuclear, inducidos tras la isquemia experimental. Estos resultados parecen indicar que las especies reactivas de oxígeno podrían estar implicadas en los diferentes estados de oxidación de CAPN2, en su estabilidad y en la regulación del tráfico nucleocitoplasmático de CAPN2.

9. El preconditionamiento induce una reducción en la formación del complejo enzima-inhibidor Calpaina-2/Calpastatina en las neuronas, lo que parece evitar la proteólisis y la pérdida de la actividad inhibidora del inhibidor endógeno, la calpastatina. La prevención en la formación del complejo CAPN2/CAST mediada por el preconditionamiento parece ser uno de los mecanismos responsables de la tolerancia isquémica neuronal.

CONCLUSIÓN

FINAL

En resumen, los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral confirman la importante función que tiene el preconditionamiento en la protección cerebral, reduciendo la lesión frente a un daño isquémico subsiguiente.

La tolerancia neuronal inducida por el preconditionamiento se debe, al menos en parte, a la función del sistema de las calpaínas en la inactivación de la caspasa-3 y la apoptosis neuronal inducida tras la isquemia.

Hemos demostrado que el sistema de las calpaínas se regula durante el preconditionamiento isquémico, a través de dos mecanismos principales: 1) reduciendo los niveles de expresión de las dos formas principales CAPN1 y CAPN2 en el cerebro y previniendo el aumento en su actividad; 2) previniendo la localización nuclear específica de CAPN2 inducido tras el daño isquémico. En concreto, durante el preconditionamiento isquémico, la regulación nucleocitoplasmática de CAPN2 parece implicar modificaciones postraduccionales, mediadas por cambios en la interacción proteína-proteína y la presencia de especies reactivas de oxígeno. Así, el preconditionamiento promueve la desestabilización del heterodímero CAPN2/CSS1/CSS2, lo que, a su vez, es responsable de los cambios nucleocitoplasmáticos observados. Finalmente, el preconditionamiento modula la formación del complejo enzima-inhibidor Calpaina-2/Calpastatina, manteniendo la función inhibidora de las Calpastatina, lo que promueve la tolerancia isquémica neuronal.

En un futuro, creemos que profundizar en estos conocimientos podría ayudar a posicionar al sistema de las calpaínas y a sus proteínas relacionadas, como importantes dianas moleculares en el mantenimiento de la integridad celular y en el control entre la muerte y la supervivencia en respuesta al daño isquémico. Dilucidar los mecanismos de regulación del sistema calpaína permitiría desarrollar estrategias novedosas de prevención y pronóstico asociados a la tolerancia isquémica en pacientes con ictus y AIT reciente.

BIBLIOGRAFÍA

15908315. (n.d.).

Aboa-Eboulé, C., Béjot, Y., Osseby, G. V., Rouaud, O., Binquet, C., Marie, C., Cottin, Y., Giroud, M., & Bonithon-Kopp, C. (2011). Influence of prior transient ischaemic attack on stroke prognosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *82*(9), 993–1000.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.209171>

Ackermann, A., & Brieger, A. (2019). The Role of Nonerythroid Spectrin all in Cancer. In *Journal of Oncology* (Vol. 2019). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2019/7079604>

Almeida, A., Almeida, J., Bolañ, J. P., & Moncada, S. (n.d.). *Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: The role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection*. <https://www.pnas.org>

Almeida, A., Delgado-Esteban, M., Bolaños, J. P., & Medina, J. M. (2002). Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *Journal of Neurochemistry*, *81*(2), 207–217.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00827.x>

Aluja, D., Inserte, J., Penela, P., Ramos, P., Ribas, C., Iñiguez, M. Á., Mayor, F., & Garcia-Dorado, D. (2019). Calpains mediate isoproterenol-induced hypertrophy through modulation of GRK2. *Basic Research in Cardiology*, *114*(3). <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0730-5>

Amin, H. P., Madsen, T. E., Bravata, D. M., Wira, C. R., Johnston, S. C., Ashcraft, S., Burrus, T. M., Panagos, P. D., Wintermark, M., & Esenwa, C. (2023). Diagnosis, Workup, Risk Reduction of Transient Ischemic Attack in the Emergency Department Setting: A Scientific Statement From the American Heart Association. In *Stroke* (Vol. 54, Issue 3, pp. E109–E121). Wolters Kluwer Health.
<https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000418>

Baitinger, C., & CHENEY Trun, R. (1987). Translocations of Fodrin and its Binding Proteins. In *Brain Research Builefin* (Vol. 18).

Bano, D., Dinsdale, D., Cabrera-Socorro, A., Maida, S., Lambacher, N., McColl, B., Ferrando-May, E., Hengartner, M. O., & Nicotera, P. (2010). Alteration of the nuclear pore complex in Ca²⁺-mediated cell death. *Cell Death*

- and Differentiation*, 17(1), 119–133.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2009.112>
- Barrio, E., Vecino, R., Sánchez-morán, I., Rodríguez, C., Suárez-pindado, A., Bolaños, J. P., Almeida, A., & Delgado-esteban, M. (2021). Preconditioning-activated akt controls neuronal tolerance to ischemia through the mdm2–p53 pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14). <https://doi.org/10.3390/ijms22147275>
- Baudry, M. (2019). Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekyll and Mr Hyde? *Current Neuropharmacology*, 17(9), 823–829.
<https://doi.org/10.2174/1570159x17666190228112451>
- Baudry, M., & Bi, X. (2016). Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 39, Issue 4, pp. 235–245). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.007>
- Bever, M. B., & Neumar, R. W. (2008a). Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 28, Issue 4, pp. 655–673).
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600595>
- Bever, M. B., & Neumar, R. W. (2008b). Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 28, Issue 4, pp. 655–673).
<https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600595>
- Blomgren, K., Mcrae, A., Bona, E., Saido, T. C., Karlsson, J.-O., & Hagberg, H. (1995). Degradation of fodrin and MAP 2 after neonatal cerebral hypoxic-ischemia. In *Brain Research* (Vol. 684).
- Bobo-Jiménez, V., Delgado-Esteban, M., Angibaud, J., Sánchez-Morán, I., De La Fuente, A., Yajeya, J., Nägerl, U. V., Castillo, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2017). APC/CCdh1-Rock2 pathway controls dendritic integrity and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4513–4518.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1616024114>
- Bolaños, J. P. (2016). Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *Journal of Neurochemistry*, 139, 115–125.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13486>

- Briz, V., & Baudry, M. (2017). Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. In *Neuroscientist* (Vol. 23, Issue 3, pp. 221–231). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1073858416649178>
- Burda, R., Burda, J., & Morochovič, R. (2023). Ischemic Tolerance—A Way to Reduce the Extent of Ischemia–Reperfusion Damage. *Cells*, *12*(6), 884. <https://doi.org/10.3390/cells12060884>
- Cao, G., Xing, J., Xiao, X., Liou, A. K. F., Gao, Y., Yin, X. M., Clark, R. S. B., Graham, S. H., & Chen, J. (2007). Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *Journal of Neuroscience*, *27*(35), 9278–9293. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2826-07.2007>
- Carlin, K. R. M., Huff-Lonergan, E., Rowe, L. J., & Lonergan, S. M. (n.d.). *Effect of oxidation, pH, and ionic strength on calpastatin inhibition of-and m-calpain*. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/84/4/925/4804226>
- Castillo, J., Ngeles Moro, M. A. ´, Blanco, M., Leira, R., Serena, J., Lizasoain, I., & Dávalos, A. (2003). *The Release of Tumor Necrosis Factor-is Associated with Ischemic Tolerance in Human Stroke*.
- Chang, H., Sheng, J. J., Zhang, L., Yue, Z. J., Jiao, B., Li, J. S., & Yu, Z. Bin. (2015). ROS-Induced Nuclear Translocation of Calpain-2 Facilitates Cardiomyocyte Apoptosis in Tail-Suspended Rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, *116*(10), 2258–2269. <https://doi.org/10.1002/jcb.25176>
- Chatterjee, S., Gu, Z.-Q., Dunn, D., Tao, M., Josef, K., Tripathy, R., Bihovsky, R., Senadhi, S. E., O’kane, T. M., Mckenna, B. A., Mallya, S., Ator, M. A., Bozyczko-Coyne, D., Siman, R., & Mallamo, J. P. (1998). *Communications to the Editor D-Amino Acid Containing, High-Affinity Inhibitors of Recombinant Human Calpain I †*.
- Chen, H. S. V., & Lipton, S. A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 97, Issue 6, pp. 1611–1626). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03991.x>
- Chen, M., He, H., Zhan, S., Krajewski, S., Reed, J. C., & Gottlieb, R. A. (2001). Bid is Cleaved by Calpain to an Active Fragment in Vitro and during Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(33), 30724–30728. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103701200>

- Chicharro, R., Alonso, M., Arán, V., & Herradón, B. (2008). *Studies on calpain inhibitors. Synthesis of partially reduced isoquinoline-1-thione derivatives and conversion to functionalized 1-chloroisoquinolines*. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.02.023>
- Choi, Y. H., Laaker, C., Hsu, M., Cismaru, P., Sandor, M., & Fabry, Z. (2021). Molecular mechanisms of neuroimmune crosstalk in the pathogenesis of stroke. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22179486>
- Chu, C. T., Plowey, E. D., Wang, Y., Patel, V., & Jordan-Sciutto, K. L. (n.d.). *Location, Location, Location: Altered Transcription Factor Trafficking in Neurodegeneration*.
- Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R., & Ehrmann, M. (2011). HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(3), 152–162. <https://doi.org/10.1038/nrm3065>
- Colàs-Campàs, L., Farre, J., Mauri-Capdevila, G., Molina-Seguín, J., Aymerich, N., Ois, Á., Roquer, J., Tur, S., García-Carreira, M. del C., Martí-Fàbregas, J., Cruz-Culebras, A., Segura, T., Arque, G., & Purroy, F. (2020). Inflammatory Response of Ischemic Tolerance in Circulating Plasma: Preconditioning-Induced by Transient Ischemic Attack (TIA) Phenomena in Acute Ischemia Patients (AIS). *Frontiers in Neurology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.552470>
- Costa, M. I., Sarmiento-Ribeiro, A. B., & Gonçalves, A. C. (2023). Zinc: From Biological Functions to Therapeutic Potential. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24054822>
- Curcio, M., Salazar, I. L., Mele, M., Canzoniero, L. M. T., & Duarte, C. B. (2016). Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: The swiss knife in synaptic injury. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 143, pp. 1–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.06.001>
- Da SilvaCosta, F. L., Teixeira, R. K. C., Yamaki, V. N., Valente, A. L., Silva, A. M. F., Brito, M. V. H., & Percário, S. (2015). Remote ischemic conditioning temporarily improves antioxidant defense. *Journal of Surgical Research*, 200(1), 105–109. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.07.031>
- de la Fuente, S., Sansa, A., Hidalgo, I., Vivancos, N., Romero-Guevara, R., Garcera, A., & Soler, R. M. (2020). Calpain system is altered in survival

- motor neuron-reduced cells from in vitro and in vivo spinal muscular atrophy models. *Cell Death and Disease*, 11(6).
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2688-5>
- De Tullio, R., Aversa, M., Pedrazzi, M., Sparatore, B., Salamino, F., Pontremoli, S., & Melloni, E. (2014). Differential regulation of the calpain-calpastatin complex by the L-domain of calpastatin. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2583–2591.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.07.002>
- De Tullio, R., Aversa, M., Salamino, F., Pontremoli, S., & Melloni, E. (2000). Differential degradation of calpastatin by μ - and m-calpain in Ca²⁺-enriched human neuroblastoma LAN-5 cells. *FEBS Letters*, 475(1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01613-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01613-6)
- Delgado-Esteban, M., García-Higuera, I., Maestre, C., Moreno, S., & Almeida, A. (2013). APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nature Communications*, 4.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3879>
- Delgado-Esteban, M., Martin-Zanca, D., Andres-Martin, L., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2007). Inhibition of PTEN by peroxynitrite activates the phosphoinositide-3-kinase/Akt neuroprotective signaling pathway. *Journal of Neurochemistry*, 102(1), 194–205.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04450.x>
- Demarchi, F., Bertoli, C., Copetti, T., Tanida, I., Brancolini, C., Eskelinen, E. L., & Schneider, C. (2006). Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 175(4), 595–605.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200601024>
- Dirnagl, U., Becker, K., & Meisel, A. (2009). Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. In *The Lancet Neurology* (Vol. 8, Issue 4, pp. 398–412).
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70054-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70054-7)
- Dirnagl, U., Simon, R. P., & Hallenbeck, J. M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 26, Issue 5, pp. 248–254). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00071-7](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00071-7)
- 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>

- Easton, J. D., Saver, J. L., Albers, G. W., Alberts, M. J., Chaturvedi, S., Feldmann, E., Hatsukami, T. S., Higashida, R. T., Johnston, S. C., Kidwell, C. S., Lutsep, H. L., Miller, E., & Sacco, R. L. (2009). Definition and evaluation of transient ischemic attack: A scientific statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association stroke council; council on cardiovascular surgery and anesthesia; council on cardiovascular radiology and intervention; council on cardiovascular nursing; and the interdisciplinary council on peripheral vascular disease. In *Stroke* (Vol. 40, Issue 6, pp. 2276–2293).
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.192218>
- Fan, Y. Y., Hu, W. W., Nan, F., & Chen, Z. (2017). Postconditioning-induced neuroprotection, mechanisms and applications in cerebral ischemia. In *Neurochemistry International* (Vol. 107, pp. 43–56). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.01.006>
- Fernández-Montalván, A., Assfalg-Machleidt, I., Pfeiler, D., Fritz, H., Jochum, M., & Machleidt, W. (2006). μ -Calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca²⁺-activated conformation. *Biological Chemistry*, 387(5), 617–627.
<https://doi.org/10.1515/BC.2006.079>
- Franco, S. J., & Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: Calpains make the cut. In *Journal of Cell Science* (Vol. 118, Issue 17, pp. 3829–3838). <https://doi.org/10.1242/jcs.02562>
- Fukuda, S., Harada, K., Kunimatsu, M., Sakabe, T., & Yoshida, K. I. (1998). Postischemic reperfusion induces α -fodrin proteolysis by m-calpain in the synaptosome and nucleus in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 70(6), 2526–2532. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70062526.x>
- Gerónimo-Olvera, C., Montiel, T., Rincon-Heredia, R., Castro-Obregón, S., & Massieu, L. (2017). Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2911–e2911. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.299>

- Gidday, J. M. (2006). Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 7, Issue 6, pp. 437–448).
<https://doi.org/10.1038/nrn1927>
- Gidday, J. M. (2010). Pharmacologic Preconditioning: Translating the Promise. In *Translational Stroke Research* (Vol. 1, Issue 1, pp. 19–30). Springer US. <https://doi.org/10.1007/s12975-010-0011-y>
- Gil-Parrado, S., Popp, O., Knoch, T. A., Zahler, S., Bestvater, F., Felgenträger, M., Holloschi, A., Fernández-Montalván, A., Auerswald, E. A., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Machleidt, W., & Spiess, E. (2003). Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous μ -calpain. *Journal of Biological Chemistry*, 278(18), 16336–16346.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M208657200>
- Gladding, C. M., Fan, J., Zhang, L. Y. J., Wang, L., Xu, J., Li, E. H. Y., Lombroso, P. J., & Raymond, L. A. (2014). Alterations in STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase expression, activation, and downstream signaling in early and late stages of the YAC128 Huntington’s disease mouse model. *Journal of Neurochemistry*, 130(1), 145–159.
<https://doi.org/10.1111/jnc.12700>
- Glading, A., Bodnar, R. J., Reynolds, I. J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D. A., Blair, H. C., & Wells, A. (2004). Epidermal Growth Factor Activates m-Calpain (Calpain II), at Least in Part, by Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mediated Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 24(6), 2499–2512. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.6.2499-2512.2004>
- Glantz, L., Avramovich, A., Trembovler, V., Gurvitz, V., Kohen, R., Eidelman, L. A., & Shohami, E. (2005). Ischemic preconditioning increases antioxidants in the brain and peripheral organs after cerebral ischemia. *Experimental Neurology*, 192(1), 117–124.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.012>
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). *The Calpain System*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2002>.-The
- Gomez-Sanchez, J. C., Delgado-Esteban, M., Rodriguez-Hernandez, I., Sobrino, T., De La Ossa, N. P., Reverte, S., Bolaños, J. P., Gonzalez-Sarmiento, R., Castillo, J., & Almeida, A. (2011). The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 429–437.
<https://doi.org/10.1084/jem.20101523>

- Goudenege, S., Poussard, S., Dulong, S., & Cottin, P. (2005). Biologically active milli-calpain associated with caveolae is involved in a spatially compartmentalised signalling involving protein kinase C alpha and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(9), 1900–1910. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.04.010>
- Gutiérrez-Zúñiga, R., Fuentes, B., & Díez-Tejedor, E. (2019). Ischemic stroke. Cerebral infarction and transient ischemic attack. *Medicine (Spain)*, 12(70), 4085–4096. <https://doi.org/10.1016/j.med.2019.01.002>
- Guttmann, R. P., & Johnson, G. V. W. (1998). Oxidative stress inhibits calpain activity in situ. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13331–13338. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.13331>
- Hanna, R. A., Campbell, R. L., & Davies, P. L. (2008). Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*, 456(7220), 409–412. <https://doi.org/10.1038/nature07451>
- Hao, Y., Xin, M., Feng, L., Wang, X., Wang, X., Ma, D., & Feng, J. (2020a). Review Cerebral Ischemic Tolerance and Preconditioning: Methods, Mechanisms, Clinical Applications, and Challenges. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00812>
- Hao, Y., Xin, M., Feng, L., Wang, X., Wang, X., Ma, D., & Feng, J. (2020b). Review Cerebral Ischemic Tolerance and Preconditioning: Methods, Mechanisms, Clinical Applications, and Challenges. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00812>
- Hata, S., Kitamura, F., Yamaguchi, M., Shitara, H., Murakami, M., & Sorimachi, H. (2016). A gastrointestinal calpain complex, G-calpain, is a heterodimer of CAPN8 and CAPN9 calpain isoforms, which play catalytic and regulatory roles, respectively. *Journal of Biological Chemistry*, 291(53), 27313–27322. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.763912>
- Hernando, V., Inserte, J., Sartório, C. L., Parra, V. M., Poncelas-Nozal, M., & Garcia-Dorado, D. (2010). Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(2), 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.02.024>

- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). THE UBIQUITIN SYSTEM. In *Annu. Rev. Biochem* (Vol. 67). www.annualreviews.org
- Hewitt, K. E., Lesiuk, H. J., Tauskela, J. S., Morley, P., & Durkin, J. P. (1998). Selective Coupling of μ -Calpain Activation With the NMDA Receptor Is Independent of Translocation and Autolysis in Primary Cortical Neurons. In *J. Neurosci. Res* (Vol. 54).
- Hewitt, K. E., Stys, P. K., & Lesiuk, H. J. (2001). The use-dependent sodium channel blocker mexiletine is neuroprotective against global ischemic injury. In *Brain Research* (Vol. 898). www.elsevier.com/locate/bres
- Hood, J. L., Brooks, W. H., & Roszman, T. L. (2006). Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: An organelle transient. In *BioEssays* (Vol. 28, Issue 8, pp. 850–859). <https://doi.org/10.1002/bies.20440>
- Hoshino, H., Itoh, Y., Yamada, S., & Suzuki, N. (2013). Prevalence and clinical features of asymptomatic peripheral artery disease in Japanese stroke patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 22(3), 255–259. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.08.011>
- Iadecola, C. (2016). Untangling Neurons with Endothelial Nitric Oxide. In *Circulation Research* (Vol. 119, Issue 10, pp. 1052–1054). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309927>
- Incebacak Eltemur, R. D., Nguyen, H. P., & Weber, J. J. (2022). Calpain-mediated proteolysis as driver and modulator of polyglutamine toxicity. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1020104>
- Inomata, M., Hayashi, M., Nakamura, M., Saito, Y., & Kawashima, S. (1989). Properties of erythrocyte membrane binding and autolytic activation of calcium-activated neutral protease. *Journal of Biological Chemistry*, 264(31), 18838–18843. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)51543-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)51543-x)
- Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Agulló, L., Pina, P., & Soler-Soler, J. (2004). Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovascular Research*, 64(1), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.06.001>
- Jimenez-Blasco, D., Santofimia-Castanõ, P., Gonzalez, A., Almeida, A., & Bolanõs, J. P. (2015). Astrocyte NMDA receptors' activity sustains

- neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. *Cell Death and Differentiation*, 22(11), 1877–1889.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2015.49>
- Jin, N., Yin, X., Yu, D., Cao, M., Gong, C. X., Iqbal, K., Ding, F., Gu, X., & Liu, F. (2015). Truncation and activation of GSK-3 β by calpain I: A molecular mechanism links to tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08187>
- Jing Liu. (n.d.).
- Juurlink, B. H. J., & Hertz, L. (1993). Ischemia-induced death of astrocytes and neurons in primary culture: pitfalls in quantifying neuronal cell death. In *Developmental Brain Research* (Vol. 71).
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 298, pp. 229–317). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Katan, M., & Luft, A. (2018). Global Burden of Stroke. *Seminars in Neurology*, 38(2), 208–211. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1649503>
- Kevin K.W. Wang. (n.d.). *wang2000*.
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Saido, T. C., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Yagita, Y., Mabuchi, T., Yanagihara, T., & Hori, M. (1999a). Species Differences in Fodrin Proteolysis in the Ischemic Brain. In *J. Neurosci. Res* (Vol. 55).
- Kitagawa, K., Matsumoto, M., Saido, T. C., Ohtsuki, T., Kuwabara, K., Yagita, Y., Mabuchi, T., Yanagihara, T., & Hori, M. (1999b). Species Differences in Fodrin Proteolysis in the Ischemic Brain. In *J. Neurosci. Res* (Vol. 55).
- Kuo, P. C., Weng, W. T., Scofield, B. A., Furnas, D., Paraiso, H. C., Intriago, A. J., Bosi, K. D., Yu, I. C., & Yen, J. H. (2020). Interferon- β alleviates delayed tPA-induced adverse effects via modulation of MMP3/9 production in ischemic stroke. *Blood Advances*, 4(18), 4366–4381.
<https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020001443>
- Lai, T. W., Zhang, S., & Wang, Y. T. (2014). Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 115, Issue C, pp. 157–188). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>

- Lambert, M. W. (2018). Spectrin and its interacting partners in nuclear structure and function. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 243, Issue 6, pp. 507–524). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1535370218763563>
- Lametsch, R., Lonergan, S., & Huff-Lonergan, E. (2008). Disulfide bond within μ -calpain active site inhibits activity and autolysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1784(9), 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.04.018>
- Landman, T. R. J., Schoon, Y., Warlé, M. C., Meijer, F. J. A., Leeuw, F. E. De, & Thijssen, D. H. J. (2023). The effect of repeated remote ischemic postconditioning after an ischemic stroke (REPOST): A randomized controlled trial. *International Journal of Stroke*, 18(3), 296–303. <https://doi.org/10.1177/17474930221104710>
- Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., & Corbett, A. H. (2007). Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α . In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 282, Issue 8, pp. 5101–5105). <https://doi.org/10.1074/jbc.R600026200>
- Lee, H. I., Park, J. H., Park, M. Y., Kim, N. G., Park, K. J., Choi, B. T., Shin, Y. I., & Shin, H. K. (2016). Pre-conditioning with transcranial low-level light therapy reduces neuroinflammation and protects blood-brain barrier after focal cerebral ischemia in mice. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 34(2), 201–214. <https://doi.org/10.3233/RNN-150559>
- Leung, D., Abbenante, G., & Fairlie, D. P. (2000). Protease inhibitors: Current status and future prospects. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 43, Issue 3, pp. 305–341). <https://doi.org/10.1021/jm990412m>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. In *Cell* (Vol. 132, Issue 1, pp. 27–42). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Li, S., Hafeez, A., Noorulla, F., Geng, X., Shao, G., Ren, C., Lu, G., Zhao, H., Ding, Y., & Ji, X. (2017). Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 157, pp. 79–91). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.001>
- Li, Y., Bondada, V., Joshi, A., & Geddes, J. W. (2009). Calpain 1 and Calpastatin expression is developmentally regulated in rat brain. *Experimental Neurology*, 220(2), 316–319. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.004>

- Liang, J., Han, R., & Zhou, B. (2021). Metabolic reprogramming: Strategy for ischemic stroke treatment by ischemic preconditioning. In *Biology* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology10050424>
- Lipton, P. (1999). *Ischemic Cell Death in Brain Neurons*.
- Liu, A., Guo, E., Yang, J., Li, R., Yang, Y., Liu, S., Hu, J., Jiang, X., Dirsch, O., Dahmen, U., Sun, J., & Ouyang, M. (2016). Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion injury in rat steatotic liver: role of heme oxygenase-1-mediated autophagy. In *Oncotarget* (Vol. 7, Issue 48). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Liu, C., Chen, S., Kamme, F., & Hu, B. R. (2005). Ischemic preconditioning prevents protein aggregation after transient cerebral ischemia. *Neuroscience*, *134*(1), 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.036>
- Liu, F., & McCullough, L. D. (2014). *The Middle Cerebral Artery Occlusion Model of Transient Focal Cerebral Ischemia* (pp. 81–93). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7_7
- Liu, P., Zhang, Z., Guo, X., Zhu, X., Mao, X., Guo, X., Deng, X., & Zhang, J. (2021). μ -Calpain oxidation and proteolytic changes on myofibrillar proteins from *Coregonus Peled* in vitro. *Food Chemistry*, *361*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130100>
- Madden, D. T., Egger, L., & Bredesen, D. E. (2007). A calpain-like protease inhibits autophagic cell death. In *Autophagy* (Vol. 3, Issue 5, pp. 518–521). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/auto.4052>
- Maestre, C., Delgado-Esteban, M., Gomez-Sanchez, J. C., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2008). Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *EMBO Journal*, *27*(20), 2736–2745. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.195>
- Mclaughlin, B., Hartnett, K. A., Erhardt, J. A., Legos, J. J., White, R. F., Barone, F. C., & Aizenman, E. (2002). *Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0232966100
- Melloni, E., Averna, M., Salamino, F., Sparatore, B., Minafra, R., & Pontremoli, S. (2000). *Acyl-CoA-binding Protein Is a Potent m-Calpain Activator**. <http://www.jbc.org/>

- Melloni, E., Averna, M., Stifanese, R., De Tullio, R., Defranchi, E., Salamino, F., & Pontremoli, S. (2006). Association of calpastatin with inactive calpain: A novel mechanism to control the activation of the protease? *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24945–24954.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M601449200>
- Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B., & Pontremoli, S. (1998). *Mechanism of Action of a New Component of the Ca²⁺-Dependent Proteolytic System in Rat Brain: The Calpain Activator* (Vol. 249).
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: The role of glucose in physiological and pathological brain function. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 36, Issue 10, pp. 587–597).
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>
- Mingorance-Le Meur, A., & O'Connor, T. P. (2009). Neurite consolidation is an active process requiring constant repression of protrusive activity. *EMBO Journal*, 28(3), 248–260.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2008.265>
- Miyazaki, T., Akasu, R., & Miyazaki, A. (2020). Calpain proteolytic systems counteract endothelial cell adaptation to inflammatory environments. In *Inflammation and Regeneration* (Vol. 40, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00114-x>
- Molinari, M., Anagli, J., & Carafolis, E. (1994). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Ca²⁺-activated Neutral Protease Is Active in the Erythrocyte Membrane in Its Nonautolyzed 80-kDa Form** (Vol. 269, Issue 45).
- Molinari, M., & Carafoli, E. (1997). *Topical Review Calpain: A Cytosolic Proteinase Active at the Membranes Discovery and Initial Progress*.
- Mollet, I., Marto, J. P., Mendonça, M., Baptista, M. V., & Vieira, H. L. A. (2022). Remote but not Distant: a Review on Experimental Models and Clinical Trials in Remote Ischemic Conditioning as Potential Therapy in Ischemic Stroke. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 59, Issue 1, pp. 294–325). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02585-6>
- Momeni, H. R. (n.d.). *Role of Calpain in Apoptosis*.
- Monteiro, A. M., Couteiro, R. P., da Silva, D. F., Júnior, S. C. T., Silva, R. C., de Sousa, L. F. F., Dos Santos, D. R., Freitas, J. J. da S., & Brito, M. V. H. (2021). Remote ischemic conditioning improves rat brain antioxidant

- defense in a time-dependent mechanism. *Acta Cirurgica Brasileira*, 36(7). <https://doi.org/10.1590/ACB360707>
- Mosammaparast, N., & Pemberton, L. F. (2004). Karyopherins: From nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 14, Issue 10, pp. 547–556). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.004>
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (n.d.). *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in isChemic myocardium*. <http://ahajournals.org>
- Nakajima, T., Ochi, S., Oda, C., Ishii, M., & Ogawa, K. (2011). Ischemic preconditioning attenuates of ischemia-induced degradation of spectrin and tau: Implications for ischemic tolerance. *Neurological Sciences*, 32(2), 229–239. <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0359-5>
- Nguyen, H. Q., Zada, S., Lai, T. H., Pham, T. M., Hwang, J. S., Ahmed, M., & Kim, D. R. (2019). Calpain-dependent Beclin1 cleavage stimulates senescence-associated cell death in HT22 hippocampal cells under the oxidative stress conditions. *Neuroscience Letters*, 701, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.02.036>
- Ortuño-Sahagún, D., Pallàs, M., & Rojas-Mayorquín, A. E. (2014). Oxidative stress in aging: Advances in proteomic approaches. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/573208>
- Pal, G. P., Elce, J. S., & Jia, Z. (2001). Dissociation and Aggregation of Calpain in the Presence of Calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47233–47238. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105149200>
- Parr, T., Jewell, K. K., Sensky, P. L., Brameld, J. M., Bardsley, R. G., & Buttery, P. J. (2004). Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 427(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.04.001>
- Perez-Pinzon, M. A., Anne Stetler, R., & Fiskum, G. (2012). Novel mitochondrial targets for neuroprotection. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Vol. 32, Issue 7, pp. 1362–1376). <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.32>
- Perrin, B. J., & Huttenlocher, A. (2002). Molecules in focus Calpain. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (Vol. 34).

- Pico, F., Lapergue, B., Ferrigno, M., Rosso, C., Meseguer, E., Chadenat, M. L., Bourdain, F., Obadia, M., Hirel, C., Duong, D. L., Deltour, S., Aegerter, P., Labreuche, J., Cattenoy, A., Smadja, D., Hosseini, H., Guillon, B., Wolff, V., Samson, Y., ... Amarenco, P. (2020). Effect of In-Hospital Remote Ischemic Perconditioning on Brain Infarction Growth and Clinical Outcomes in Patients with Acute Ischemic Stroke: The RESCUE BRAIN Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, *77*(6), 725–734. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.0326>
- Podbielska, M., Das, A., Smith, A. W., Chauhan, A., Ray, S. K., Inoue, J., Azuma, M., Nozaki, K., Hogan, E. L., & Banik, N. L. (2016). Neuron-microglia interaction induced bi-directional cytotoxicity associated with calpain activation. *Journal of Neurochemistry*, *139*(3), 440–455. <https://doi.org/10.1111/jnc.13774>
- Poepsel, S., Sprengel, A., Sacca, B., Kaschani, F., Kaiser, M., Gatsogiannis, C., Raunser, S., Clausen, T., & Ehrmann, M. (2015). Determinants of amyloid fibril degradation by the PDZ protease HTRA1. *Nature Chemical Biology*, *11*(11), 862–869. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1931>
- Professor of Stroke Medicine, J., & Montgomery, A. (n.d.). *Sprigg, Nikola Professor in Stroke Medicine*.
- Pugliese, A. M., Latini, S., Corradetti, R., & Pedata, F. (2003). Brief, repeated, oxygen-glucose deprivation episodes protect neurotransmission from a longer ischemic episode in the in vitro hippocampus: Role of adenosine receptors. *British Journal of Pharmacology*, *140*(2), 305–314. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705442>
- Purroy, F., Arque, G., Mauri, G., García-Vázquez, C., Vicente-Pascual, M., Pereira, C., Vazquez-Justes, D., Torres-Querol, C., Vena, A., Abilleira, S., Cardona, P., Forné, C., Jiménez-Fàbrega, X., Pagola, J., Portero-Otin, M., Rodríguez-Campello, A., Rovira, À., & Martí-Fàbregas, J. (2020). REMOTE Ischemic Perconditioning Among Acute Ischemic Stroke Patients in Catalonia: REMOTE-CAT PROJECT. *Frontiers in Neurology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.569696>
- Purroy, F., García, C., Mauri, G., Pereira, C., Torres, C., Vazquez-Justes, D., Vicente-Pascual, M., Vena, A., & Arque, G. (2020). Induced neuroprotection by remote ischemic perconditioning as a new paradigm in ischemic stroke at the acute phase, a systematic review. In *BMC Neurology* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s12883-020-01836-8>

- Purroy, F., Suárez-Luis, I., Cambray, S., Farré, J., Benabdelhak, I., Mauri-Capdevila, G., Sanahuja, J., Quílez, A., Begué, R., Gil, M. I., Molina-Seguin, J., & Torreguitart, N. (2016). The determination of copeptin levels helps management decisions among transient ischaemic attack patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, *134*(2), 140–147. <https://doi.org/10.1111/ane.12523>
- Qin, J., Deng, X., Lei, Y., Liu, P., Lu, S., & Zhang, J. (2020). Effects of μ -calpain oxidation on *Coregonus peled* myofibrillar protein degradation in vitro. *Journal of Food Science*, *85*(3), 682–688. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15048>
- Ramos-Araque, M. E., Rodriguez, C., Vecino, R., Cortijo Garcia, E., de Lera Alfonso, M., Sanchez Barba, M., Colàs-Campàs, L., Purroy, F., Arenillas, J. F., Almeida, A., & Delgado-Esteban, M. (2019). The Neuronal Ischemic Tolerance Is Conditioned by the Tp53 Arg72Pro Polymorphism. *Translational Stroke Research*, *10*(2), 204–215. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0631-1>
- Rao, M. V., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., Yang, D. S., Schmidt, S. D., Stavrides, P. H., Campbell, J., Chen, Y., Jiang, Y., Paskevich, P. A., Cataldo, A. M., Haroutunian, V., & Nixon, R. A. (2008). Marked calpastatin (CAST) depletion in Alzheimer's disease accelerates cytoskeleton disruption and neurodegeneration: Neuroprotection by CAST overexpression. *Journal of Neuroscience*, *28*(47), 12241–12254. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4119-08.2008>
- Ravati, A., Ahlemeyer, B., Becker, A., Kriegelstein^{""}, J., & Kriegelstein^{""}, K. (2000). Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species. In *Brain Research* (Vol. 866). www.elsevier.com/locate/bres
- Raynaud, F., & Marcilhac, A. (2006). Implication of calpain in neuronal apoptosis: A possible regulation of Alzheimer's disease. In *FEBS Journal* (Vol. 273, Issue 15, pp. 3437–3443). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05352.x>
- Reichert, S. A., Sook Kim-Han, J., & Dugan, L. L. (2001). *The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Nitric Oxide Synthase Mediate Early Mitochondrial Depolarization in Astrocytes during Oxygen-Glucose Deprivation*.

- Ren, C., Gao, X., Niu, G., Yan, Z., Chen, X., & Zhao, H. (2008). Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats. *PLoS ONE*, *3*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003851>
- Rey, J., Breiden, M., Lux, V., Bluemke, A., Steindel, M., Ripkens, K., M€E, B., Bravo Rodriguez, K., Boisguerin, P., Volkmer, R., Mieres-Perez, J., Clausen, T., Sanchez-Garcia, E., & Ehrmann, M. (2022). *An allosteric HTRA1-calpain 2 complex with restricted activation profile*. <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Rodriguez, C., Agulla, J., & Delgado-Esteban, M. (2021). Refocusing the Brain: New Approaches in Neuroprotection Against Ischemic Injury. *Neurochemical Research*, *46*(1), 51–63. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03016-z>
- Rodríguez, C., Ramos-Araque, M. E., Domínguez-Martínez, M., Sobrino, T., Sánchez-Morán, I., Agulla, J., Delgado-Esteban, M., Gómez-Sánchez, J. C., Bolaños, J. P., Castillo, J., & Almeida, A. (2018). Single-nucleotide polymorphism 309T>G in the MDM2 promoter determines functional outcome after stroke. *Stroke*, *49*(10), 2437–2444. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.022529>
- Rodríguez, C., Sobrino, T., Agulla, J., Bobo-Jiménez, V., Ramos-Araque, M. E., Duarte, J. J., Gómez-Sánchez, J. C., Bolanões, J. P., Castillo, J., & Almeida, Á. (2017). Neovascularization and functional recovery after intracerebral hemorrhage is conditioned by the Tp53 Arg72Pro single-nucleotide polymorphism. *Cell Death and Differentiation*, *24*(1), 144–154. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.109>
- Rosenzweig, H. L., Lessov, N. S., Henshall, D. C., Minami, M., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2004). Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice. *Stroke*, *35*(11), 2576–2581. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143450.04438.ae>
- Rubtsov, A. M., & Lopina, O. D. (2000). *Minireview Ankyrins*.
- Salamino, F., De Tullio, R., Mengotti, P., Viotti, P. L., Melloni, E., & Pontremoli, S. (1993). Site-directed activation of calpain is promoted by a membrane-associated natural activator protein. In *Biochem. J* (Vol. 290).
- Sánchez-Morán, I., Rodríguez, C., Lapresa, R., Agulla, J., Sobrino, T., Castillo, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2020). Nuclear WRAP53 promotes

- neuronal survival and functional recovery after stroke. In *Sci. Adv* (Vol. 6).
- Severino, P. C., Muller, G. D. A. S., Vandresen-Filho, S., & Tasca, C. I. (2011). Cell signaling in NMDA preconditioning and neuroprotection in convulsions induced by quinolinic acid. *Life Sciences*, *89*(15–16), 570–576. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.014>
- Shang, J., Yamashita, T., Nakano, Y., Morihara, R., Li, X., Feng, T., Liu, X., Huang, Y., Fukui, Y., Hishikawa, N., Ohta, Y., & Abe, K. (2017). Aberrant distributions of nuclear pore complex proteins in ALS mice and ALS patients. *Neuroscience*, *350*, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.024>
- Shao, H., Chou, J., Baty, C. J., Burke, N. A., Watkins, S. C., Stolz, D. B., & Wells, A. (2006). Spatial Localization of m-Calpain to the Plasma Membrane by Phosphoinositide Biphosphate Binding during Epidermal Growth Factor Receptor-Mediated Activation. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(14), 5481–5496. <https://doi.org/10.1128/mcb.02243-05>
- Shashikala, S., Kumar, R., Thomas, N. E., Sivadasan, D., James, J., & Sengupta, S. (2013a). Fodrin in Centrosomes: Implication of a Role of Fodrin in the Transport of Gamma-Tubulin Complex in Brain. *PLoS ONE*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076613>
- Shashikala, S., Kumar, R., Thomas, N. E., Sivadasan, D., James, J., & Sengupta, S. (2013b). Fodrin in Centrosomes: Implication of a Role of Fodrin in the Transport of Gamma-Tubulin Complex in Brain. *PLoS ONE*, *8*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076613>
- Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z., & Wells, A. (2002). Activation of m-Calpain (Calpain II) by Epidermal Growth Factor Is Limited by Protein Kinase A Phosphorylation of m-Calpain. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(8), 2716–2727. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.8.2716-2727.2002>
- Shulga, N., & Pastorino, J. G. (2006). Acyl coenzyme A-binding protein augments Bid-induced mitochondrial damage and cell death by activating μ -calpain. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(41), 30824–30833. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602503200>
- Silva de Carvalho, T., Singh, V., Mohamud Yusuf, A., Wang, J., Schultz Moreira, A. R., Sanchez-Mendoza, E. H., Sardari, M., Nascentes Melo, L. M., Doepfner, T. R., Kehrmann, J., Scholtysik, R., Hitpass, L., Gunzer, M., & Hermann, D. M. (2022). Post-ischemic protein restriction induces

- sustained neuroprotection, neurological recovery, brain remodeling, and gut microbiota rebalancing. *Brain, Behavior, and Immunity*, 100, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.11.016>
- Siman, R., Baudry, M., & Lynch, G. (1984). Brain fodrin: Substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease (spectrin/cytoskeleton/synaptic membranes/plasticity). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 81).
- Simón, C., Vara, E., Garutti, I., González-Casaurrán, G., Azcárat, L., Isea, J., Huerta, L., & González-Aragoneses, F. (2012). Modulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by ischaemic preconditioning in a lung autotransplant model. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 41(4), 933–939. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezr049>
- Singh, R. B., Chohan, P. K., Dhalla, N. S., & Netticadan, T. (2004). The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37(1), 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.04.009>
- Smith, M. A., & Schnellmann, R. G. (2012a). Calpains, mitochondria, and apoptosis. In *Cardiovascular Research* (Vol. 96, Issue 1, pp. 32–37). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs163>
- Smith, M. A., & Schnellmann, R. G. (2012b). Calpains, mitochondria, and apoptosis. In *Cardiovascular Research* (Vol. 96, Issue 1, pp. 32–37). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs163>
- Smith, S. D., Jia, Z., Huynh, K. K., Wells, A., & Elce, J. S. (2003). Glutamate substitutions at a PKA consensus site are consistent with inactivation of calpain by phosphorylation. *FEBS Letters*, 542(1–3), 115–118. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00361-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00361-2)
- Sorimachi, H., Hata, S., & Ono, Y. (2011a). Calpain chronicle—an enzyme family under multidisciplinary characterization. In *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences* (Vol. 87, Issue 6, pp. 287–327). <https://doi.org/10.2183/pjab.87.287>
- Sorimachi, H., Hata, S., & Ono, Y. (2011b). Impact of genetic insights into calpain biology. In *Journal of Biochemistry* (Vol. 150, Issue 1, pp. 23–37). <https://doi.org/10.1093/jb/mvr070>

- Spinozzi, S., Albini, S., Best, H., & Richard, I. (2021). Calpains for dummies: What you need to know about the calpain family. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1869, Issue 5). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2021.140616>
- Sreeja, J. S., John, R., Dharmapal, D., Nellikka, R. K., & Sengupta, S. (2020a). A Fresh Look at the Structure, Regulation, and Functions of Fodrin. *Molecular and Cellular Biology*, *40*(17), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mcb.00133-20>
- Sreeja, J. S., John, R., Dharmapal, D., Nellikka, R. K., & Sengupta, S. (2020b). A Fresh Look at the Structure, Regulation, and Functions of Fodrin. *Molecular and Cellular Biology*, *40*(17), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mcb.00133-20>
- Storr, S. J., Carragher, N. O., Frame, M. C., Parr, T., & Martin, S. G. (2011). The calpain system and cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 11, Issue 5, pp. 364–374). <https://doi.org/10.1038/nrc3050>
- Su, W., Zhou, Q., Wang, Y., Chishti, A., Li, Q. Q., Dayal, S., Shiehzadegan, S., Cheng, A., Moore, C., Bi, X., & Baudry, M. (2020). Deletion of the Capn1 Gene Results in Alterations in Signaling Pathways Related to Alzheimer’s Disease, Protein Quality Control and Synaptic Plasticity in Mouse Brain. *Frontiers in Genetics*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00334>
- Sun, Y. I., & Oberley, L. W. (1996). REDOX REGULATION OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVATORS. In *J~ Review Article Free Radical Biology & Medicine* (Vol. 21, Issue 3).
- Sung, H. Y., Choi, E. N., Han, J., Chae, Y. J., Im, S. W., Kim, H. S., Park, E. M., & Ahn, J. H. (2021). Protective role of ABCA1 in ischemic preconditioning is mediated by downregulation of miR-33-5p and miR-135-5p. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91982-x>
- Tait, S. W. G., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 9, pp. 621–632). <https://doi.org/10.1038/nrm2952>
- Takano, J., Mihira, N., Fujioka, R., Hosoki, E., Chishti, A. H., & Saido, T. C. (2011). Vital Role of the Calpain-Calpastatin System for Placental-Integrity-Dependent Embryonic Survival. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(19), 4097–4106. <https://doi.org/10.1128/mcb.05189-11>

- Takano, J., Watanabe, M., Hitomi, K., & Maki, M. (2000). Four Types of Calpastatin Isoforms with Distinct Ammo-Terminal Sequences Are Specified by Alternative First Exons and Differentially Expressed in Mouse Tissues 1. In *J.Biochem* (Vol. 128).
- Takeda, M., Nishimura, T., Hariguchi, S., Tatebayashi, Y., Tanaka, T., Tanimukai, S., & Tade, K. (1991). Study of cytoskeletal proteins in fibroblasts cultured from familial Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, *84*(5), 416–420. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1991.tb04980.x>
- Tao, M., Bihovsky, R., Wells, G. J., & Mallamo, J. P. (1998). *Novel Peptidyl Phosphorus Derivatives as Inhibitors of Human Calpain I*.
- Telechea-Fernández, M., Rodríguez-Fernández, L., García, C., Zaragoza, R., Viña, J. R., Cervantes, A., & García-Trevijano, E. R. (2018). Oncotarget 9100 www.impactjournals.com/oncotarget New localization and function of calpain-2 in nucleoli of colorectal cancer cells in ribosomal biogenesis: effect of KRAS status. In *Oncotarget* (Vol. 9, Issue 10). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Tobalem, M., Wettstein, R., Pittet-Cuénod, B., Vigato, E., Machens, H. G., Lohmeyer, J. A., Rezaeian, F., & Harder, Y. (2013). Local shockwave-induced capillary recruitment improves survival of musculocutaneous flaps. *Journal of Surgical Research*, *184*(2), 1196–1204. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.03.040>
- Todd, B., Moore, D., Deivanayagam, C. C. S., Lin, G. Da, Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K. K. W., & Narayana, S. V. L. (2003). A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: Crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule inhibitor. *Journal of Molecular Biology*, *328*(1), 131–146. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00274-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00274-2)
- Tomai, F., Crea, F., Chiariello, L., & Gioffrè, P. A. (1999). *Ischemic Preconditioning in Humans Models, Mediators, and Clinical Relevance*. <http://www.circulationaha.org>
- Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilágyi, A., Bánóczy, Z., Hudecz, F., & Friedrich, P. (2004). On the sequential determinants of calpain cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(20), 20775–20785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313873200>

- Vaishnav, A., & Lutsep, H. L. (2002). GABA agonist: Clomethiazole. *Current Medical Research and Opinion*, 18(SUPPL. 2).
<https://doi.org/10.1185/030079902125000651>
- Vartanian, K. B., Stevens, S. L., Marsh, B. J., Williams-Karnesky, R., Lessov, N. S., & Stenzel-Poore, M. P. (2011). LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation*, 8.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-140>
- Veas-Pérez De Tudela, M., Maestre, C., Delgado-Esteban, M., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2015). Cdk5-mediated inhibition of APC/C-Cdh1 switches on the cyclin D1-Cdk4-pRb pathway causing aberrant S-phase entry of postmitotic neurons. *Scientific Reports*, 5.
<https://doi.org/10.1038/srep18180>
- Vecino, R., Burguete, M. C., Jover-Mengual, T., Agulla, J., Bobo-Jiménez, V., Salom, J. B., Almeida, A., & Delgado-Esteban, M. (2018). The MDM2-p53 pathway is involved in preconditioning-induced neuronal tolerance to ischemia. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19921-x>
- Vosler, P. S., Brennan, C. S., & Chen, J. (2008). Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. In *Molecular Neurobiology* (Vol. 38, Issue 1, pp. 78–100). Humana Press.
<https://doi.org/10.1007/s12035-008-8036-x>
- Wang, K. K. W., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R. A., Talanian, R. V, Keegan, M., Herzog, L., & Allen, H. (1998). *Caspase-Mediated Fragmentation of Calpain Inhibitor Protein Calpastatin during Apoptosis*.
- Wang, Y., Reis, C., Applegate, R., Stier, G., Martin, R., & Zhang, J. H. (2020). Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or post-stroke. In *Experimental Neurology* (pp. 26–40). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.04.009>
- wang2000. (n.d.).
- Weber, J. J., Kloock, S. J., Nagel, M., Ortiz-Rios, M. M., Hofmann, J., Riess, O., & Nguyen, H. P. (2018). Calpastatin ablation aggravates the molecular phenotype in cell and animal models of Huntington disease.

- Neuropharmacology*, 133, 94–106.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.01.022>
- Weber, J. J., Pereira Sena, P., Singer, E., & Nguyen, H. P. (2019a). Killing Two Angry Birds with One Stone: Autophagy Activation by Inhibiting Calpains in Neurodegenerative Diseases and beyond. In *BioMed Research International* (Vol. 2019). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2019/4741252>
- Weber, J. J., Pereira Sena, P., Singer, E., & Nguyen, H. P. (2019b). Killing Two Angry Birds with One Stone: Autophagy Activation by Inhibiting Calpains in Neurodegenerative Diseases and beyond. In *BioMed Research International* (Vol. 2019). Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2019/4741252>
- Weber, R., Diener, H. C., & Weimar, C. (2011). Why do acute ischemic stroke patients with a preceding transient ischemic attack present with less severe strokes? - Insights from the German stroke study. *European Neurology*, 66(5), 265–270. <https://doi.org/10.1159/000331593>
- Wells, G. J., Tao, M., Josef, K. A., & Bihovsky, R. (2001). 1,2-Benzothiazine 1,1-dioxide P2-P3 peptide mimetic aldehyde calpain I inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(21), 3488–3503.
<https://doi.org/10.1021/jm010178b>
- Wendt, A., Thompson, V. F., & Goll, D. E. (2004). Interaction of calpastatin with calpain: a review. In *Biol. Chem* (Vol. 385).
- Wright, A. L., & Vissel, B. (2016). CAST your vote: Is calpain inhibition the answer to ALS? In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 137, Issue 2, pp. 140–141). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.13296>
- Xu, L., & Deng, X. (2006a). Protein kinase C α promotes nicotine-induced migration and invasion of cancer cells via phosphorylation of μ - and m-calpains. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4457–4466.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M510721200>
- Xu, L., & Deng, X. (2006b). Suppression of cancer cell migration and invasion by protein phosphatase 2A through dephosphorylation of μ - and m-calpains. *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 35567–35575.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M607702200>
- Yamashita, T., Aizawa, H., Teramoto, S., Akamatsu, M., & Kwak, S. (2017). Calpain-dependent disruption of nucleo-cytoplasmic transport in ALS

- motor neurons. *Scientific Reports*, 7.
<https://doi.org/10.1038/srep39994>
- Yan, W., Cao, M., Ruan, X., Jiang, L., Lee, S., Lemanek, A., Ghassemian, M., Pizzo, D. P., Wan, Y., Qiao, Y., Chin, A. R., Duggan, E., Wang, D., Nolan, J. P., Esko, J. D., Schenk, S., & Wang, S. E. (2022). Cancer-cell-secreted miR-122 suppresses O-GlcNAcylation to promote skeletal muscle proteolysis. *Nature Cell Biology*, 24(5), 793–804. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00893-0>
- Yang, X., Wu, Q., Zhang, L., & Feng, L. (2016). Inhibition of histone deacetylase 3 (Hdac3) mediates ischemic preconditioning and protects cortical neurons against ischemia in rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(NOV2016). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00131>
- Yi, N. D., Waxman, E. A., & Lynch, D. R. (2004). Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience*, 24(49), 11035–11045. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3722-04.2004>
- Yoo, J. M., Lee, B. D., Sok, D. E., Ma, J. Y., & Kim, M. R. (2017). Neuroprotective action of N-acetyl serotonin in oxidative stress-induced apoptosis through the activation of both TrkB/CREB/BDNF pathway and Akt/Nrf2/Antioxidant enzyme in neuronal cells. *Redox Biology*, 11, 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.034>
- Youn, J. Y., Wang, T., & Cai, H. (2009). An Ezrin/Calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating vegf-dependent endothelial nitric oxide production. *Circulation Research*, 104(1), 50–59. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178467>
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., & Simon, H. U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, 8(10), 1124–1132. <https://doi.org/10.1038/ncb1482>
- Yunoki, M., Nishio, S., Ukita, N., Anzivino, M. J., & Lee, K. S. (2003). Hypothermic preconditioning induces rapid tolerance to focal ischemic injury in the rat. *Experimental Neurology*, 181(2), 291–300. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00056-6)
- Zalewska, T., Thompson, V. F., & Goll, D. E. (2004). Effect of phosphatidylinositol and inside-out erythrocyte vesicles on autolysis of μ - And m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica*

- Acta - Molecular Cell Research*, 1693(2), 125–133.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.06.002>
- Zhang, H., Chang, L., Zhang, H., Nie, J., Zhang, Z., Yang, X., Vuong, A. M., Wang, Z., Chen, A., & Niu, Q. (2017). Calpain-2/p35-p25/Cdk5 pathway is involved in the neuronal apoptosis induced by polybrominated diphenyl ether-153. *Toxicology Letters*, 277, 41–53.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.05.027>
- Zhang, Y., Liu, N. M., Wang, Y., Youn, J. Y., & Cai, H. (2017). Endothelial cell calpain as a critical modulator of angiogenesis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1863, Issue 6, pp. 1326–1335). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.03.021>
- Zhao, Y., Zhang, X., Chen, X., & Wei, Y. (2022). Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 49, Issue 2). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.5070>
- Zhou, J. H., Zhang, T. T., Song, D. D., Xia, Y. F., Qin, Z. H., & Sheng, R. (2016). TIGAR contributes to ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning through scavenging of reactive oxygen species and inhibition of apoptosis. *Scientific Reports*, 6.
<https://doi.org/10.1038/srep27096>
- Zurawa-Janicka, D., Wentka, T., Jarzab, M., Skorko-Glonek, J., Glaza, P., Gieldon, A., Ciarkowski, J., & Lipinska, B. (2017). Structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine proteases. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 621, pp. 6–23). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.04.004>