



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Programa de Doctorado Bioquímica y Biomedicina

PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA REMODELACIÓN TISULAR DE LA GLÁNDULA MAMARIA TRAS EL CICLO EMBARAZO/LACTANCIA.

Tesis doctoral presentada por:

Teresa Arnandis Chinesta

Directores:

Prof. Juan Viña Ribes

Prof. Luis Torres Asensi

Dr. Rosa Zaragoza Colom

D. JUAN VIÑA RIBES. Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

D. LUIS TORRES ASENSI. Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

D. ROSA ZARAGOZÁ COLOM. Doctora en Farmacia por la Universidad de Valencia. Investigadora del INCLIVA.

CERTIFICAN:

Que Dña. **TERESA ARNANDIS CHINESTA**, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo de investigación, titulado “PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA REMODELACIÓN TISULAR DE LA GLÁNDULA MAMARIA TRAS EL CICLO EMBARAZO/LACTANCIA” o “ ROLE OF CALPAINS DURING MAMMARY GLAND REMODELING AFTER THE PREGNANCY/LACTATION CYCLE”, el cual posee la suficiente calidad científica para ser presentado en la obtención del grado de Doctora en Bioquímica y Biomedicina.

Y para que conste a todos los efectos, firman la presente certificación.

En Valencia, a 28 de Enero de 2014.

Dr. Juan Viña Ribes

Dr. Luis Torres Asensi

Dra. Rosa Zaragoza Colom

El presente trabajo ha sido subvencionado con ayudas del Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2010-18253), de la Generalitat Valenciana (GVPROMETEO 2010-075) y con una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU), concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deportes.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar al Dr. D. Juan R. Viña, por abrirme las puertas de su laboratorio y por ofrecerme la oportunidad de realizar esta Tesis, así como por su dedicación, apoyo, gran experiencia y sabios consejos a lo largo de estos años. De entre ellos, podría mencionar una frase que recuerdo con frecuencia y pienso sea muy acertada: " la razón es, y será siempre esclava de la pasión" según David Hume y también como decía San Agustín: "critica a un sabio y te amará".

Dr. D. Luis Torres, que además de director también fue quién me introdujo en el mundo de la investigación, quién me contagió la curiosidad hacia lo desconocido y me transmitió su pasión y su entusiasmo a la hora de abordar cualquier cuestión científica.

Y en tercer lugar, y no por esto menos importante a la Dr. D. Rosa Zaragoza por haberme enseñado todo lo que se tiene que aprender en un laboratorio con paciencia y perseverancia, desde redactar un proyecto a cultivar líneas celulares. Consejera no solo experimental sino también profesional. Gracias por tu apoyo.

A los tres, ha sido un auténtico honor haber tenido la posibilidad de trabajar a vuestro lado.

Por otro lado también quería agradecer a toda la gente que ha compartido largas jornadas de laboratorio a mi lado:

A Concha García de Mier, porque siempre ha estado ahí y porque sin su ayuda no habría podido realizar todo el trabajo de esta Tesis. A Elena R. García-Trevijano por su gran experiencia y por ser un ejemplo de vocación investigadora.

También debo agradecer la amistad y buenos ratos pasados a todos los miembros del laboratorio, con quienes he compartido bancada y tantas horas de trabajo, inquietudes y risas: Ana Bosch, Juan Sandoval, Iván, Desam, Fani, Juan F., Elena P., Pepa, Lucía, Marcelino y M^a José que han hecho el día a día mucho más ameno y divertido. También agradecer al grupo de metabolómica: Reme, Jose Manuel, Vanina, Eva y Jessica por hacer las comidas, un espacio donde desconectar y echarse unas risas.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica de la Sección de Medicina, Dr. Jover, Dr. O' Connor, Dra. Puertes y Dra. Alonso por su colaboración y apoyo, así como por los momentos compartidos en clases y viajes. Y también al personal de administración: Paco Tevar y Maria Belenguer, por facilitar todo tipo de gestiones que han hecho toda la burocracia más llevadera.

A todas mis amigas, Maria, Teresa B, Cristina, Paula, Patri, Oreto Porta, Oreto R, Oreto P., Sonia, etc; por compartir juventud y buenos momentos. Agradecer también a Borami y M^a de Mar que me han acompañado en esta etapa final.

Al Dr. Claudio Schenider y la Dra. Francesca Demarchi (LNCIB, Trieste) por haberme permitido realizar una estancia en su laboratorio y a los miembros de su equipo (Francesca, Elena, Leticia y Elisa) por haber hecho que mi estancia en Trieste haya sido inolvidable. Mencionar a Sergi, Isa, Sophie, Luca y Jess que también contribuyeron a este propósito.

A mi queridísima hermana, Carme, por estar ahí todos los días como compañera de piso, amiga y hermana, y a Paco por quererme mucho, ser mi soporte y apoyarme siempre en este largo camino.

A mis padres por ser el pilar fundamental de todo lo que soy, de toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. También a toda mi familia, abuelos, tíos, primos, por confiar en mí y brindarme su apoyo en todo momento.

Y en general, agradecer a todas las personas que han estado a mi lado a lo largo de estos cuatro años. Personas que siempre han puesto buena cara cuando les consultaba alguna duda o pedía algún favor. Gente que me ha recibido con los brazos abiertos allí donde fuera y que siempre tenían a mano una sonrisa.

Gracias a todos, porque sin vosotros, todo este trabajo no hubiera sido posible.

*No importa cuán estrecho sea el portal,
cuán cargada de castigos la sentencia,
Soy el amo de mi destino;
Soy el capitán de mi alma.*

"Invictus" de William Ernest Henley.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. LA GLÁNDULA MAMARIA. | 3 |
| 1.1. Evolución. | 3 |
| 1.2. Anatomía, fisiología y desarrollo. | 4 |
| 1.2.1. Desarrollo embrionario. | 6 |
| 1.2.2. Etapa puberal. | 7 |
| 1.2.3. Etapa adulta: Embarazo y lactancia. | 10 |
| 2. LA INVOLUCIÓN: MODELO FISIOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y LA REMODELACIÓN TISULAR. | 14 |
| 2.1 . Muerte celular programada. | 16 |
| 2.2. Remodelación tisular postlactancia. | 19 |
| 2.3. Vías de señalización. | 22 |
| 2.3.1. Relevancia del balance STAT-3/STAT-5 tras el ciclo embarazo/lactancia. | 23 |
| 2.3.2. Implicación de NF- κ B. | 25 |
| 2.3.3. Papel del NO. | 27 |
| 2.3.4. Vía de PI3K/AKT. | 28 |
| 3. IMPLICACIÓN DE DE LAS CALPAÍNAS DURANTE LA REMODELACIÓN POSTLACTANCIA. | 29 |
| 3.1. Aspectos generales. | 30 |
| 3.2. Estructura y propiedades. | 32 |
| 3.3. Actividad calpaína y su regulación. | 35 |
| 3.3.1. Autoproteólisis. | 36 |
| 3.3.2. Unión a calpastatina. | 36 |
| 3.3.3. Translocación a membranas. | 37 |
| 3.3.4. Fosforilación. | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4. Función fisiológica de las calpaínas. | 38 |
| 3.4.1. Migración celular y adhesión. | 39 |
| 3.4.2. Vías de supervivencia y ciclo celular. | 40 |
| 3.4.3. Apoptosis. | 41 |
| 3.4.4. Diferenciación celular. | 42 |
| 3.5. Implicación de las calpaínas en procesos patológicos. | 43 |
| 3.6. Dianas subcelulares de las calpaínas. | 47 |
| 3.6.1. Papel de las calpaínas en la mitocondria. | 47 |
| 3.6.2. Papel de las calpaínas en los lisosomas. | 48 |
| 3.6.3. Papel de las calpaínas en el núcleo. | 49 |
| OBJETIVOS | 53 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 59 |
| 1. Mantenimiento de los animales y extracción de los tejidos. | 59 |
| 2. Anticuerpos utilizados. | 61 |
| 3. Estudios histológicos. | 62 |
| 3.1. Tinción hematoxilina-eosina. | 62 |
| 3.2. Análisis de inmunofluorescencia. | 63 |
| 4. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP assays). | 63 |
| 4.1. Análisis por PCR semicuantitativa. | 66 |
| 4.2. Análisis por PCR cuantitativa. | 66 |
| 5. Aislamiento y cuantificación de RNA. | 67 |
| 6. Análisis de expresión de mRNA por RT-qPCR. | 67 |
| 7. Extracción de proteínas totales y Western blot. | 69 |
| 8. Fraccionamiento subcelular. | 70 |
| 8.1. Fracciones mitocondriales. | 70 |
| 8.2. Extractos lisosomales. | 71 |
| 8.3. Fracciones nucleares y citosólicas. | 71 |
| 8.4. Extractos cromatínicos. | 72 |
| 9. Inmunoprecipitaciones. | 72 |

| | |
|---|-----------|
| 10. Ensayos <i>in vitro</i> de calpaína. | 73 |
| 10.1. Ensayos en extractos mitocondriales. | 73 |
| 10.2. Ensayos en extractos lisosomales. | 73 |
| 10.3. Ensayos en fracciones nucleares. | 74 |
| 11. Electroforesis bidimensional (2D DIGE). | 75 |
| 12. Inhibición <i>In vivo</i> de Calpaína. | 76 |
| 12.1. Administración de un inhibidor farmacológico específico, calpeptina. | 76 |
| 12.2. Silenciamiento de la calpaína-1 en la glándula mamaria de ratón. | 77 |
| 13. Medida de actividad calpaína. | 77 |
| 14. Evaluación de la actividad caspasa-3. | 77 |
| 15. Determinación de fragmentos de DNA oligonucleosomales. | 78 |
| 16. Separación de adipocitos de la glándula mamaria: Proteínas y mRNA. | 79 |
| 17. Análisis estadístico. | 80 |
| | |
| RESULTADOS | 83 |
| | |
| 1. LA ACTIVACIÓN DE LAS CALPAÍNAS FAVORECE LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS EPITELIALES. | |
| | |
| 1.1. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA MITOCONDRIA. | 83 |
| | |
| 1.2. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LOS LISOSOMAS. | 88 |
| 1.2.1. La actividad calpaína se incrementa en los lisosomas. | 88 |
| 1.2.2. La calpaína media la escisión proteolítica de LAMP2a en la membrana lisosomal, induciendo un incremento de la permeabilidad lisosomal. | 92 |
| 1.2.3. Análisis 2D-DIGE de los sustratos de la calpaína en extractos lisosomales. | 94 |
| 1.2.4. La inhibición <i>in vivo</i> de la calpaína retrasa la involución de la glándula mamaria. | 99 |

| | |
|---|-----|
| 1.3. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL NÚCLEO. | 104 |
| 1.3.1. Las calpaínas están presentes y activas en fracciones nucleares. | 104 |
| 1.3.2. Las calpaínas intervienen en la escisión de nucleoporinas ubicadas en posiciones periféricas del complejo del poro nuclear. | 107 |
| 1.3.3. La inhibición de calpaínas mediante RNA de interferencia o con calpeptina impide la rotura de nucleoporinas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . | 109 |
| 1.3.4. La translocación nuclear de calpaína implica la pérdida de selectividad del transporte a través de la membrana nuclear de las células epiteliales. | 111 |
| | |
| 2. PAPEL DE CAPN1 EN LAS CÉLULAS DEL ESTROMA DEL TEJIDO MAMARIO. | 114 |
| 2.1. Capn1 está presente en fracciones enriquecidas en cromatina de células estromales. | 114 |
| 2.2. Capn1 colocaliza con histona H3 en adipocitos durante la involución de la glándula mamaria. | 120 |
| 2.3. Capn1 media la escisión del extremo N-terminal de la histona H3 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . | 123 |
| 2.4. Capn1 podría participar en la diferenciación terminal de los adipocitos. | 128 |
| | |
| DISCUSIÓN | 135 |
| 1. LA GLÁNDULA MAMARIA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y LA REMODELACIÓN TISULAR. | 135 |
| 1.1. LAS CALPAÍNAS Y LOS LISOSOMAS. | 136 |
| 1.2. IMPLICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS EN LAS MITOCONDRIAS. | 142 |
| 1.3. EL PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL NÚCLEO. | 144 |
| 2. LAS CALPAÍNAS EN LA REMODELACIÓN POSTLACTANCIA. | 147 |
| 3. IMPLICACIONES BIOMÉDICAS. | 151 |

CONCLUSIONES 157

SUMMARY 161

BIBLIOGRAFÍA 179

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Mecanismo evolutivo propuesto para la glándula mamaria. | 3 |
| Figura 2: Estructura esquemática de la glándula mamaria. | 5 |
| Figura 3: Influencias hormonales en el desarrollo postnatal de la glándula mamaria. | 9 |
| Figura 4: Influencias hormonales en los acini de la glándula mamaria durante la gestación. | 12 |
| Figura 5: Cambios metabólicos necesarios para la síntesis y secreción de los constituyentes de la leche. | 13 |
| Figura 6: Secuencia de cambios morfológicos e histológicos observados en la glándula mamaria durante el ciclo embarazo/lactancia. | 15 |
| Figura 7: Análisis de la morfología de células en programas de MCP por microscopia electrónica de transmisión. | 17 |
| Figura 8: Resumen del modelo propuesto para la apoptosis atípica a través de la permeabilización de la membrana lisosomal. | 19 |
| Figura 9: Mediante ChIP/Chip se identificaron posibles sitios de unión de NF- κ B a lo largo del destete. | 26 |
| Figura 10: Representación esquemática de la estructura general de las calpaínas. | 33 |
| Figura 11: Los miembros de la familia calpaína presentan una arquitectura modular. | 34 |
| Figura 12: Mecanismo de activación de las calpaínas. | 35 |
| Figura 13: Diagrama esquemático de la estructura de la calpastatina. | 37 |
| Figura 14: Función de las calpaínas en el control y regulación del ciclo celular. | 41 |
| Figura 15: Representación del modelo experimental empleado. | 60 |

| | |
|--|-----|
| Figura 16: Esquema de los factores implicados en el ChIP. | 65 |
| Figura 17: Mecanismo de detección de fragmentos mono- y oligonucleosomales. | 79 |
| Figura 18: Niveles de actividad calpaína en fracciones mitocondriales. | 84 |
| Figura 19: Localización de calpaínas junto con CcOx IV, en secciones de glándula mamaria de ratones control (0h) y destete (48h). | 85 |
| Figura 20: Translocación de CAPN1 al compartimento mitocondrial y liberación de citocromo c. | 86 |
| Figura 21: Liberación concentración-dependiente de citocromo c mediada por adición de calpaína. | 87 |
| Figura 22: Presencia y niveles de actividad calpaína en extractos lisosomales. | 89 |
| Figura 23: Localización de calpaínas junto con LAMP2, en secciones de glándula mamaria control (0h) y de 24h de destete. | 90 |
| Figura 24: Degradación de LAMP2a a medida que avanza la involución. | 91 |
| Figura 25: Proteólisis dosis- y tiempo-dependiente de LAMP2a por calpaínas. | 92 |
| Figura 26: Degradación específica de LAMP2a por calpaínas. | 93 |
| Figura 27: Liberación concentración-dependiente de catepsinas al sobrenadante mediada por adición de calpaína. | 94 |
| Figura 28: Validación del tratamiento con calpaína y gel resultante del 2D DIGE. | 95 |
| Figura 29: Niveles de VATB2 a lo largo de la involución. | 98 |
| Figura 30: Hematoxilina-eosinas de secciones de glándula mamaria con vehículo o calpeptina de 72h de destete. | 99 |
| Figura 31: Niveles de calpaínas y de marcadores de remodelación tisular tras el tratamiento <i>in vivo</i> de calpeptina. | 100 |

| | |
|--|-----|
| Figura 32: Evaluación del grado de muerte celular: determinación de fragmentos oligonucleosomales y medida de la actividad caspasa-3. | 102 |
| Figura 33: Niveles proteicos en extractos de glándula mamaria tratados con siRNA Capn1. | 103 |
| Figura 34: Las calpaínas están presentes y activas en núcleos de células epiteliales. | 105 |
| Figura 35: Translocación progresiva de las calpaínas al compartimento nuclear. | 106 |
| Figura 36: Degradación de NUP periféricas a lo largo de la involución. | 107 |
| Figura 37: Localización de calpaínas junto con NUP periféricas en secciones de glándula mamaria control y tras 72h de destete. | 108 |
| Figura 38: Consecuencias nucleares de la inhibición <i>in vivo</i> de calpaínas. | 109 |
| Figura 39: Degradación específica y dosis-dependiente de NUP periféricas por calpaínas. | 111 |
| Figura 40: Consecuencias de la pérdida de la selectividad del transporte nuclear: α -tubulina y aldolasa en núcleos de ratones destetados. | 112 |
| Figura 41: Liberación de Histona H3 al sobrenadante mediada por adición de calpaína sobre extractos nucleares control. | 114 |
| Figura 42: Inmunofluorescencia de CAPN1 y Mab414. | 115 |
| Figura 43: Inmunofluorescencias contra CAPN1 junto con un marcador de adipocitos, la perilipina. | 116 |
| Figura 44: Repoblación de la glándula por los adipocitos. | 117 |
| Figura 45: Niveles de expresión y de activación de CAPN1 en extractos de adipocitos control (0h), 2 y 5 días de involución. | 119 |
| Figura 46: Inmunoblots en extractos nucleares solubles (N) y enriquecidos en cromatina (Cr), de ratones control (0h) y de 48h de destete. | 120 |

| | |
|---|-----|
| Figura 47: Localización de CAPN1 en núcleos de células con morfología de adipocito. | 121 |
| Figura 48: Localización de CAPN1 en células apoptóticas liberadas al lumen de los acini. | 122 |
| Figura 49: Niveles proteicos de Histona H3 y de varias modificaciones de la misma a lo largo del destete. Experimentos de inhibición de calpaínas. | 124 |
| Figura 50: Experimento con CAPN1 e Histona H3 recombinante. Análisis del punto de corte y uso de un método informático de predicción de corte. | 125 |
| Figura 51: Escisión de la Histona H3 recombinante en extractos nucleares de 0 y 48h de destete. | 127 |
| Figura 52: Escisión dosis dependiente y específica de la Histona H3 por r-CAPN1. | 127 |
| Figura 53: Localización de CAPN1 y diferentes marcas epigenéticas de la Histona H3 (H3K4me3 y H3K27me3). | 129 |
| Figura 54: CAPN1 está presente en promotores de genes adipogénicos y nivel de expresión de los mismos durante el destete. | 130 |
| Figura 55: Papel de las calpaínas en la desestabilización lisosomal, a través de la degradación de LAMP2a. | 138 |
| Figura 56: Representación esquemática de las funciones identificadas para las calpaínas en células epiteliales. | 146 |
| Figura 57: Representación del papel diferencial que presenta la CAPN1 en los núcleos de células epiteliales y estromales a lo largo del destete. | 151 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Resumen de defectos ocasionados por pérdidas o mutaciones en los genes de las calpaínas. | 31 |
| Tabla 2: Condiciones patológicas ligadas a defectos en el sistema calpaína. | 46 |
| Tabla 3: Listado de anticuerpos usados, especificando la técnica, dilución y casa comercial. | 61 |
| Tabla 4: Cebadores sintetizados en los promotores de los genes utilizados para las PCR semicuantitativa. | 66 |
| Tabla 5: Cebadores utilizados en las PCRs cuantitativas, prediseñados por la casa comercial Applied Biosystems. | 68 |
| Tabla 6: Lista de proteínas recombinantes usadas. | 74 |
| Tabla 7: Listado de puntos degradados de forma diferencial por la calpaína, seleccionados en el análisis 2D-DIGE, e identificados mediante espectrometría de masas. | 96 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|--|
| A | Adenina |
| AIF | <i>Apoptosis inducing factor</i> |
| Apaf-1 | <i>Apoptotic protease activating factor-1</i> |
| C | Citosina |
| C/EBPα | <i>CCAAT/ Enhanced binding protein α</i> |
| CaMKIV | <i>Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase type IV</i> |
| CAPN1 | Calpaína 1 |
| CAPN2 | Calpaína 2 |
| CAPN4 | Calpaína 4 |
| CD | Catepsina D |
| CcOx IV | Citocromo c Oxidasa IV |
| CDK5 | <i>Cyclin-dependent kinase 5</i> |
| ChIP | Inmunoprecipitación de cromatina |
| CPN | Complejo del Poro Nuclear |
| Ct | Ciclo umbral |
| DMD | Distrofia muscular de Duchenne |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| E | Estrógenos |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> |
| ER | Retículo endoplásmico |
| FAK | Quinasa de adhesión focal; <i>Focal Adhesion Kinase</i> |
| FGF | Factor de crecimiento fibroblástico |
| G | Guanina |

| | |
|-----------------------|--|
| GADPH | Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa |
| GC | Glucocorticoides |
| GSK-3 | <i>Glycogen synthase Kinase 3</i> |
| H3 | Histona H3 |
| H3^t | Histona H3 truncada; <i>truncated Histone H3</i> |
| IGF1 | <i>Insulin-like growth factor-1</i> |
| IGFBP5 | <i>Insulin-like growth factor binding protein-5</i> |
| IP | Inmunoprecipitado |
| LAMP2 | <i>Lysosome associated membrane protein 2</i> |
| LAMP2a | <i>Lysosome associated membrane protein isoform 2a</i> |
| LGMD2A | <i>Limb-girdle muscular dystrophy type 2A</i> |
| LIF | Factor inhibidor de la leucemia |
| MAPK | Proteína-quinasa activada por mitógenos |
| MCP | Muerte celular programada |
| MMP | Metaloproteasa |
| mRNA | Mensajero de Ácido Ribonucleico |
| NF-κB | Factor nuclear kappa B |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| NUP | Nucleoporinas |
| PARP | <i>poly (ADP-ribose) polymerase-1</i> |
| PBS | <i>Phosphate buffer saline</i> |
| Pg | Progesterona |
| PgR | Receptor de progesterona |
| PM | Primordio mamario |

| | |
|-----------------|--|
| PML | Permeabilización de la membrana lisosomal |
| PRL | Prolactina |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| RANKL | Ligando del receptor activador de NF-κB |
| RER | Retículo endoplásmico rugoso |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| RT | Retrotranscripción |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| siRNA | <i>small interference RNA</i> |
| SREBP-1 | <i>Sterol regulatory element-binding transcription factor 1</i> |
| STAT | Transductor de señal y activador de la transcripción |
| T | Timina |
| tAIF | <i>Truncated Apoptosis inducing factor</i> |
| TGF-3β | Factor de crecimiento transformante β3 |
| TGN38 | <i>Trans-Golgi Network 38</i> |
| TIMPS | Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| UR | Anticuerpo no relacionado o <i>Unrelated</i> |
| VATB2 | Isoforma B2 de la V-ATPasa |
| VDAC | Canal aniónico dependiente de voltaje |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| WB | Western blot |
| WT | <i>Wild type</i> |
| XOR | Xantina Oxidoreductasa |

INTRODUCCIÓN

1. LA GLÁNDULA MAMARIA.

1.1. EVOLUCIÓN.

La glándula mamaria es un tejido complejo y altamente especializado que, a lo largo de la evolución, ha ido modificándose para proveer al recién nacido de leche, el único fluido corporal que nutre al lactante y le confiere protección inmunológica (McClellan *et al.* 2008). Evolutivamente, se postula que la glándula mamaria se ha desarrollado a partir de una pequeña glándula epitelial con función protectora, hasta conformar la estructura que conocemos hoy en día. Esta idea viene respaldada por la presencia en la leche de enzimas con acción antibacteriana, como la xantina oxidoreductasa (XOR) o la lisozima (figura 1) (Vorbach *et al.* 2006).

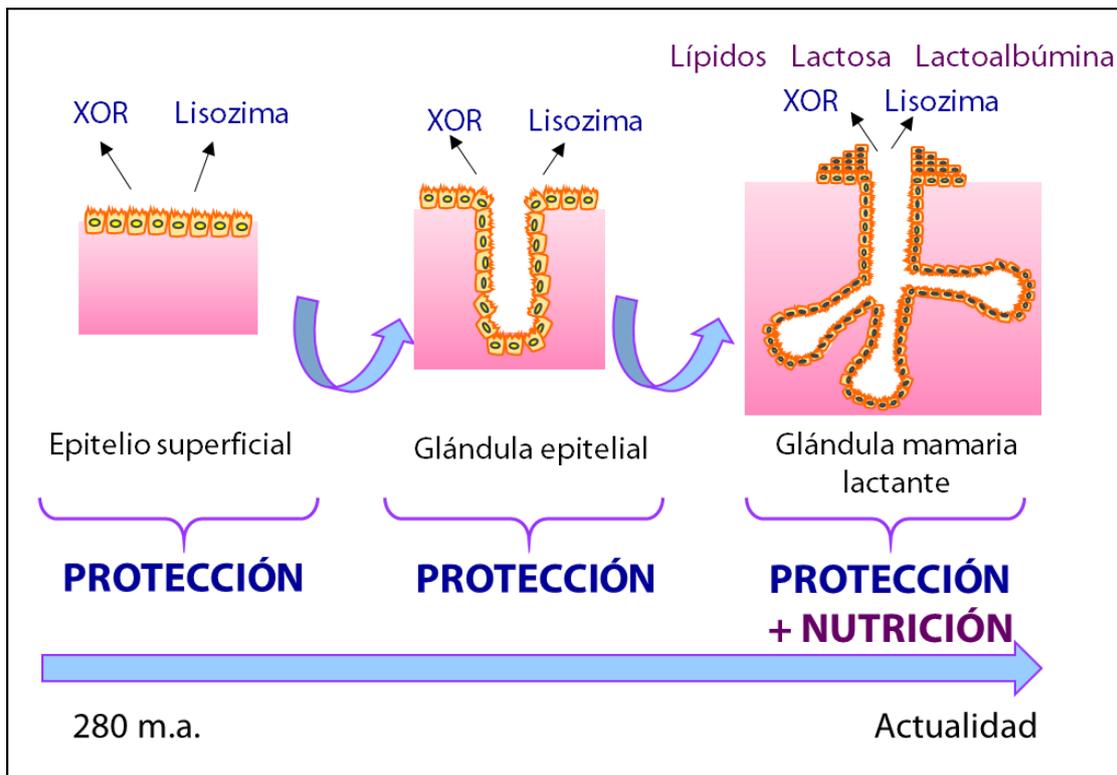


Figura 1: Mecanismo evolutivo propuesto para la glándula mamaria. Se observa como a partir de una glándula epitelial rudimentaria, secretora de mucus y enzimas antimicrobianos, y por tanto, con una función predominantemente protectora, pasa a convertirse en una estructura más compleja, capaz de secretar también sustancias nutritivas. Entre éstas, se pueden destacar lípidos, lactosa o lactoalbúmina. XOR: Xantina oxidoreductasa, m.a: millones de años. Adaptado de Vorbach et al. 2006.

1.2. ANATOMÍA, FISIOLOGÍA Y DESARROLLO.

La función principal de la glándula mamaria es proveer de nutrientes y protección inmunológica al recién nacido. De ahí que, el desarrollo de este tejido se produzca fundamentalmente en la edad adulta, siendo el embarazo y la lactancia cuando alcanza su máximo grado de desarrollo (Macías *et al.* 2012). Anatómicamente, la glándula mamaria lactante está constituida por tejido epitelial embebido en una matriz de tejido conectivo, que le proporciona soporte estructural (Sakakura *et al.* 2013). El tejido epitelial lleva a cabo las funciones bioquímicas propias de la glándula y se organiza en ductos y alveolos. Los alveolos (o acini) son formaciones esféricas encargadas de producir y secretar todos los componentes de la leche (Stingl *et al.* 2005). Los ductos, son un conjunto de estructuras tubulares y huecas, que se ramifican y terminan en los acini. Dichos ductos, drenan su contenido a través de canalículos más gruesos hasta terminar en uno de los quince a veinticinco conductos galactóforos, ubicados inmediatamente detrás del pezón (figura 2) (Hassiotou *et al.* 2013; Dimri *et al.* 2005).

A nivel histológico, la glándula mamaria está conformada por dos tipos de tejidos: el que deriva del ectodermo, formado por las células epiteliales que se organizan para constituir los ductos y los alveolos; y el tejido de origen mesodérmico, compuesto fundamentalmente por matriz extracelular y células estromales como adipocitos, macrófagos, fibroblastos, células hematopoyéticas, vasos sanguíneos y nervios (Hennighausen & Robinson, 2005). Dentro de este tejido epitelial existen dos subtipos celulares: las células mioepiteliales basales y las células lumbinales (Shackleton *et al.* 2006). Estas últimas pueden diferenciarse, ya sea en una célula ductal o en una célula productora de leche (acinar/secretora). Las células mioepiteliales, con capacidad contráctil, son capaces de favorecer la expulsión de la leche a lo largo del árbol ductal hacia el pezón (figura 2) (Van keymeulen *et al.* 2011). El mantenimiento de la integridad de las uniones intercelulares entre estas células, es muy importante ya que se requiere una estanqueidad de los compartimentos alveolar y ductal, para facilitar el flujo unidireccional de la leche hacia el pezón. Las uniones estrechas características de este epitelio, permanecen abiertas durante el embarazo, pasando a cerrarse durante la lactancia cuando la leche comienza a ser secretada (Neville *et al.* 2002).

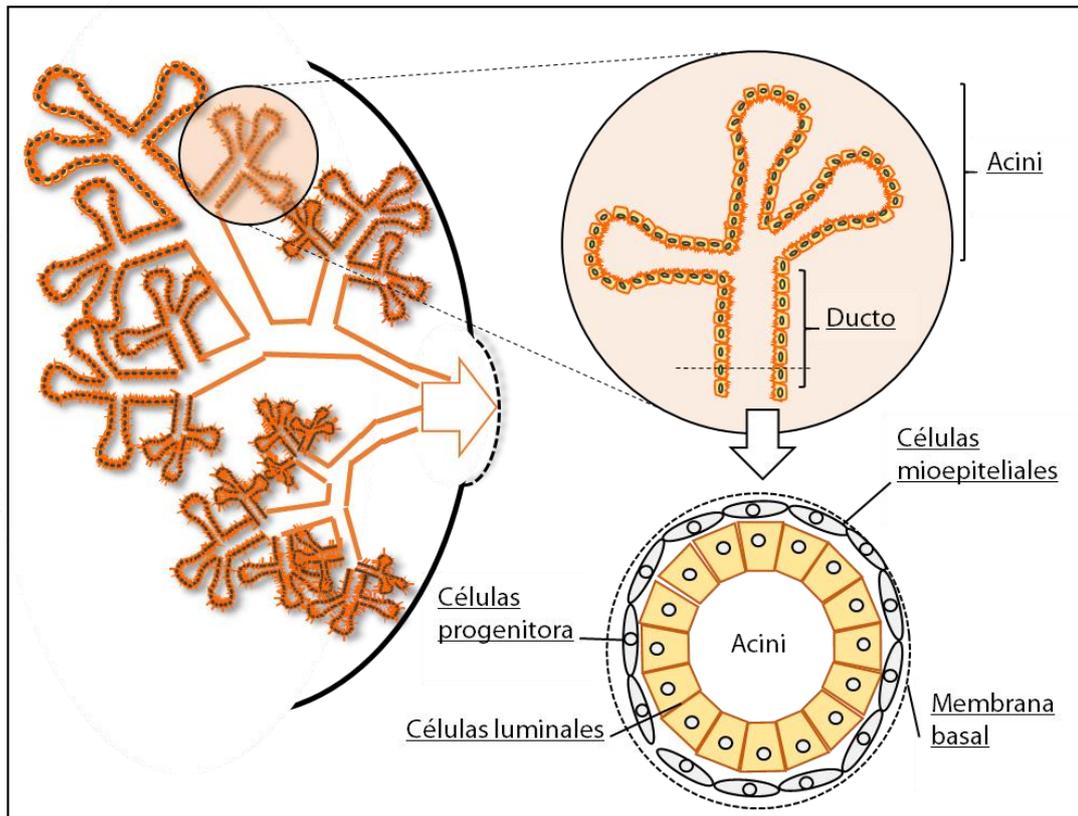


Figura 2: Estructura esquemática de la glándula mamaria. Se observa la organización típica lóbulo-alveolar, según la cual cada conducto galactóforo se va ramificando cada vez más en pequeños ductos, los cuales a su vez divergen en formaciones esféricas denominadas acini (las verdaderas unidades secretoras). El estroma, está compuesto fundamentalmente por adipocitos y fibroblastos. También se muestra una sección transversal de un túbulo con los dos tipos principales de células que lo componen: las células mioepiteliales contráctiles y las luminales.

Por otro lado, también se ha descrito la presencia de células madre facultativas que darían lugar a cada uno de los tipos celulares anteriormente mencionados. Mediante la utilización de fragmentos epiteliales marcados con un retrovirus de glándula mamaria (MMTV) se ha demostrado que una única célula progenitora es necesaria para repoblar todos los linajes celulares (Kordon *et al.* 1998). Ahora bien, dada la gran capacidad de renovación que sufre la glándula a lo largo de la vida fértil, cabría pensar que su proporción y diversidad va a ser más amplia que en otros tejidos (Shackleton *et al.* 2006; Visvader *et al.* 2011). Entre los diferentes linajes de células madre identificadas, se han caracterizado recientemente células unipotentes tanto luminales como mioepiteliales de vida media larga. Dichas células poseen una gran

capacidad de autorenovación, demostrada por su habilidad de expansión clonal durante la morfogénesis de la glándula mamaria a lo largo del desarrollo postnatal, además de su masiva capacidad de expansión a lo largo de los sucesivos ciclos embarazo/lactancia (Van keymeulen *et al.* 2011).

Desde el punto de vista del desarrollo de la glándula mamaria, existen tres estadios fundamentales de progresión: el embrionario, el puberal y el gestacional (Macías *et al.* 2012). Aunque el proceso de desarrollo es común a todos los mamíferos, diferencias funcionales, de arquitectura glandular o incluso en el número de glándulas, pueden aparecer entre especies (Hovey *et al.* 2004).

1.2.1. DESARROLLO EMBRIONARIO

La etapa del desarrollo embrionario de la glándula mamaria en el ratón, no es evidente hasta mitad de la gestación. La primera característica distintiva es la formación de las líneas mamarias a partir del ectodermo, que consiste en una elevación longitudinal de la epidermis a ambos lados de la línea alba. Posteriormente a lo largo de esta líneas mamarias, se produce una proliferación de la epidermis para constituir el primordio mamario (PM), con forma lenticular y formado por varias capas de células epidérmicas (Propper *et al.* 2013). Progresivamente, la elongación del tronco del embrión, conduce a la separación de los PMs, a lo largo de la línea mamaria. Dichas estructuras rudimentarias, empiezan a proliferar mínimamente, para ramificarse dando lugar a un pequeño árbol ductal constituido por cinco ductos que se incrustan en el tejido graso subdérmica (Veltmaat *et al.* 2003). La mayor parte de estos primordios involucionan y desaparecen, dependiendo de la especie.

La localización de estos primordios mamarios es muy importante para explicar la mayor parte de las alteraciones en el desarrollo. En la mayor parte de las especies animales, los PMs persisten en mayor o menor cantidad, lo que explica la variabilidad en el número de mamas entre las diferentes especies de mamíferos (Schmidt *et al.* 1998).

En los humanos, es posible que algunos de estos vestigios mamarios no involucionen, dando lugar a las mamas supernumerarias y tejido ectópico a cualquier nivel de las líneas lácteas. A nivel molecular, la diferenciación embrionaria de las líneas mamarias dependen de la activación paralela de la ruta de señalización Wnt/ β -Cat y de la del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Chu *et al.* 2004; Mailloux *et al.* 2002) entre otras.

En el proceso de ramificación del componente epitelial interviene de forma importante el mesénquima mamario y el tejido adiposo (Rauner *et al.* 2013). Evidencias histológicas y bioquímicas sugieren que el componente adiposo del estroma es el encargado de promover la elongación de los ductos gracias a la síntesis de componentes de la membrana basal tales como laminina y proteoglicanos (Sakakura *et al.* 2013). Podría decirse que hasta este momento, los factores locales son los que van a estimular el desarrollo de la glándula (Macías *et al.* 2012). A partir de la pubertad, la glándula mamaria va a necesitar la presencia de determinadas hormonas circulantes para alcanzar su desarrollo definitivo, entre ellas los estrógenos, la progesterona, el IGF1 (*Insuline-like growth factor 1*), la hormona del crecimiento, la insulina, la prolactina, etc (Viña *et al.* 1981; Gallego *et al.* 2001; Hennighausen *et al.* 2005; Hawsawi *et al.* 2013).

1.2.2. ETAPA PUBERAL.

Durante la pubertad, se produce la elongación y bifurcación de los ductos terminales hasta invadir prácticamente todo el tejido graso mamario que constituye la mama (Sternlicht *et al.* 2006). Las hormonas encargadas de dirigir esta proliferación y crecimiento son fundamentalmente la hormona del crecimiento (GH), el *insuline-like growth factor 1* (IGF1) y los estrógenos (E) (figura 3).

- La GH es una hormona peptídica, secretada por la hipófisis y muy importante en el desarrollo mamario. Diferentes estudios han detectado que su acción se debe indirectamente al incremento de la producción de IGF1 en hígado (actúa a nivel sistémico) y en el estroma mamario (actúa a nivel local)

(Gallego *et al.* 2001; Ruan *et al.* 1999). Ratones *knockout* del IGF1 (*igf1*^{-/-}), presentan una estructura ductal muy rudimentaria, al igual que los ratones *knockout* del receptor de la hormona del crecimiento (*ghr*^{-/-}). Los experimentos con los ratones *igf1*^{-/-} en los que los niveles de GH son normales, demuestran que la acción de la GH en la glándula mamaria está mediada fundamentalmente por IGF1 (Ruan *et al.* 1999).

- Los estrógenos, hormonas esteroideas liberadas principalmente por los ovarios, también actúan regulando el desarrollo mamario, y son los responsables del crecimiento experimentado durante la pubertad. Actúan a través de receptores intracelulares, los cuales una vez activados se desplazan al núcleo para activar la transcripción de genes, entre ellos factores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Macías *et al.* 2012). Estos factores son secretados con el fin de actuar de forma paracrina, sobre células estromales y epiteliales adyacentes, ya que solo el 40% de las células epiteliales son positivas para el receptor de estrógenos (Lubahn *et al.* 1993). La interrelación bidireccional entre la vía del IGF-1 y la vía de los estrógenos ha despertado un gran interés, ya que es un mecanismo de escape adoptado por muchas células tumorales, para evadir los efectos de una terapia antiestrogénica (Hawsawi *et al.* 2013).
- La disminución de las hormonas tiroideas séricas induce a su vez un retraso en el crecimiento y expansión de los ductos y alveolos durante la pubertad, sugiriendo un papel importante de las mismas en este proceso (Vonderhaar y Greco. 1982).
- La insulina y los glucocorticoides juegan también un papel esencial, en tanto y cuanto, su disminución genera defectos en el metabolismo y en la maduración de los tejidos, respectivamente (Casey *et al.* 2007; Neville *et al.* 2013).

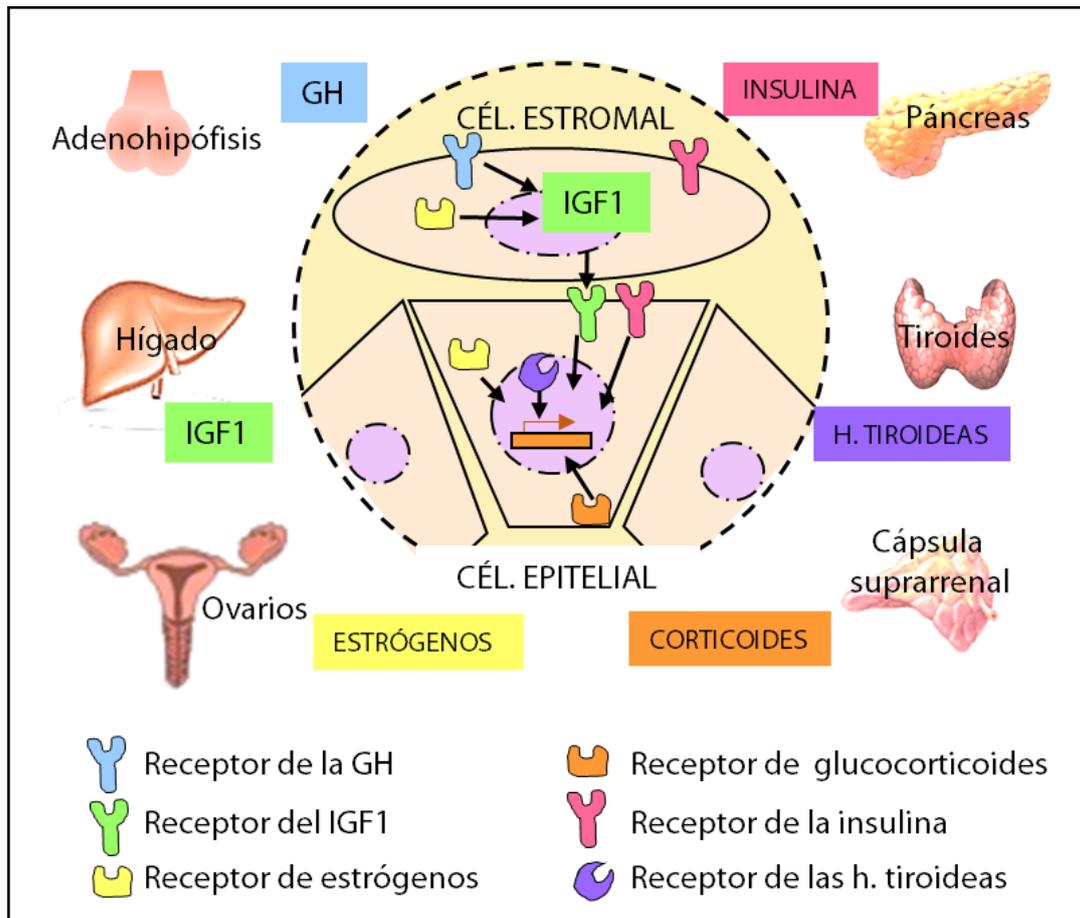


Figura 3: Influencias hormonales en el desarrollo postnatal de la glándula mamaria. La hormona del crecimiento (GH), el insulin-like growth factor1 (IGF1) y los estrógenos actúan en combinación para inducir la proliferación y elongación de los ductos durante la pubertad. La presencia de hormonas tiroideas, insulina y glucocorticoides también es necesaria para la correcta formación de la estructura glandular mamaria.

En este punto, se produce de nuevo una detención del desarrollo mamario, hasta que tiene lugar el embarazo, donde la glándula sufre de nuevo cambios morfológicos y de desarrollo con el objetivo de prepararse para la lactancia (Watson *et al.* 2008).

1.2.3. ETAPA ADULTA: EMBARAZO Y LACTANCIA.

El embarazo constituye la fase de la glándula mamaria en la cual ésta alcanza el máximo grado de desarrollo y se prepara para ejercer su función, proveer nutrientes al recién nacido. Para conseguir este grado de especialización tan elevado se requiere de estructuras funcionales, que solo aparecerán en este estadio bajo la influencia del contexto hormonal propio de esta situación fisiológica (Lee *et al.* 2012). Dichos requerimientos estructurales y funcionales son: la ramificación terciaria de los ductos para generar los alveolos, y la rápida proliferación y diferenciación de las células epiteliales luminales para adquirir un fenotipo secretor. Dos hormonas son las principales reguladoras de estos procesos durante el embarazo, la prolactina (PRL) y la progesterona (Pg), aunque existen otras que también influyen (figura 4):

- Por lo que concierne a la PRL, se han llevado a cabo experimentos con ratones *knockouts*, tanto de PRL como de su receptor. En dichos ratones, se observa un desarrollo postnatal normal con la consiguiente bifurcación y la ramificación del árbol ductal. Sin embargo, el desarrollo lobuloalveolar y la secreción de leche durante el embarazo y lactancia se ven enormemente frenadas, mostrando su papel fundamental a lo largo de estos procesos (Ormandy *et al.* 1997). La vía de señalización activada por la unión de la PRL a su receptor, induce la cascada de JAK/STAT5 explicada más adelante.
- Se ha evidenciado un efecto directo de la Progesterona (Pg) tanto en la extensa ramificación del árbol ductal como en la alveologénesis. Junto con la PRL, es capaz de promover la diferenciación y la especialización del epitelio luminal, encargado de secretar leche después del parto (Macías *et al.* 2012). Existen dos isoformas del receptor de la progesterona (PgR), la isoforma A y B, las cuales se generan por el uso de promotores alternativos del mismo gen. Experimentos silenciando ambas isoformas, han demostrado que el PgR_B es el necesario para mediar los efectos de la Pg en la glándula mamaria (Hennighausen *et al.* 2005). Recientes publicaciones han investigado las vías por las que la Pg actúa de forma paracrina, consiguiendo transmitir sus efectos a células adyacentes que no presentan el PgR. Entre

estas señales mediadoras, se ha identificado el ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL), el cual actúa sobre las células adyacentes activando la vía de señalización de NF- κ B (González- Suarez *et al.* 2010).

- Otras hormonas circulantes de gran importancia son los glucocorticoides. Durante el embarazo se observa un incremento hasta tres veces superior del cortisol circulante, así como de la expresión del receptor de los glucocorticoides; descendiendo ambos parámetros a la normalidad después del parto (Alexandrova. 1986). Este incremento junto con experimentos en los que se ha suprimido su señal, han evidenciado su papel fundamental en la activación de la síntesis y la secreción de la leche. Concretamente se ha demostrado que, los glucocorticoides inducen el desarrollo del retículo endoplásmico rugoso (RER) y el sellado de las uniones intercelulares estrechas para evitar el reflujo de leche, además de regular la transcripción de genes lactógenicos como la β -caseína y la α -lactoalbúmina (Casey *et al.* 2007).

- Por otro lado, la interacción de la insulina con su receptor también se ha identificado como un mecanismo esencial para la diferenciación del linaje alveolar y para la síntesis de los componentes lípidicos y proteicos de la leche. De hecho, en un reciente artículo se ha descrito que ratones *knockout* del receptor de la insulina presentan la mitad de alveolos y una disminución del 60% y 75% en el contenido de caseína y gotas de lípidos, respectivamente. Además en preparaciones de acini *in vitro*, se observó que la adición de insulina favorecía la formación del lumen alveolar, incrementaba el tamaño de la glándula mamaria, así como el tamaño de los acini y el contenido de caseína y de gotas de lípidos (Neville *et al.* 2013).

En general, las hormonas de acción lactopoyética inducen los cambios morfológicos necesarios que facilitan a la glándula mamaria la síntesis de los diferentes componentes lácteos (figura 4).

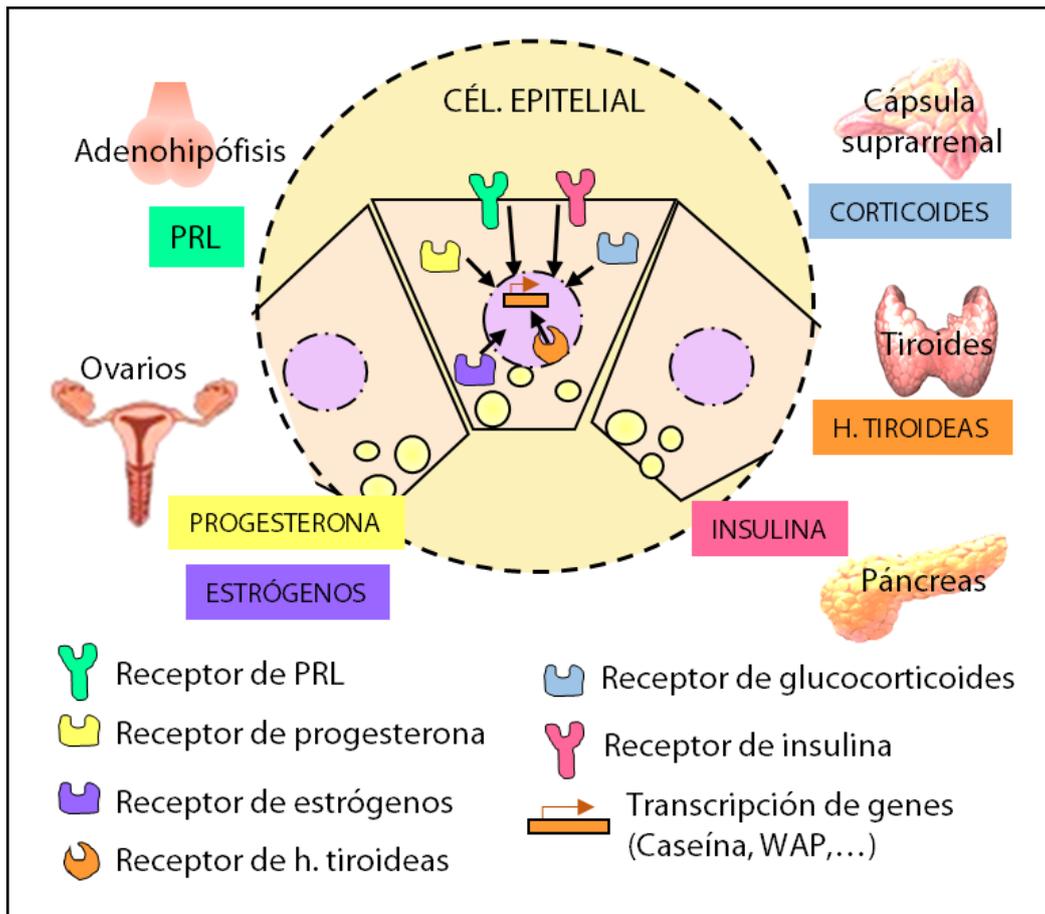


Figura 4: Influencias hormonales en los acini de la glándula mamaria durante la gestación. La acción conjunta de la prolactina y la progesterona durante el embarazo estimulan la diferenciación de los alveolos, además de la formación de ramificaciones secundarias y terciarias en el árbol ductal. Los estrógenos, los glucocorticoides, la insulina y las hormonas tiroideas también contribuyen a este fin.

Después del parto con el comienzo de la lactancia, la elevación de la PRL va acompañada de una caída de la Pg (Neville *et al.* 2002). Esta elevación del cociente PRL/Pg es esencial para el incremento de la producción de proteínas de la leche, además de facilitar el cierre de las uniones intercelulares que evitan el reflujo lácteo (Loizzi *et al.* 1985; Virgo *et al.* 1974). En este mismo sentido, también se ha descrito que un incremento del mencionado cociente facilita la activación de SREBF1 (*sterol regulatory element-binding transcription factor 1*), factor principal responsable de la regulación de la síntesis de los componentes lipídicos de la leche (Mohammad *et al.* 2013). Es importante remarcar que, durante la lactancia las adaptaciones fisiológicas y el incremento del flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria hacen de este tejido

uno de los más activos en la captación de nutrientes circulantes: glucosa, triacilglicéridos, ácidos grasos libres y aminoácidos (Robinson y Williamson, 1977; Viña y Williamson, 1981). Todas estas adaptaciones metabólicas, aparecen con el fin de sintetizar los diferentes componentes que van a constituir la leche, tales como: lactosa, caseína, lactoalbúmina, ácidos grasos, etc (figura 5) (Viña *et al.* 1981; Ben-Jonathan *et al.* 2006). Este incremento del flujo a la glándula mamaria aumenta también la cantidad de hormonas circulantes, entre ellas la insulina. La acción anabólica de la insulina en el periodo postgestacional se ve potenciada por la inducción de la expresión de receptores de insulina que produce la PRL circulante (Flint, 1982; Oller y Williamson, 1989; Hovey *et al.* 2002).

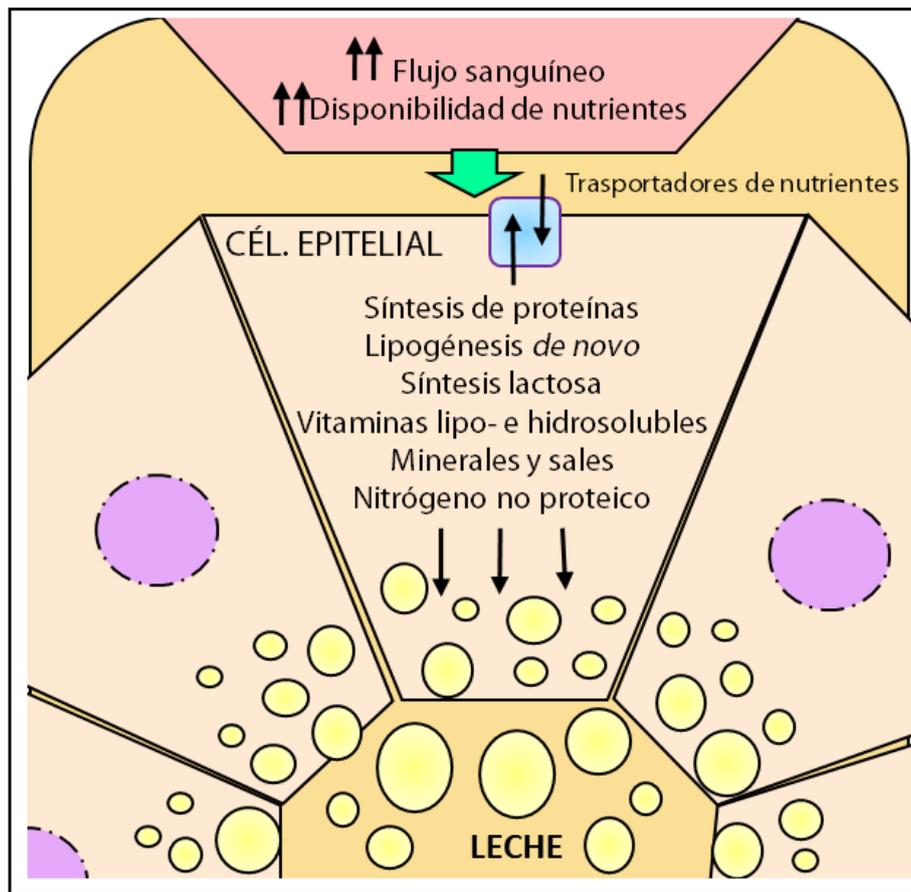


Figura 5: Cambios metabólicos necesarios para la síntesis y secreción de los constituyentes de la leche. La lactancia induce un incremento de la demanda del flujo sanguíneo y de la disponibilidad de nutrientes que llegan a la glándula mamaria para facilitar la síntesis de proteínas, lípidos, lactosa, etc.

Finalmente, después de la lactancia cuando la función secretora del epitelio ya no es requerida, gran parte de los alveolos deben eliminarse, a través de la muerte celular programada de las células que lo componen. Esta regresión tras la lactancia, o involución, es el ejemplo cuantitativamente más importante de muerte celular fisiológica en un tejido adulto. Constituye una serie perfectamente regulada de eventos, mediante los cuales se retira aproximadamente el 80% del epitelio mamario tras unos días de destete dependiendo de la especie (Monks *et al.* 2008). La lactancia se puede reiniciar mediante el estímulo de succión por parte de las crías, siempre que hayan transcurrido pocas horas del cese del amamantamiento. Esta fase reversible de la involución tiene una duración aproximada de 48 horas, después de la cual el proceso se vuelve irreversible debido al colapso de las estructuras alveolares y a la remodelación de la matriz estromal, que viene acompañada de la rediferenciación de los adipocitos (Green *et al.* 2004; Zaragozá *et al.* 2009).

2. LA INVOLUCIÓN: MODELO FISIOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA Y LA REMODELACIÓN TISULAR.

La magnitud de la remodelación tisular que se produce durante el ciclo de desarrollo de una mama normal es única (Schedin *et al.* 2007). En primer lugar, la glándula mamaria es el único órgano del cuerpo que alcanza su estado completamente diferenciado en la etapa adulta con la lactancia. Por esta razón, con la excepción del estado de embarazo/lactancia, el epitelio mamario persiste siempre en un estado incompleto, no funcional, constituido fundamentalmente por una red de conductos epiteliales y alveolos relativamente rudimentarios incrustados en la grasa mamaria (Richert *et al.* 2000). En segundo lugar, esta remodelación histológica no solo se limita a los procesos de desarrollo, sino también a la regresión postlactancia, conocida también como involución, que acontece cuando cesa la succión por parte de las crías, al final de la lactancia (Watson *et al.* 2011).

La involución de la glándula mamaria constituye un proceso altamente complejo en el que el tejido lactante sufre una extensa y rápida remodelación, hasta alcanzar una estructura similar a la que tenía antes del periodo gestacional (Stein *et*

al. 2007; Schedin *et al.* 2007; Hughes *et al.* 2013). Durante la involución podemos distinguir dos fases: una reversible y dependiente de p53, que tiene lugar hasta las 48 h del destete y se caracteriza por la apoptosis del epitelio secretor alveolar, sin que se produzcan grandes cambios en la arquitectura glandular (Green *et al.* 2004; Zaragoza *et al.* 2009). Conforme avanza la involución, entramos en la segunda fase de destete, de carácter irreversible e independiente de p53. En esta fase se produce la activación de proteasas que degradan la membrana basal y la matriz extracelular, conduciendo al colapso de las estructuras túbulo-alveolares (Schedin *et al.* 2007). A su vez, en esta segunda fase, se produce la adipogénesis, o rediferenciación de los adipocitos, de modo que la glándula se remodela hasta llegar a un estado similar al que tenía antes del embarazo (Green *et al.* 2005, Baxter *et al.* 2007; Hughes *et al.* 2013) (figura 6).

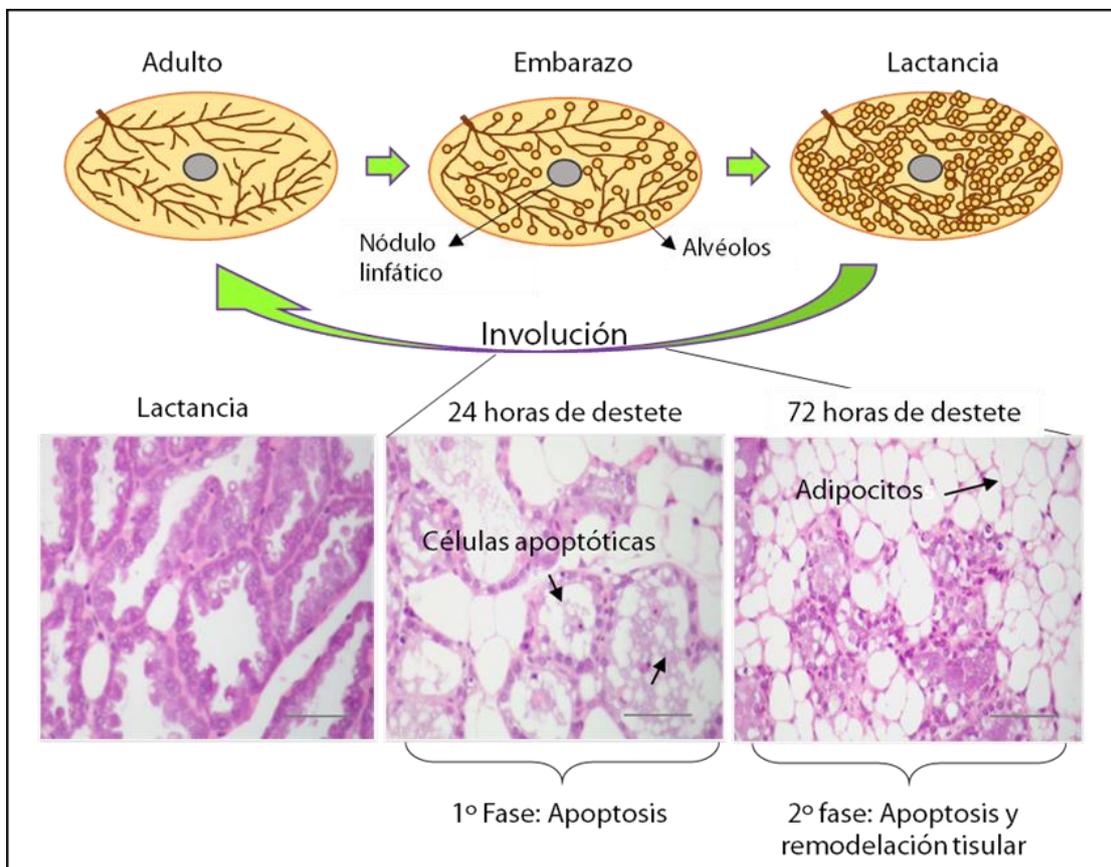


Figura 6: Secuencia de cambios morfológicos e histológicos observados en la glándula mamaria durante el ciclo embarazo/lactancia. En el corte histológico de la glándula lactante se observan secciones transversales de acini intactos, mientras que en los cortes de destete se empieza a observar la apoptosis del epitelio secretor alveolar, en forma de desprendimientos de células al lumen de los acini. En la segunda fase de destete (48-72 h) se produce el colapso de las estructuras alveolares, seguido de la colonización

*de la glándula por los adipocitos, con el fin de volver a la estructura pregestacional.
Escala: 75 μ m.*

2.1. MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

La muerte celular programada o apoptosis es un proceso fisiológico en el cual determinados estímulos bien endógenos o ambientales activan un programa genético que culminan en la muerte celular, sin alteraciones en la estructura o fisiología tisular global (Hockenbery, 1995). A nivel molecular, dos vías principales conducen a la apoptosis celular: la vía extrínseca o de receptores de muerte, y la vía intrínseca o mitocondrial (Ouyang *et al.* 2012). La vía extrínseca o de receptores de muerte, como su nombre indica, se activa por la interacción entre una señal de muerte celular como el factor de necrosis tumoral (TNF), y su receptor de membrana, en la superficie celular. Esta señal activa una caspasa iniciadora (-8 o -10), y esta a su vez una caspasa ejecutora (-3, -6 o -7) (Kidd *et al.* 2000). Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial, desencadenada por estrés del retículo endoplásmico (ER) o por daño en el ADN; activa la expresión del gen supresor de tumores p53, que a su vez activa la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia bcl-2 (bax, bak y bid), las cuales se translocan a la membrana mitocondrial externa, induciendo la salida del citocromo c al citosol (Zhao *et al.* 2012). El citocromo c (citosólico) forma un complejo con los factores citoplásmicos Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) y la procaspasa-9 en presencia de ATP. Este complejo, denominado apoptosoma produce la activación de la caspasa-9, que a su vez corta y activa otras caspasas, como las caspasas -3 y -7 permitiendo la digestión de dianas cruciales que afecten a la viabilidad celular (Haupt *et al.* 2003; Ouyang *et al.* 2012).

La apoptosis, a menudo, se utiliza como sinónimo de “muerte celular programada” (MCP), porque muchos de los principales eventos de muerte celular se han identificado como tal. Sin embargo, trabajos más recientes han mostrado que, en particular, bajo circunstancias en las que las células se vuelven refractarias a la apoptosis, otras vías conducen a la MCP (Lockshin *et al.* 2004). En el caso de la involución, proceso en el cual se produce una MCP masiva del epitelio secretor, se encontró que dichas células no presentaban las características de una apoptosis típica.

La apoptosis típica se caracteriza a nivel general por: constricción de la membrana, disminución del tamaño celular, agrupación de orgánulos y densificación del citoplasma. Los cambios a nivel nuclear constituyen los rasgos más característicos, entre los que existe una condensación de la cromatina en masas densas bien definidas. El proceso finaliza con un desensamblaje de la estructura celular hasta formar vesículas rodeadas de membrana denominadas “cuerpos apoptóticos”, que se componen de citoplasma y orgánulos muy agrupados, pudiendo contener también fragmentos nucleares (Kanzler *et al.* 2000). Estos cuerpos apoptóticos serán fagocitados por las células sanas adyacentes del parénquima o por macrófagos, donde se degradarán con rapidez dentro de los lisosomas, gracias a su actividad enzimática (Maghsoudi *et al.* 2012). Sin embargo, durante la involución de la glándula mamaria se encuentran varias características atípicas que difieren de la apoptosis clásica. Entre éstas, la existencia de dos núcleos hipercondensados, hinchazón de las células (en contraste con la contracción de la membrana y la densificación del citoplasma) y ausencia de formación de invaginaciones en la membrana, por tanto ausencia de los cuerpos apoptóticos (ver figura 7).

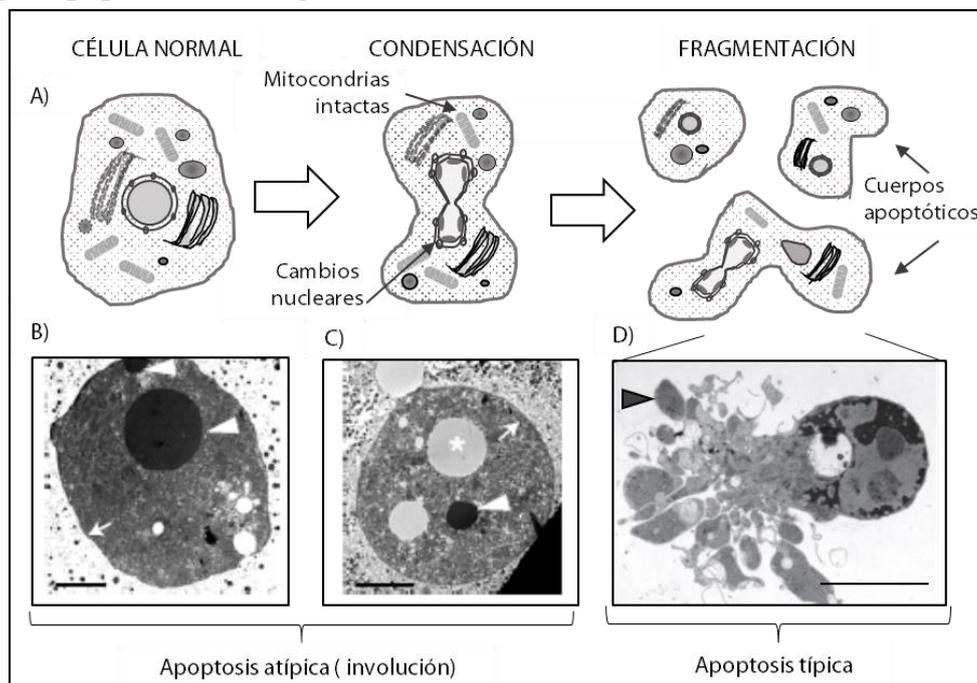


Figura 7: Análisis de la morfología de células en programas de MCP por microscopía electrónica de transmisión. A) Secuencia de cambios morfológicos observados a lo largo de un proceso de apoptosis típica. B) Célula pertenecientes a la involución de la glándula mamaria a las pocas horas de destete (6 h) muestra la ausencia

de formación de invaginaciones en la membrana (flechas) y dos núcleos hipercondensados (triángulos). C) Célula pertenecientes a la involución de la glándula mamaria a las 24 h de destete, donde se observa una vacuola almacenadora de lípidos (asterisco). D) Célula con un patrón de apoptosis típico, con los llamados cuerpos apoptóticos (triángulo) (Adaptado de Kreuzaler et al. 2011; Berghe et al. 2013). Escala: 2 μ m.

Teniendo en cuenta todas estas características, Kreuzaler *et al.* decidieron indagar en el mecanismo inductor de este tipo especial de apoptosis. Utilizando ratones mutantes *knockout* de caspasas-3 y -6, las principales ejecutoras de la apoptosis clásica, se observó que la involución transcurría en un modo normal. Por tanto, pensaron en la idea de que otro tipo de señales estaban implicadas en la inducción de la MCP de las células epiteliales. Identificaron STAT3, como una de las señales esenciales para el inicio de la involución después del destete, además de estar involucrado en la sobreexpresión de catepsinas y en la disminución de Spi2A (un inhibidor de catepsinas) (Kreuzaler *et al.* 2011).

Además durante la lactancia, observaron una disminución notable de las proteínas estructurales de la membrana lisosomal, LAMP1 y 2 (Kreuzaler *et al.* 2011). Dicha disminución les hizo pensar en una posible sensibilización de los lisosomas a la acción de determinantes agentes (como calpaínas, estrés oxidativo,...), los cuales podrían favorecer la liberación del contenido lisosomal. Su trabajo se centró en elucidar que efectivamente la MCP de las células epiteliales estaba mediada a través de una permeabilización de la membrana lisosomal (PML), liberándose el contenido de los lisosomas a medida que transcurre la involución. A favor de esta idea, vieron que las catepsinas B y L tenían incrementada tanto su expresión, como su actividad a lo largo del destete. El análisis por inmunohistoquímica reveló que, a pesar de que la catepsina B principalmente colocalizaba con LAMP2 durante la lactancia, con el inicio de involución esta colocalización se reducía drásticamente, sugiriendo la idea de que esta MCP estaba mediada a través de una PML(Kreuzaler *et al.* 2011) (ver figura 8).

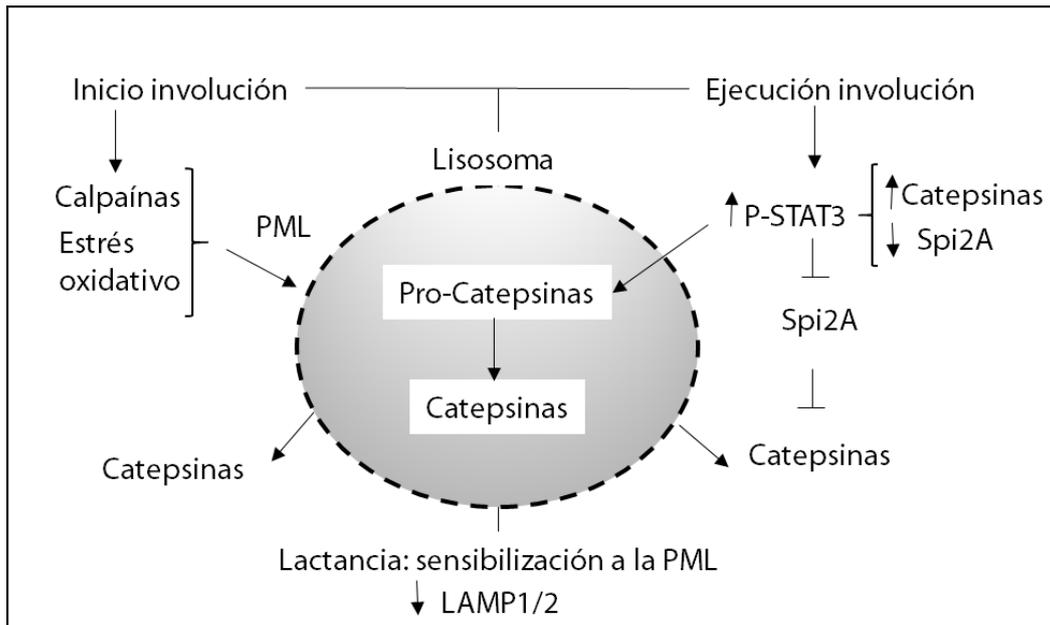


Figura 8: Resumen del modelo propuesto para la apoptosis atípica a través de la permeabilización de la membrana lisosomal. La estasis de leche, como consecuencia de la ausencia de succión por parte de las crías, podría activar determinadas señales (Calpaínas, estrés oxidativo, etc) que facilitarían la salida de las catepsinas al citosol. El incremento de STAT3 al inicio de la involución induce un incremento de la expresión de catepsinas junto con una disminución del inhibidor de las mismas (Spi2A). Además durante la lactancia se va produciendo una progresiva disminución de la proteína integral de membrana LAMP2, que confiere fragilidad al lisosoma y facilita la MCP a través de la PML.

2.2. REMODELACIÓN TISULAR POST-LACTANCIA.

La glándula mamaria de los roedores constituye un modelo ideal para el estudio de la acción de proteasas y de la remodelación tisular, ya que en dicho modelo la actividad proteasa es alta, sobre todo durante la pubertad y el destete. La remodelación postnatal de la glándula ocurre tanto en la pubertad, con el desarrollo del árbol ductal mamario, como con la involución de la glándula mamaria, durante la regresión postlactancia (Watson et al 2008). En estas etapas, la glándula mamaria sufre cambios estructurales dramáticos. Dos familias principales de proteasas de

matriz se activan durante la remodelación de la glándula mamaria, las metaloproteasas de matriz (MMP) y las catepsinas (Green *et al.* 2005).

Las MMP son una extensa familia de proteasas dependientes de Zinc (Zn^{2+}) capaces de degradar la matriz extracelular. Se sintetizan como zimógenos y sus miembros pueden ser divididos en ocho grupos con respecto a su estructura (Benaud *et al.* 1998). La mayoría de los miembros de la familia son secretados a la matriz, a excepción de seis que se mantienen unidos a la membrana. En cuanto a su nomenclatura, se puede referir a ellas tanto por la actividad específica que ejercen, por ejemplo, colagenasa-1; como por un sistema de denominación numérica más reciente, en este caso MMP1. La actividad de las MMP viene regulada *in vivo* a través de sus niveles transcripcionales; la acción de inhibidores endógenos, los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) (Zhang *et al.* 2009) y por la activación a partir de una forma de proenzima latente (Wiseman *et al.* 2003). Entre los factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de estas proteasas está el ácido retinoico, fundamental también durante el desarrollo mamario (Zaragozá *et al.* 2007). La familia de las MMP constituye uno de los efectores de la fase irreversible de la involución postlactancia, la cual comienza aproximadamente a las 48 h de destete (Werb *et al.* 1996; Li *et al.* 1997). Durante esta fase, se da una expresión sustancial de MMP que contribuyen a la degradación de la membrana basal, fenómeno que también conduce a la apoptosis de las células luminales y a la involución global de la glándula mamaria (Lund *et al.* 1996).

Otra familia de proteasas que participan en la segunda fase de la involución, es la familia de las catepsinas. Esta familia de hidrolasas lisosomales son capaces de degradar proteínas a un pH ácido. Sin embargo, aunque presenten también actividad a pH neutro, un aumento del pH, por lo general, resulta en un plegado irreversible reduciendo su tiempo de vida en el citosol. Pueden ser divididas en tres subgrupos según el aminoácido de su centro activo: catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W tienen una cisteína en su centro activo; catepsinas D y E tienen el ácido aspártico y la catepsina G tiene una serina (Palermo *et al.* 2008). Las catepsinas funcionan principalmente como endopeptidasas dentro de los compartimentos endolisosomales, aunque algunas tienen actividad exopeptidasa. De entre todas las

variantes, la cathepsina D (CD), la cathepsina L y la cathepsina B son las que presentan una mayor relevancia a lo largo de la involución (Castino *et al.* 2008).

Durante el destete, la función principal de la CD es actuar como una endopeptidasa, y se cree está involucrada tanto en la remodelación del estroma de la glándula mamaria, cuando es liberada al espacio extracelular, como también en la muerte celular mediada por la permeabilización lisosomal (Zaragozá *et al.* 2009; Kreuzaler *et al.* 2011). La CD sufre diferentes modificaciones postraduccionales a lo largo de las distintas etapas de desarrollo de la glándula mamaria, y este procesamiento da lugar a diferencias de actividad enzimática, que llevan a un mejor ajuste de su actividad. De hecho, al inicio de la involución, se han detectado cambios en el patrón de glicosilación, con una reversión de dicho patrón al cuarto día de involución (Margaryan *et al.* 2010). En este sentido, nuestro laboratorio también identificó la nitración como una de las modificaciones postraduccionales que sufre la CD a las 72 horas de destete, lo que conduce a un aumento de su actividad proteolítica, favoreciendo la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular (Zaragoza *et al.* 2009). En general, las complejas modificaciones postraduccionales de esta peptidasa están lejos de ser totalmente descubiertas, aunque se sabe que dichos cambios pueden tener un impacto en su función a lo largo de un proceso dinámico como la involución postlactancia de la glándula mamaria.

Como se ha descrito anteriormente, los lisosomas parecen jugar un papel esencial en la MCP de las células epiteliales a través de la PML (Kreuzaler *et al.* 2011), pero también son importantes las cathepsinas para la remodelación de la matriz extracelular. En este sentido, durante la involución de la glándula mamaria existe un incremento de la expresión de cathepsinas lisosomales (Zaragozá *et al.* 2009) lo que puede inducir a la idea de que dichas proteasas vayan a jugar un papel esencial en la remodelación postlactancia y en la MCP de las células epiteliales (Kreuzaler *et al.* 2011).

Otro tipo de proteasas no tan específicas de matriz, pero también activas a lo largo de la involución, serían las calpaínas (Arnandis *et al.* 2012). La historia de las calpaínas se remonta a mediados de los años 60, cuando Guroff describe por primera vez una proteasa neutra dependiente de Calcio (Ca^{2+}) en una fracción soluble de

cerebro de rata, que posteriormente fue purificada como una enzima, a partir de extractos musculares de pollo por Ishiura *et al.* en 1978. Esta proteasa se denominó “*calpaína*”. Este nombre deriva de las similitudes que presentaba con dos proteínas conocidas en ese momento: la calmodulina, que es la proteína que regula la transducción de la señales mediadas por Ca^{2+} en la célula, y la papaína, una cisteína proteasa presente en la papaya (Ohno *et al.* 1984). En el apartado tres se describen más detalladamente diversos aspectos fisiológicos y patológicos de las calpaínas, además de sus implicaciones en diversos orgánulos celulares.

Por tanto, se puede decir que por todas las características anteriormente mencionadas, el tejido mamario es un excelente modelo *in vivo* donde estudiar la regulación de dos procesos fundamentales: la muerte celular programada por un lado, y por otro, la diferenciación y proliferación. Ambos procesos ocurren físicamente en el mismo tejido y en las mismas condiciones de destete, pero cada uno acontece sobre diferentes tipos celulares. En este sentido, la muerte celular o apoptosis acaece sobre las células que componen el epitelio secretor, mientras que la proliferación y diferenciación tiene lugar en los adipocitos.

2.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN.

Gracias a los experimentos de sellado de tetilla de forma unilateral, se ha conseguido demostrar que la muerte celular programada (MCP) del epitelio, se inicia a las pocas horas por la acumulación de leche en la glándula, más que por la caída de las hormonas lactogénicas (Hanwell y Linzell. 1973; Nguyen *et al.* 2000; Hanayama *et al.* 2005). Así pues, permanecen por elucidar a nivel molecular cuáles serían las señales principales encargadas de desencadenar esta MCP del epitelio secretor. Entre las posibles señales identificadas como mediadoras:

i) La acumulación de leche, causada por la falta de succión, podría someter a las células alveolares a tensión mecánica o deformación física. Esta tensión podría ser, *per se*, el primer estímulo para activar la expresión y liberación de factores locales, que iniciarían la involución de la glándula mamaria (Quaglino *et al.* 2009). Hasta este momento, entre estos factores se ha identificado el factor inhibidor de la leucemia

(LIF), el cual a su vez activa STAT3 (Kritikou *et al.* 2003) para iniciar la cascada apoptótica.

ii) Cambios sistémicos en los niveles de hormonas, sobretodo de PRL y glucocorticoides (Anantamongkol *et al.* 2012). Con la pérdida de la lactancia, la leche se acumula dentro de la luz alveolar, y los niveles de hormonas lactogénicas sistémicas caen, entre ellas la PRL y los glucocorticoides. Esta caída sistémica de los niveles de hormonas que no es esencial en la primera fase de destete, debe producirse para poder avanzar a la segunda fase de carácter irreversible (Nguyen *et al.* 2000).

iii) Pérdida de señales de supervivencia debido a la interrupción del contacto celular con la membrana basal/extracelular (interrupción de contactos célula-matriz) (Sakakura *et al.* 2013).

Además de estas señales iniciadoras de la muerte celular del epitelio secretor, el proceso de involución así como la progresión a lo largo de las distintas fases involutivas, debe estar sometido a una estrecha regulación para que se produzca la perfecta coordinación y el tejido involucone en la dirección adecuada (Sutherland *et al.* 2007). Estudios llevados a cabo por nuestro grupo, así como por otros grupos del área, han demostrado que muchos de las vías que presentan cambios de expresión en la glándula mamaria durante la involución, participan también en el proceso y desarrollo de la transformación neoplásica del tejido mamario (Watson *et al.* 2006). De ahí que, vías de señalización con gran relevancia en el campo oncológico, sean las principales mediadoras del proceso involutivo: la familia de los STATs, NF- κ B, el NO, la vía de PI3K/AKT y diversas proteasas van a jugar un papel fundamental en la regresión postlactancia (Li *et al.* 1997; Brantley *et al.* 2000; Moorehead *et al.* 2001; Baxter *et al.* 2007; Zaragozá *et al.* 2009). A continuación se detallan los efectos y acción de estas vías en el contexto de la involución.

2.3.1. RELEVANCIA DEL BALANCE STAT3/STAT5 TRAS EL CICLO EMBARAZO-LACTANCIA.

Los factores de transcripción de la familia de los STATs, juegan un papel importante en la regulación del funcionamiento de la glándula mamaria durante el

embarazo, la lactancia y la involución (Vafaizadeh *et al.* 2010; 2012; Bertucci *et al.* 2010). El inicio de la involución, se caracteriza por cambios en el balance de los miembros de esta familia, concretamente se detecta un cambio en los niveles de STAT3/STAT5 (Walker *et al.* 2013a). El estado de fosforilación, que determina la actividad de estos factores de transcripción, cambia rápidamente al comienzo de la involución, y su estudio es importante para el seguimiento del progreso de este proceso (Sutherland *et al.* 2007).

En el pico de la lactancia, la vía JAK/STAT5 es muy importante para el funcionamiento de la glándula; ya que STAT5 juega un papel en la activación de la transcripción de genes que codifican proteínas de la leche (β -lactoglobulina, β -caseína, la proteína ácida del suero, etc), en respuesta a un aumento de PRL. En la actualidad, se sabe que dicho factor viene codificado por dos genes diferentes, STAT5a y STAT5b, cuyas proteínas participan en gran cantidad de vías de señalización (Walker *et al.* 2013a, b). De hecho, la deficiencia de STAT5a en ratones, resulta en una disminución en el desarrollo de la glándula mamaria. Por otro lado, la supresión de STAT5b por sí solo, da como resultado un fenotipo, que es idéntico al observado en ratones deficientes en el receptor de PRL, confirmando el hecho de que todas las funciones fisiológicas mediadas por PRL requieren STAT5a/b. Como consecuencia de esto, se sabe que STAT5 juega un papel clave, en el desarrollo lóbulo-alveolar que tiene lugar durante el embarazo, así como en el mantenimiento del epitelio secretor a lo largo de la lactancia (Caffarel *et al.* 2012; Iavnilovitch *et al.* 2002).

Tras el destete, durante las primeras horas de acumulación de leche (3-6 h), se induce la expresión de TGF β 3, que junto con LIF (Kritikou *et al.* 2003), hacen disminuir los niveles de STAT5a y STAT5b fosforilados, a la vez que se incrementa la fosforilación y activación de STAT3 con acción proapoptótica (Chapman *et al.* 1999). Esto induce la muerte celular programada del epitelio secretor durante el destete (Li *et al.* 1997; Teglund *et al.* 1998). La activación de STAT3 es crítica para el inicio de esta MCP, y su ausencia reduce drásticamente el número de células apoptóticas, aunque no suprime por completo la MCP (Chapman *et al.* 2000). La mayoría de los genes cuya expresión viene modulada por STAT3 participan en procesos inflamatorios y de respuesta aguda (Watson *et al.* 2008). Concretamente en

el proceso de involución, se ha visto que cuando STAT3 se transloca al núcleo, favorece la transcripción de genes que facilitan el transcurso de la MCP a través de la permeabilización de la membrana lisosomal, como la catepsina B. A su vez, impide la expresión de los inhibidores de catepsinas, como Spi2A (Resemann *et al.* 2013).

Por otro lado, dado que STAT3 y STAT5 regulan genes implicados en la proliferación y la supervivencia, no es sorprendente que la desregulación de STAT3 y STAT5 se produzca comúnmente en el cáncer de mama. Como se ha comentado, aunque estas proteínas sean estructuralmente similares, presentan efectos divergentes y opuestos a nivel de la expresión génica y del fenotipo celular (Watson *et al.* 2008). De hecho, si se compara la involución de la glándula mamaria con respecto a los diferentes tipos de cáncer de mama, nos encontramos ante una paradoja; ya que, el factor de transcripción STAT3 aumenta durante la involución de la glándula, y en el 70% de todos los tipos de cáncer. En los cánceres de mama, la activación simultánea de STAT3 y STAT5 se asocia con una mayor supervivencia de los pacientes, si se compara con los pacientes que solo presentan un aumento de STAT3 (Walker *et al.* 2013a, b).

2.3.2. IMPLICACIÓN DE NF- κ B.

El factor de transcripción NF- κ B, sigue un patrón de activación claramente regulado durante las distintas fases del desarrollo de la glándula mamaria (Brantley *et al.* 2000). NF- κ B es un factor de transcripción que se localiza en el citoplasma unido a proteínas inhibitoras denominadas I κ Bs (Hoffmann *et al.* 2002). En la ruta canónica de NF- κ B, el dímero formado por las subunidades p65 y p50 se mantiene en el citosol unido a su inhibidor I κ B α . La fosforilación de I κ B α por la I κ B kinasa 2 (IKK2) sirve como señal para que se produzca la ubiquitinación y degradación del inhibidor. Una vez liberado del inhibidor, el complejo formado por las subunidades p65/p50 se trasloca al núcleo, donde se une al promotor de sus genes diana implicados en procesos de señalización inter- e intracelular (Clarkson *et al.* 2000).

La actividad de NF- κ B aumenta durante el embarazo, cae en la lactancia y aumenta de nuevo en la involución del tejido mamario (Connelly *et al.* 2010), lo que sugiere que NF- κ B juega un papel importante durante el embarazo y la involución.

De ahí que, nuestro laboratorio se propusiera estudiar las dianas génicas de este factor de transcripción. Mediante experimentos de ChIP/chip se identificaron las dianas génicas de NF- κ B en el contexto de la involución de la glándula mamaria. Gran parte de dichas dianas estaban implicadas en procesos de apoptosis, uno de los eventos que caracteriza la involución. Concretamente genes como *Foxo 3*, *Trp73*, *Capn1*, *Capn2* y *Csl* se detectaron como dianas de dicho factor de transcripción (Torres *et al.* 2011). La regulación de las calpaínas por NF- κ B centró nuestra atención, de ahí que se continuara con el posterior estudio de las calpaínas en el contexto de la involución de la glándula mamaria (ver figura 9).

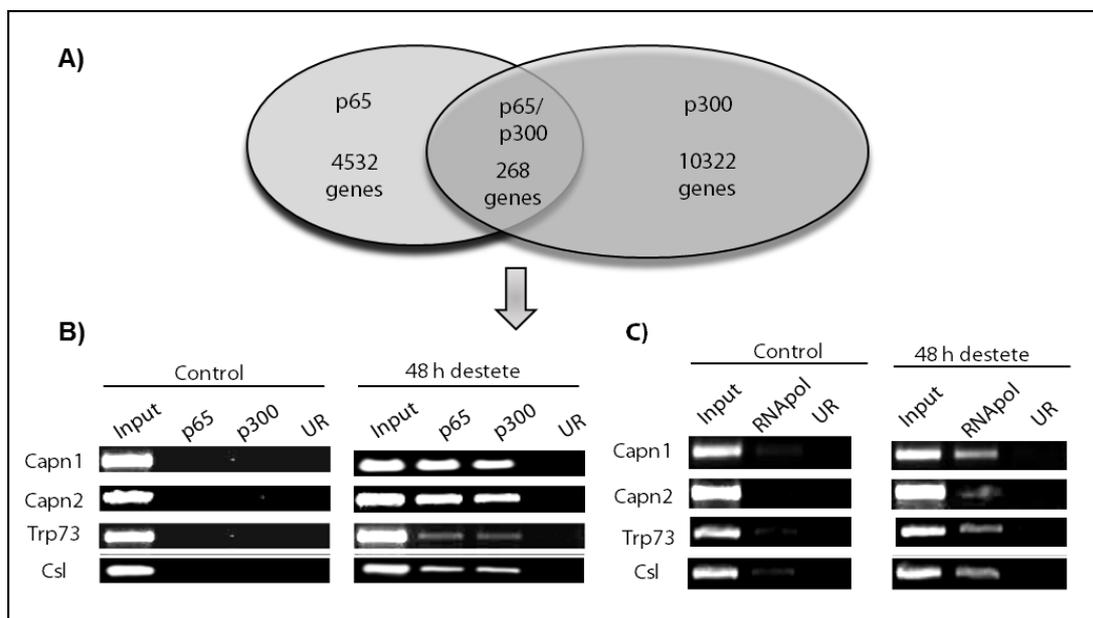


Figura 9: Mediante ChIP/Chip se identificaron posibles sitios de unión de NF- κ B a lo largo del destete. A) Para la subunidad p65 se encontraron 4.532 genes potenciales de unión, mientras que para p300 (coactivador transcripcional, acetil transferasa) fueron 10.322. Dicho análisis nos permitió encontrar 268 dianas génicas significativas comunes para ambas subunidades. B) Entre dichas dianas, aparecían genes implicados en procesos de transducción de señal y de apoptosis, dos de los eventos que caracterizan la involución. Concretamente genes como *Trp73*, las calpaínas (tanto la 1 como la 2) y la *Catepsina L* vienen modulados por dicho factor de transcripción. C) Por experimentos de RNAPol CHIP se comprobó la transcripción a tiempo real de estos genes a las 48 h de destete.

2.3.3. PAPEL DEL NO.

El óxido nítrico (NO) juega un papel fundamental en la remodelación post-lactancia de la glándula mamaria; modificando determinadas proteínas y actuando como señal reguladora del proceso de MCP (Zaragozá *et al.* 2010). Lizuka *et al.* demostraron que tras el destete se produce un aumento de NO (Lizuka *et al.* 1998), lo que conduce a la formación de especies más reactivas como el peroxinitrito, las cuales son capaces de producir alteración en los lípidos de membrana, daño al DNA y nitración de proteínas, modificando su función. Estos resultados sitúan al NO como una de las moléculas implicadas en MCP (Davis *et al.* 2001). Pero además, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio identificaron a NF- κ B como responsable de la inducción de la expresión de óxido nítrico sintasa 2 (NOS-2) durante la involución. Dicha enzima, es la encargada de producir NO en concentraciones elevadas, lo que explica el aumento de NO observado a medida que avanza el destete (Zaragozá *et al.* 2005b). Por otro lado, el déficit de GSH, que también conduce a la involución de la glándula mamaria, actúa por la misma vía, produciendo un aumento de los niveles de NO y de proteínas nitradas (Zaragozá *et al.* 2005a).

Siguiendo esta línea de investigación, en los últimos años hemos profundizado en el papel y la relevancia del NO como molécula de señalización intracelular. Las respuestas celulares a este radical libre dependen de la concentración del NO generado; a bajas concentraciones el NO actúa como transductor de señales mientras que a niveles elevados induce apoptosis y puede ser citotóxico (Brüne *et al.* 1999). En este sentido, se ha visto que el NO es una molécula altamente reactiva, que produce la nitración y/o nitrosilación de numerosas proteínas, alterando su función biológica. Por espectrometría de masas, hemos identificado a la catepsina D (CD) como una de las proteínas nitradas en el destete a las 72h. La CD es una proteasa aspártica lisosomal que, en el rango de pH 2.8-5.0, puede degradar proteínas estructurales, y hormonas polipeptídicas (Radisky *et al.* 2010). Esta proteasa también es un mediador esencial en los procesos apoptóticos, debido a su actividad proteolítica. De hecho, se ha observado que la CD madura se trasloca del lisosoma al citosol donde actúa sobre proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, viéndose implicada en los cambios que se producen en la membrana mitocondrial y que

concluyen con la liberación del citocromo c al citosol y la activación de las caspasas (Droga-Mazovec *et al.* 2008). Además de su papel en la vía mitocondrial, la CD también actuaría durante la involución de la glándula mamaria, favoreciendo la degradación de la matriz extracelular y la repoblación del tejido por adipocitos (Radisky *et al.* 2010). La nitración de dicha proteína durante el destete produce un aumento de su actividad proteolítica, favoreciendo su actividad a nivel de la matriz extracelular (Zaragozá *et al.* 2009).

De hecho, podría decirse que las diversas vías que participan en la regulación del proceso involutivo se encuentran estrechamente ligadas y reguladas, cooperando entre ellas, con el fin de dejar la glándula preparada para un nuevo ciclo de embarazo/lactancia (Baxter *et al.* 2007; Schedin *et al.* 2007). Un ejemplo de interregulación entre vías, se presenta cuando en ratones *knockout* de NOS-2, se observa un fenotipo en el que los niveles de NO están disminuidos existiendo a su vez un aumento de la fosforilación de STAT5, que conduce a un retraso en el inicio de la involución (Zaragozá *et al.* 2010). *In vitro* también se observan efectos de interrelación entre vías cuando por ejemplo, se aumentan los niveles de nitritos en el medio de células de cáncer de mama luminales (MCF-7). En dichos experimentos, se observa la activación de la vía de NF- κ B, ya que el inhibidor citoplásmico de este factor de transcripción, I κ B α , es degradado de forma proporcional a medida que se incrementa los niveles de NO (Bosch. A, 2013).

2.3.4. VÍA DE PI3K/AKT.

La ruta PI3K/AKT, presenta un papel importante en diversidad de funciones celulares tales como el crecimiento y la supervivencia celular, la división, el metabolismo, la apoptosis y la capacidad de migración (Baxter *et al.* 2007). Además, se ha visto que esta vía está involucrada en la regulación de la involución de glándula mamaria, ya que se ha demostrado que cuando se sobreexpresa, la involución se retrasa (Moorehead *et al.* 2001). En este sentido, un regulador negativo de dicha vía, PTEN, potencia la apoptosis en el epitelio de la glándula mamaria del ratón (Dupont *et al.* 2002).

A lo largo de la involución se ha observado que no solo disminuyen los niveles de AKT total de forma considerable, sino que la activación del mismo, a través de fosforilación (pAKT), también se reduce de forma dramática (Strange *et al.* 2001). Esta disminución, se correlaciona con el inicio de la fase apoptótica durante la involución. Más allá de la mera correlación, se ha conseguido demostrar la importancia de esta vía en la involución, gracias al uso de ratones transgénicos que sobreexpresan AKT de forma específica en la glándula mamaria (Schwertfeger *et al.* 2001). Varios estudios han demostrado que la expresión y activación constitutiva de AKT induce un retraso en la remodelación postlactancia, como era de esperar dado su carácter antiapoptótico (Hutchinson *et al.* 2001). El mecanismo principal por el que AKT ejerce este efecto de supervivencia, es a través de la fosforilación e inactivación de moléculas de gran relevancia en la apoptosis como caspasa- 9, Bad y FOXO3a (Baxter *et al.* 2007).

La vía de señalización de AKT constituye un ejemplo de interrelación entre vías, ya que alguno de sus mediadores interaccionan directamente con los STATs para modular su acción (Macías *et al.* 2012). En este sentido, se ha observado que el factor de transcripción STAT5 activado por la PRL, es capaz de unirse a secuencias consenso en el locus de AKT, para iniciar la transcripción de AKT1, isoforma específica de la glándula mamaria, la cual genera un gran efecto global de supervivencia. Por otro lado, el factor de transcripción STAT3 es capaz de inducir la expresión de dos subunidades inhibitoras de la PI3K, p50 α y p55 α , alterando la composición de la PI3K y por tanto restringiendo su actividad (Abell *et al.* 2005). Otro mecanismo por el que STAT3, ejerce este efecto inhibitorio sobre esta vía, es por la inducción de la síntesis de una proteína IGFBP5 (*Insulin-like growth factor binding protein-5*), que se une al IGF1, y lo mantiene secuestrado en micelas de caseína, impidiendo que ejerza su efecto proliferativo (Tonner *et al.* 1997).

3. IMPLICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS DURANTE LA REMODELACIÓN POSTLACTANCIA.

Como se ha comentado, estudios previos en nuestro laboratorio, demostraron que el factor de transcripción NF- κ B modula numerosos genes implicados en diversas

funciones fisiológicas, como la señalización celular y la apoptosis (Torres *et al.* 2011). Entre todas las dianas génicas de NF- κ B a lo largo del destete, se seleccionaron para su posterior estudio las calpaínas: *Capn1* y *Capn2*. Tres motivos llevaron a esta decisión: el primero, es la gran importancia de las proteasas durante la remodelación postlactancia; el segundo, que aún permaneciera por elucidar su papel durante el destete y el último, es que la muerte celular programada trascurriera a través de una permeabilización de la membrana lisosomal, siendo éstas las potenciales inductoras de dicha permeabilización. Experimentos *a posteriori* del grupo nos llevaron a confirmar que efectivamente conforme avanza la involución, existe un aumento de la expresión de estas proteasas que junto con un aumento considerable de la actividad, las convierten en elementos protagonistas del proceso involutivo, confirmando su importancia y trascendencia en la muerte celular programada (Arnandis *et al.* 2012).

3.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS CALPAÍNAS.

Las calpaínas son una familia de cisteín-proteasas citosólicas, capaces de escindir porciones limitadas de sus sustratos para inducir un cambio irreversible de su función (Franco *et al.* 2005). Entre dichos sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto y de membrana, canales iónicos, factores de transcripción, moléculas transductoras de señales, etc (Schiefer *et al.* 2013). El control de la actividad de estas proteasas está determinado por las concentraciones de Ca^{2+} (Campbell *et al.* 2012). De hecho, se ha observado que en condiciones de sobrecarga de calcio, cuando la actividad de estas enzimas es máxima, menos de un 5% de las proteínas son hidrolizadas por estas enzimas (Liu *et al.* 2008). Por tanto, las calpaínas tendrían una función reguladora al hidrolizar las proteínas, en lugar de ser meras proteasas con función degradativa.

Las calpaínas, que actúan a pH neutro, han sido encontradas en casi todos los organismos, desde mamíferos hasta *Drosophila Melanogaster*, así como en levaduras, bacterias, y plantas (Croall *et al.* 2007). Se conocen gran cantidad de miembros de esta familia, de los cuales las más abundantes y mejor caracterizadas son la μ -calpaína y la m-calpaína (calpaína 1 (CAPN1) y 2 (CAPN2), respectivamente). El término de

μ -/m-calpaína hace referencia precisamente a la concentración de Ca^{2+} requerida por cada una de ellas para su activación *in vitro* (μM o mM respectivamente) (Dutt *et al.* 2002; Dargelos *et al.* 2008). Ambas existen como heterodímeros, cada una con una subunidad catalítica distinta codificada por el gen *Capn1* y *Capn2* respectivamente; y una subunidad reguladora, común a ambas, codificada por el gen *Capn4* (Bever *et al.* 2008). Estas dos calpaínas son importantes para el correcto desarrollo de diversos procesos fisiológicos en vertebrados, hasta el punto de que ratones *knockout* para la CAPN2 no completan su desarrollo embrionario (Dutt *et al.* 2006). En la siguiente tabla se presentan ejemplos de consecuencias biológicas debidos al silenciamiento o a la mutación de diversos genes de calpaínas (tabla 1) (Croall *et al.* 2007).

Tabla 1: Resumen de defectos ocasionados por pérdidas o mutaciones en los genes de las calpaínas.

| Gen mutado | Organismo | Consecuencias biológicas |
|---|---|---|
| Capns1 (Capn4) | M. Musculus | Embrión no viable |
| Capn1 | M. Musculus | Viable, ratón fértil, cambios en la agregación plaquetaria |
| Capn2 | M. Musculus | Embrión no viable |
| Capn3/Mutaciones naturales en Capn3 | M. Musculus /H. Sapiens | Defectos en la reparación muscular, miopatía/Distrofia muscular de cintura o pélvica (LGMD2A) |
| Capn9 | Cultivo celular de M. Musculus (NIH3T3) | Incremento del crecimiento, posible papel como supresor tumoral |
| Capn10 variaciones interindividuales | H. Sapiens | Riesgo potencial de desarrollar diabetes tipo2 |
| Capn5 (Tra3) | C. Elegans | Defectos en la determinación del sexo |
| Capn7 (PalB) | Emericella nidulans | Alteraciones en las vías de transducción de señal dependientes del pH |

3.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Tanto la CAPN1 como la CAPN2 son heterodímeros formados por una subunidad mayor de 78-80 kDa (subunidad catalítica) y una más pequeña de 28 kDa (subunidad reguladora). La secuencia aminoacídica de la subunidad mayor es diferente para cada una de estas calpaínas, aunque comparten una homología del 60%. Según esta secuencia aminoacídica, podemos diferenciar cuatro dominios (dI-dIV) en la subunidad catalítica, mientras que la subunidad reguladora presentaría dos dominios (dV y dVI) (figura 10). Las características de cada dominio serían:

i) El dominio I (dI), ubicado en el extremo aminoterminal de la subunidad catalítica, constituye una α -hélice que interacciona con el dominio VI (dVI) y que contribuye a la estabilidad de la proteína (Wu *et al.* 2007). Además contiene un sitio de autólisis y una homología del 72-86% entre especies (Goll *et al.* 2013).

ii) El dominio II (dII) está subdividido según resultados de estudios cristalográficos en dos subdominios dIIa y dIIb, y contiene una secuencia similar a la detectada en el centro activo de la papaina. Mediante mutagénesis dirigida se han identificado los aminoácidos implicados en la catálisis enzimática. La triada catalítica de CAPN1 está formada por Cys115, His272 y Asn296 mientras que para la CAPN2 está formada por Cys105, His262 y Asn286. Estos aminoácidos son los responsables del mecanismo de catálisis general de las cisteín-proteasas (Wu *et al.* 2007).

iii) El dominio III (dIII) está formado por ocho láminas β y tiene homología con una región de la proteína quinasa C, la cual se conoce que interacciona con Ca^{2+} y fosfolípidos de membrana (Gil-Parrado *et al.* 2003). En concreto, se ha propuesto, que una zona ácida dentro de dIII, podría tener un importante papel en la activación de la calpaína por Ca^{2+} (Goll *et al.* 2003)

iv) El dominio IV (dIV) constituye la parte carboxiterminal de la subunidad catalítica. Presenta cierto grado de homología con la calmodulina y cinco secuencias de unión a Ca^{2+} del tipo mano EF. La dimerización de las dos subunidades está mediada por la quinta mano EF, ubicada en los residuos carboxiterminales de los

dIV y dVI (Dutt *et al.* 1998), que no solo están altamente conservados, sino que presentan un alto grado de identidad entre ambas subunidades.

v) El dominio V (dV) constituye la parte aminoterminal de la subunidad reguladora y está constituida fundamentalmente por residuos hidrofóbicos y múltiples residuos de glicina. Existen evidencias de la implicación de esta subunidad como mediadora de la interacción de las calpaínas con membranas (Fernández-Moltalván *et al.* 2006)

vi) El dominio VI (dVI) conforma la parte carboxiterna de la subunidad reguladora y presenta cinco secuencias de unión a Ca^{2+} del tipo mano EF, además de cierto grado de homología con la calmodulina (como el dIV). En este sentido, otras proteínas con cinco secuencias de unión al Ca^{2+} del tipo mano EF también se ha visto que forman dímeros y que se asocian a membranas, dos de las propiedades que presentan las calpaínas.

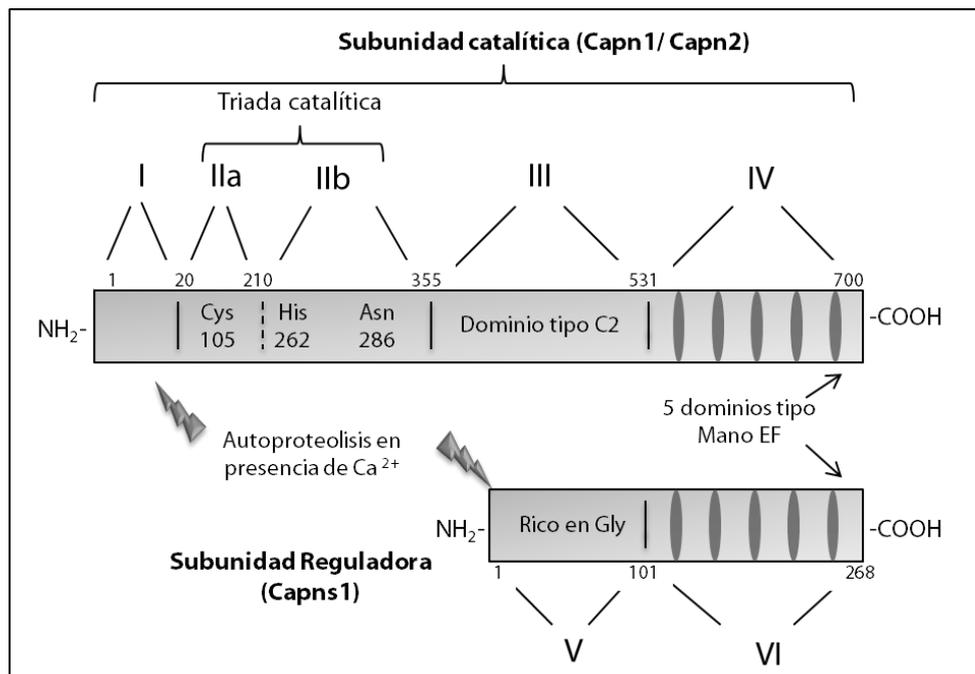


Figura 10: Representación esquemática de la estructura general de las calpaínas. Se indican los dominios de la subunidad catalítica de las calpaínas (imagen superior) y el lugar de corte autocatalítico de la misma cuando es activada por calcio, así como los dominios de la subunidad reguladora (imagen inferior).

Existen hasta 14 miembros diferentes de la familia de las calpaínas en mamíferos. Se puede definir como criterio para identificar una molécula como un miembro de la familia de las calpaínas, la existencia de cierta homología ($\geq 20\text{-}25\%$) de secuencia, con el dI y dII de las calpaínas ubicuas (CAPN1 y CAPN2) (Croall *et al.* 2007). Estos 14 genes tienen propiedades muy divergentes, si no se tiene en cuenta la homología con el dI y el dII (Sorimachi *et al.* 2011). A su vez, los miembros de esta familia pueden agruparse en dos categorías generales: calpaínas "típicas", se define como aquellas calpaínas que en su estructura incluyen en el dIV, motivos del tipo mano EF y las calpaínas "atípicas", que no tienen en el dIV secuencias de este tipo (algunos incluso carecen del dIV), por lo que no está claro si son Ca^{2+} -dependientes (Goll *et al.* 2003, Wu *et al.* 2007) (Figura 11).

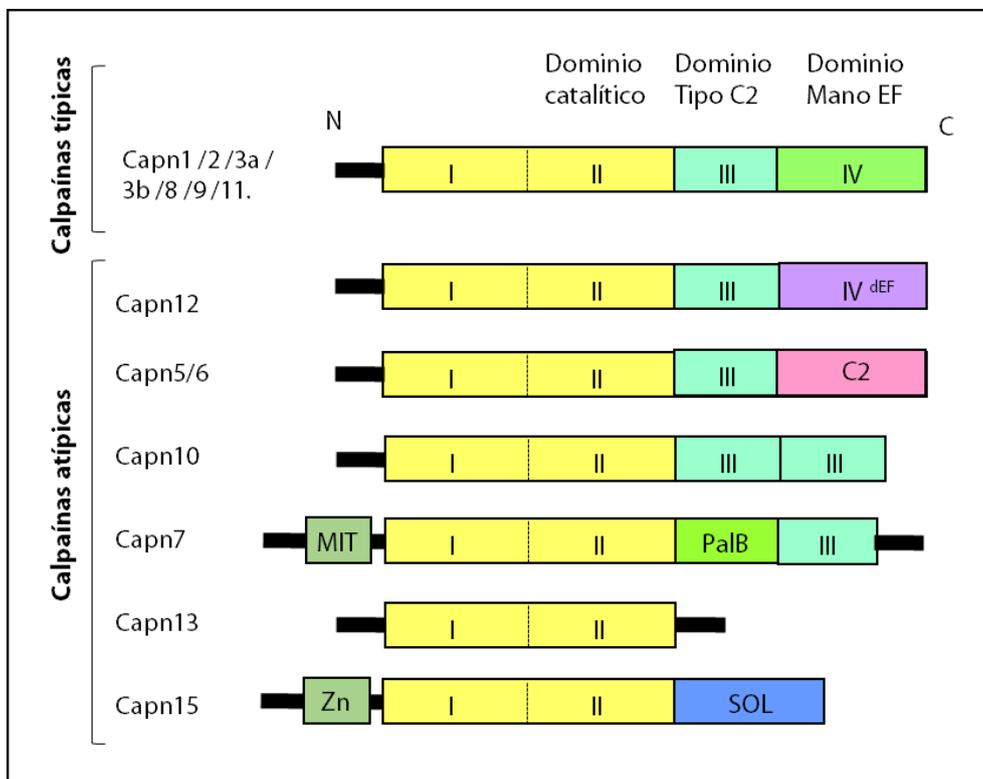


Figura 11: Los miembros de la familia calpaína presentan una arquitectura modular. La presencia de los dominios dI y dII sirve para incluirse dentro del grupo calpaína caracterizando a la familia, sin embargo, la distinción entre típicas o atípicas viene determinada por la presencia de los cinco dominios tipo mano EF de unión a Ca^{2+} . Abreviaciones: C2, región 2 conservada de la protein kinasa C (dominio involucrado en la unión a fosfolípidos); IV^{dEF}, es un dIV con motivos tipo mano EF degenerados con incapacidad para unir Ca^{2+} ; PalB, dominio homólogo de PalB; MIT, dominio capaz de

interaccionar con los microtúbulos y el tráfico de moléculas; ZN, dominio dedo de Zn^{2+} ; SOL, dominio pequeño del lóbulo óptico.

3.3. ACTIVIDAD CALPAÍNA Y SU REGULACIÓN.

La actividad de la calpaína está regulada principalmente por la presencia de Ca^{2+} , tanto temporal como espacialmente (Suzuki *et al.* 1979). Habitualmente, la calpaína se encuentra como un heterodímero en el citosol, en situación inactiva, unida a su inhibidor fisiológico, la calpastatina (Lopatniuk *et al.* 2011). En respuesta a un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, la enzima se desplaza hacia la membrana (Suzuki *et al.* 1992), donde existe mayor probabilidad de que existan incrementos locales en las concentraciones de Ca^{2+} que lleven a su activación (Campbell *et al.* 2012). En la membrana, la calpaína se activa en presencia de una elevación de los niveles de este ion y la unión a fosfolípidos (Saido *et al.* 1992). Por tanto, el Ca^{2+} es capaz de regular la actividad de las calpaínas mediante tres mecanismos fundamentales: la autoproteólisis, la unión a calpastatina y la traslocación a membranas (Pal *et al.* 2001) (ver figura 12). Existe un cuarto mecanismo de regulación de la actividad calpaína, donde el Ca^{2+} no juega un papel fundamental, y es la fosforilación (Glading *et al.* 2004).

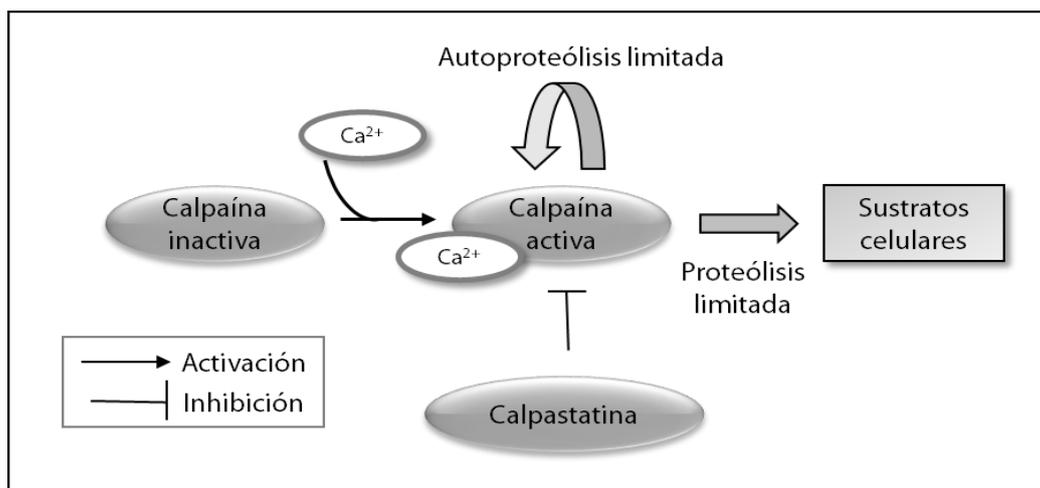


Figura 12: Mecanismo de activación de las calpaínas. El incremento en los niveles de calcio lleva a la activación de la calpaína a través de la autoproteólisis. Para que la calpastatina pueda ejercer su función, y por tanto inhibir a la calpaína, esta última debe presentar su conformación activa.

3.3.1 AUTOPROTEÓLISIS.

Un incremento de los niveles de Ca^{2+} en regiones próximas a las calpaínas provoca la autoproteólisis, es decir, la hidrólisis autocatalítica del dominio I (dI) y del dominio V (dV) (extremos amino-terminales de las dos subunidades). En ausencia de Ca^{2+} , los subdominios que constituyen el dominio catalítico dIIa y dIIb, se encuentran separados debidos a restricciones conformacionales impuestas por los aminoácidos que componen la proteína (Goll *et al.* 2003). Esta restructuración de la enzima debido a la presencia de Ca^{2+} , facilita la formación de un sitio catalítico funcional (Chou *et al.* 2011). Por ejemplo, para la CAPN2 se pueden encontrar al menos tres sitios diferentes de unión al Ca^{2+} : a los dominios tipo calmodulina (IV y VI), a un bucle ácido presente en el dominio III y al dominio proteolítico (dominio II) (Moldoveanu *et al.* 2002).

Dicho mecanismo de autoproteólisis sugiere la idea de que, como muchas otras proteasas, las calpaínas se sintetizan como proenzimas y requieren de un paso previo de proteólisis para ejercer su actividad. La principal consecuencia biológica de la autólisis es la disminución de los requerimientos de Ca^{2+} necesarios para su activación, pasando de 3-50 a 0.5-2 μM para la CAPN1 y de 400-800 a 50-150 μM para la CAPN2, sin afectar a la especificidad por el sustrato (Li *et al.* 2004).

3.3.2. UNIÓN A CALPASTATINA

La calpastatina, es el único inhibidor natural conocido de la calpaína, que también está implicado en su regulación (Wendt *et al.* 2004). Se trata de una proteína monomérica, estable al calor y resistente a la urea y al tratamiento con SDS (Otsuka *et al.* 1987). Un solo gen codifica la calpastatina, sin embargo, han sido identificadas hasta el momento en mamíferos, más de ocho isoformas diferentes, debido a mecanismos de *splicing* alternativo y a la presencia de varios promotores, (Parr *et al.* 2001; Takano *et al.* 2000).

La calpastatina contiene seis dominios: XL, L, I, II, III y IV. El dominio XL se encuentra en la parte N-terminal de la proteína. Algunas isoformas carecen de esta región. Dichas parte contiene sitios de fosforilación mediada por *Protein Kinasa A*

(PKA) (Cong *et al.* 1998), que podrían participar en la regulación de su actividad y en su localización (Averna *et al.* 2003). El dominio L presenta heterogeneidad entre las distintas isoformas, ya que su gen alberga promotores alternativos y múltiples sitios de *splicing*. Un estudio reciente mostró que el dominio L también podía mediar interacciones con calpaína de forma independiente de Ca^{2+} (Melloni *et al.* 2006). Los otros cuatro dominios, del dI al dIV comparten cierta homología. Cada una de estas regiones es capaz de inhibir una molécula de calpaína, con lo que en teoría, una molécula de calpastatina debería ser capaz de inhibir cuatro moléculas de calpaína (Hanna *et al.* 2007). Cada uno de estos dominios (I-IV) presentan tres subdominios repetidos en tándem, llamados A, B y C. La región B es la que posee actividad inhibitoria, mientras que las regiones A y C simplemente potencian el efecto inhibitorio de la región B (Todd *et al.* 2003) (Figura 12). En presencia de Ca^{2+} , la región A y la región C interactúan con el dominio IV y el dominio VI de la calpaína respectivamente, posicionando así la región inhibitoria B en la vecindad del sitio activo de las calpaínas (Stabach *et al.* 1997). Dado que se requiere la interacción de la calpastatina con ambas subunidades de calpaína para una inhibición adecuada, solo las isoformas heterodiméricas de la calpaína pueden ser reguladas por calpastatina.

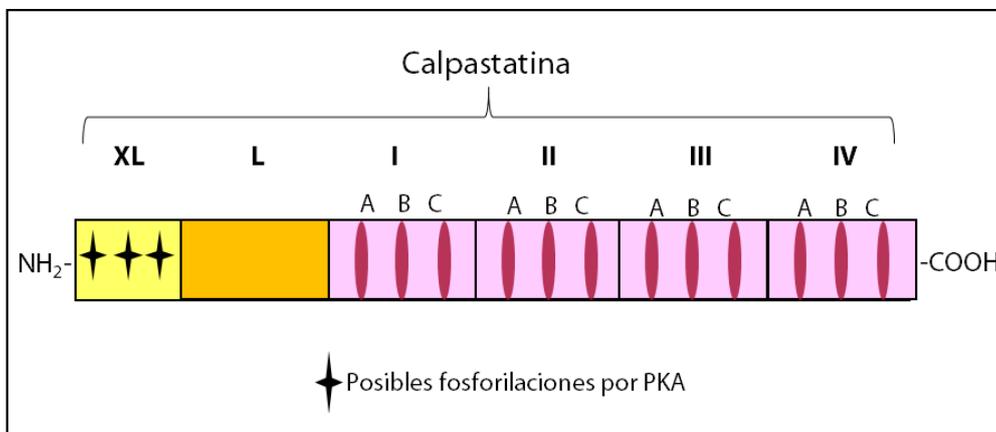


Figura 13: Diagrama esquemático de la estructura de la calpastatina. En ella se pueden apreciar, los seis dominios por los que está constituida. El dominio XL puede sufrir fosforilaciones que afecten a su regulación o incluso a su localización.

3.3.3. TRASLOCACIÓN A MEMBRANAS

La traslocación a membrana de las calpaínas ha sido observada en multitud de condiciones y modelos experimentales, aunque con disparidad en las condiciones

de activación (Molinari *et al.* 1994). Los dominios proteicos implicados en la interacción con la membrana parecen ser el dIII (tipo C2) y/o el dV (rico en dominios hidrofóbicos y Gly) (Kawashima *et al.* 1992). El papel que tiene la traslocación a la membrana en la regulación de la actividad de las calpaínas está por determinar, pero podría servir para:

- i) reducir los requerimientos de Ca^{2+} debido a la interacción con proteínas y/o lípidos de membrana (Coolican *et al.* 1984),
- ii) mantenerlas fuera del alcance de la calpastatina (Molinari *et al.* 1997),
- iii) aproximarlas a sus sustratos localizados en membrana (Youn *et al.* 2009) y
- iv) localizarlas en regiones con elevadas concentraciones y/o flujos de calcio (Hood *et al.* 2006).

3.3.4. FOSFORILACIÓN.

Además de estos tres mecanismos generales de regulación, se ha visto que la fosforilación de la calpaína puede ser otro mecanismo importante para la regulación de su actividad. De este modo, se ha demostrado que factores de crecimiento tales como *Epidermal Growth Factor* (EGF) son capaces de activar a la CAPN2 mediante fosforilación mediada por *Extracelular signal-Regulated Kinase* (ERK) tanto *in vivo* como *in vitro*; y que esa activación puede ocurrir incluso en ausencia de un flujo de Ca^{2+} en el citosol (Glading *et al.* 2004). Por otro lado, la fosforilación de la calpaína en Ser-369 en el dIII por la PKA, restringe el movimiento del dominio manteniendo la calpaína en su estado inactivo. Se puede decir que según el tipo celular y el contexto, la fosforilación actúa en uno u otro sentido (Dargelos *et al.* 2008).

3.4. FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LAS CALPAÍNAS.

Aunque su descubrimiento data de la década de los sesenta, las funciones fisiológicas de las calpaínas permanecen sin precisar con exactitud (Momeni *et al.* 2011). Sin embargo, la identificación de sustratos fisiológicos junto con estudios moleculares y farmacológicos han proporcionado claras evidencias acerca de la posible función de estas proteasas (Goll *et al.* 2003).

De entre todos los sistemas proteolíticos intracelulares, las calpaínas presentan determinadas peculiaridades, que las hacen únicas. En este sentido, el sistema ubiquitin- proteasoma degrada y elimina proteínas diana previo etiquetado de sus sustratos con ubiquitina (Tanaka *et al.* 2009). El sistema de digestión a través de la vía autofagia- lisosomas, degrada principalmente componentes celulares no específicos, incluyendo proteínas y microorganismos, contenidos en las membranas de los autofagosomas con el fin de eliminarlos y/o reciclarlos (Mizushima *et al.* 2010). La familia de las caspasas constituye otro sistema importante de proteólisis intracelular, pero principalmente con funciones apoptóticas (Fiandalo *et al.* 2012). En contraste, las calpaínas difieren de los otros sistemas en tanto y cuanto no necesitan que sus sustratos estén previamente etiquetados interactuando directamente con estos, y participan en el procesamiento proteolítico de forma específica, en lugar de una mera degradación de proteínas. Con ello consiguen modular o modificar diversas propiedades del sustrato, entre ellas la actividad, la especificidad, la longevidad, la estructura e incluso la localización (Sorimachi *et al.* 2011).

Se han identificado más de cien proteínas diferentes que son dianas de las calpaínas. Entre ellas podemos encontrar proteínas del citoesqueleto (talina, vinculina, catenina, etc) (Liu *et al.* 2003), proteínas de membrana (bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, PMCA2, etc), quinasas (PCK, FAK, etc) y factores de transcripción (C/EBP, p53, etc) (Dargelos *et al.* 2008). Dado este amplio espectro de sustratos, las calpaínas van a verse implicadas en diversas funciones, tanto fisiológicas como la migración, la proliferación celular, control del ciclo celular y la apoptosis; así como patológicas: diversos tipos de cáncer, diabetes tipo 2, distrofias musculares, enfermedades neurodegenerativas, etc.

3.4.1. MIGRACIÓN Y ADHESIÓN CELULAR.

La remodelación del citoesqueleto es quizás, una de las funciones mejor documentadas de las calpaínas (Lebart *et al.* 2006), y en este sentido, los componentes de los complejos de adhesión focal se encuentran entre sus sustratos más conocidos (Kulkarni *et al.* 1999; Franco *et al.* 2005). Las adherencias focales son grandes complejos proteicos dinámicos a través de los cuales el citoesqueleto de una célula se conecta a la matriz extracelular (ECM). Durante la migración celular, se produce el

ensamblado dinámico y desmontaje de estas adhesiones focales, dando lugar a cambios tanto en la composición, como en la morfología de estos complejos (Webb *et al.* 2005).

Se ha visto que las calpaínas están implicadas en dichas reorganizaciones del citoesqueleto. Por ejemplo durante el proceso de miogénesis, se ha observado que la escisión de desmina, talina y fibronectina por la CAPN2 es necesaria para modificar la fluidez de la membrana y la organización del citoesqueleto, permitiendo de este modo la correcta fusión de los mioblastos (Dedieu *et al.* 2004). Considerando que la migración puede ser explicada como una sucesión de procesos de adhesión y de desadhesión, se ha visto que la CAPN1, controla la adhesión a través de la regulación de las Rho GTPasas, proteínas involucradas en la formación de lamelipodios, adherencias focales y fibras de estrés (Glading *et al.* 2002). Sin embargo la CAPN2, se la ha relacionado con el proceso de desadhesión a través de la proteólisis de talina, paxillina, *focal adhesion Kinases* (FAK), cortactina y espectrina (Liu *et al.* 2003). El resultado es la desorganización de las adhesiones focales (Perrin *et al.* 2006).

3.4.2. VÍAS DE SUPERVIVENCIA Y CICLO CELULAR.

Las calpaínas juegan un papel en el control de la supervivencia y el ciclo celular (Goll *et al.* 2003). Participan en la regulación de estos procesos a través de la escisión de diferentes tipos de moléculas como factores de transcripción (p53, c-Fos, c-Jun), ciclinas (ciclina D1) e inhibidores de ciclinas (p27^{Kip1}); que a su vez se encargan del control del ciclo celular. Numerosos estudios apoyan esta idea, realizados en diferentes tipos celulares pero basados todos ellos en un mismo principio: el uso de inhibidores específicos de calpaínas o la sobreexpresión de calpastatina, el único inhibidor fisiológico conocido.

Por citar algunos estudios, Delma *et al.* comprueban que la degradación de un inhibidor de ciclinas quinasa, p27^{Kip1}, dependiente de la proteína quinasa activadas por mitógenos, está mediada por calpaínas. Contribuyendo en este caso, a la baja estabilidad o degradación de p27^{Kip1}, responsable de un peor fenotipo en líneas celulares transformadas (Delmas *et al.* 2003). Por otra parte, para el caso de la ciclina D1, por ejemplo, se sabe que está implicada en la progresión hacia la fase G1 del

ciclo celular, y sus niveles disminuyen cuando se priva con suero las células (NIH3T3). Si en esta situación se inhiben las calpaínas, la disminución de la ciclina D1 con la consiguiente entrada en quiescencia no es observada, demostrando su clara implicación en este importante proceso (Goll *et al.* 2003). Otro grupo observó que la CAPN2 está involucrada en la correcta alineación de los cromosomas durante la fase metafásica de la mitosis (Honda *et al.* 2004). Con estos ejemplos, se demuestra que las calpaínas presentan un potencial regulador del ciclo celular (figura 14).

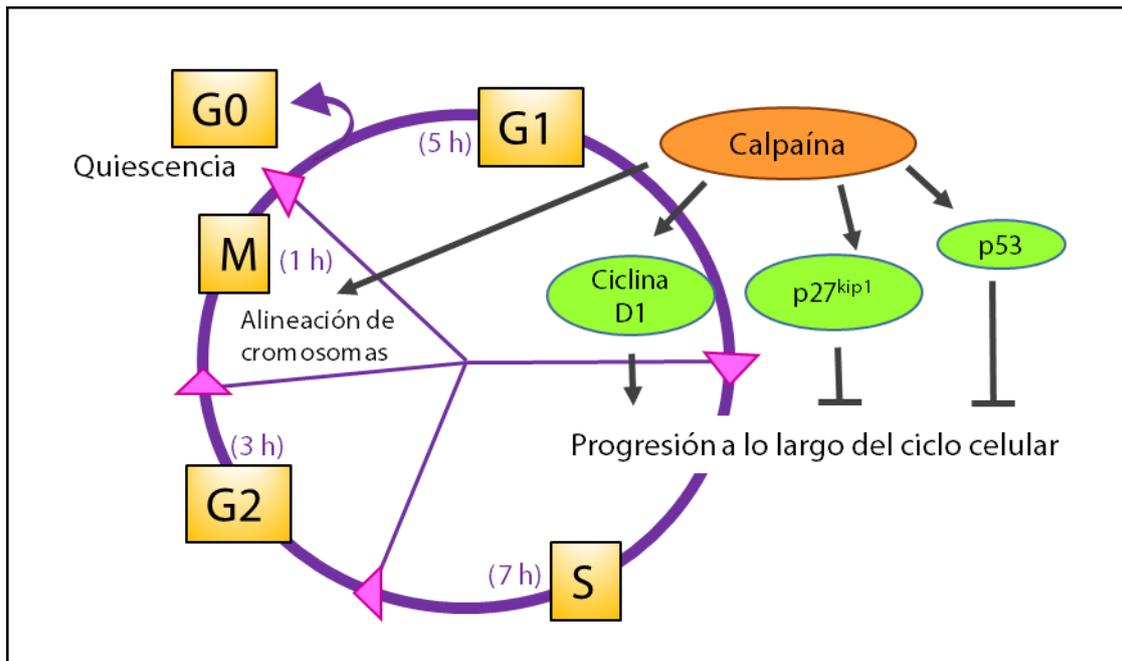


Figura 14: Función de las calpaínas en el control y regulación del ciclo celular.

3.4.3. APOPTOSIS.

La implicación de las calpaínas en la apoptosis fue descrita por primera vez en 1993. Actualmente se desconoce el papel exacto de las calpaínas en la apoptosis, pero parece que su implicación quedaría limitada a ciertos tipos celulares y determinados estímulos (Harriman *et al.* 2002; Kim *et al.* 2002; Momeni *et al.* 2011). Existen muchas dificultades a la hora de definir el papel exacto de las calpaínas en la apoptosis, ya que como se ha comentado en diferentes modelos se obtienen resultados opuestos.

La mayoría de las rutas apoptóticas descritas transcurren a través de cambios mitocondriales. En estas vías se produce una permeabilización de la membrana mitocondrial, la cual favorece la salida al citoplasma del citocromo c y otras proteínas proapoptóticas como Smac/DIABLO, AIF, etc. Una vez en el citosol, el citocromo c, junto con APAF-1 y en presencia de ATP, forma un complejo denominado apoptosoma, que activa la procaspasa-9 y desencadena la activación del resto de caspasas efectoras (Ghayur *et al.* 1997).

En este mismo sentido, se ha descrito que las calpaínas pueden influenciar en gran medida, la disfunción mitocondrial (Kar *et al.* 2010; Mizukoshi *et al.* 2010). Por un lado, las calpaínas pueden actuar sobre miembros la familia de bcl2 como Bid y Bax, facilitando la salida de factores proapoptóticos de la mitocondria (Bever *et al.* 2008). También, ha sido descrito que la CAPN2 es capaz de escindir la procaspasa-12 para generar un caspasa activa, y que escinde también la región del lazo del Bcl-xl para transformar una molécula antiapoptótica en una molécula proapoptótica (Neuman *et al.* 2001). Sin embargo, también puede actuar directamente sobre factores iniciadores de la cascada apoptótica, activándolos e induciendo la liberación de los mismos, entre estos el AIF (Chen *et al.* 2001; Takano *et al.* 2005). El AIF truncado (tAIF), y por tanto activo, es capaz de liberarse de la mitocondria e iniciar una apoptosis independiente de caspasas (Polster *et al.* 2005; Cao *et al.* 2007).

Como se ha comentado, también pueden presentar un papel antiapoptótico en determinados tipos celulares. Por ejemplo, la hidrólisis de la caspasa-3, -7, -8, -9 por dichas proteasas presenta consecuencias antiapoptóticas (Bizat *et al.* 2003; Chua *et al.* 2000). Muchas de las proteínas antes mencionadas, son sustratos potenciales de las calpaínas y dependiendo de la señal recibida por la célula, las calpaínas van a degradar unos u otros comportándose como factores pro- o antiapoptóticos (Gafni *et al.* 2009).

3.4.4. DIFERENCIACIÓN CELULAR.

La actividad calpaína se ha visto involucrada también en procesos de diferenciación de células madre mesenquimales de diferentes linajes, tales como mioblastos, osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Yajima *et al.* 2002). De hecho, se

ha demostrado que durante la diferenciación de las células musculares, las calpaínas se trasladan a la membrana celular de mioblastos en respuesta a flujos de Ca^{2+} y participan en la degradación de proteínas de fusión (Dourdin *et al.* 1997; Cottin *et al.* 2000). Por otro lado, también se ha descrito una implicación de las calpaínas en la regulación de la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1, en adipocitos (Yajima *et al.* 2006). Esta posible implicación, ha sido explicada de diversas formas, según el estadio de la diferenciación que se ha estudiado. Por un lado, durante la fase de expansión clonal de los 3T3-L1, la transición de preadipocito a adipocito viene controlada por la activación transcripcional del *CCAAT/ Enhanced binding protein* (C/EBP α) debida a las calpaínas. La inhibición de éstas impedirían la unión de C/EBP β , un activador transcripcional de C/EBP α , a los elementos reguladores C/EBP ubicados en el promotor del gen de C/EBP α . Dicho factor, el cual funciona como un activador transcripcional pleiotrópico de numerosos genes de adipocitos, tales como la leptina, la adiponectina o PPAR γ ; es considerado, junto con el PPAR γ un regulador esencial de la adipogénesis (Patel *et al.* 1999; Musri *et al.* 2010).

Sin embargo, teniendo en cuenta que los adipocitos son células almacenadoras de energía e inmóviles, es de suponer que durante su diferenciación vayan a existir cambios morfológicos acompañados de alteraciones en la adhesión y en la motilidad. Dada la clara implicación de las calpaínas en estos dos procesos, otro grupo se propuso estudiar cambios en FAK (*Focal adhesion kinase*). De hecho, observaron que en el proceso de diferenciación terminal de los adipocitos, la escisión de las FAK por parte de las calpaínas es un mecanismo necesario para la maduración final de los mismos, y la inhibición de éstas desemboca en un retraso en la diferenciación terminal (Li *et al.* 2007).

3.5. IMPLICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS EN PROCESOS PATOLÓGICOS

En el punto anterior, se ha explicado la gran variedad de funciones fisiológicas que pueden presentar las calpaínas, entre ellas: la regulación del ciclo celular, la diferenciación, la migración y adhesión celular, la regulación de la expresión génica y la escisión de sustratos en vías de apoptosis (Chakraborti *et al.* 2012; Campbell *et*

al. 2012). De ahí que, se hayan observado defectos en su regulación en diversos procesos patológicos como: diversas distrofias musculares, diabetes mellitus tipo 2, cataratas, Alzheimer y otras enfermedades neurológicas, diversos tipos de cáncer, etc (Huang *et al.* 2001) (tabla 2).

La activación de calpaínas se ha identificado como un elemento común en una gran variedad de desórdenes neurológicos. Se cree que las calpaínas “clásicas” intervienen en los eventos moleculares que desembocan, en la “hiperfosforilación de tau” (Battaglia *et al.* 2003; Liu *et al.* 2005), una de las proteínas desreguladas en las neuronas de pacientes enfermos de Alzheimer (Garg *et al.* 2011). Otro desorden neurológico asociado a la actividad de la calpaína, es la enfermedad de Huntington. Las calpaínas, aunque también el proteasoma y las caspasas, han demostrado que pueden escindir la proteína HTT (*Huntington protein*) por multitud de lugares, generando fragmentos proteicos de elevada toxicidad, los cuales conllevan a la pérdida neuronal asociada a la enfermedad de Huntington (Vosler *et al.* 2008; Southwell *et al.* 2011). En la enfermedad de Parkinson, se ha observado que la α -sinucleína, la proteína que constituye los cuerpos de inclusión o Cuerpos de Lewy localizados en el citoplasma de las neuronas de los enfermos de Parkinson, es también uno de los sustratos típicos de las calpaínas. Además se ha observado una sobreexpresión de la CAPN2 en el cerebro de enfermos de Parkinson (Dufty *et al.* 2007; Samantaray *et al.* 2013).

Por otro lado, a nivel muscular se ha observado la implicación de calpaína en numerosas distrofias/atrofias musculares. Por ejemplo, existe una desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} , que lleva a una sobreactivación de las calpaínas en la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Esta enfermedad muscular se relaciona con un defecto en el gen que codifica la distrofina (una proteína citoplasmática que es clave dentro del complejo proteico que conecta el citoesqueleto de una fibra muscular con la matriz extracelular) (Briguet *et al.* 2008). En este sentido se ha observado, que la sobreexpresión de calpastatina, el inhibidor fisiológico de las calpaínas, reduce la sintomatología de la distrofia en un modelo de ratones con DMD (Spencer *et al.* 2002). En otro tipo de distrofia muscular, llamada distrofia muscular de cintura o pélvica (LGMD2A) existe una mutación genética de la capn3 (p94) que afectan a las proteínas estructurales del músculo (Kramerova *et al.* 2004; Garnham *et al.* 2009).

Dicho desorden neuromuscular está caracterizado por atrofia simétrica progresiva y debilidad de las extremidades proximales (Chae *et al.* 2001). Han sido identificadas más de 200 mutaciones diferentes para el gen que codifica la Capn3, conduciendo la mayoría de éstas a la pérdida de la actividad proteolítica. Dado que la expresión de la calpaína 3 se limita al músculo esquelético, no se han encontrado consecuencias patológicas a nivel del músculo cardíaco (Fanin *et al.* 2003). Las afecciones musculares generadas por defectos en la regulación de las calpaínas, se las agrupa con la denominación común de “calpainopatías” (Kramerova *et al.* 2007; Rajakumar *et al.* 2013).

Las alteraciones en la actividad calpaína también se las ha relacionado con otro tipo de patologías. Entre ellas, la formación de cataratas se asocia a una elevación de los niveles de Ca^{2+} , con la consiguiente sobreactivación proteolítica de CAPN2. Dicha falta de regulación de la CAPN2 es la causa principal del aumento de la escisión de las β -cristalinas, las cuales escindidas pierden su solubilidad, precipitan y generan la opacidad de esta estructura ocular (Nakamura *et al.* 2000).

Una de las calpaínas, que últimamente ha despertado más interés y por lo tanto ha sido más estudiada, por su posible implicación en la diabetes de tipo 2, es la calpaína 10 (Song *et al.* 2004; Buraczynska *et al.* 2013). Dicha proteasa también se la ha relacionado con enfermedades cardiovasculares (Smith *et al.* 2012), obesidad y niveles elevados de colesterol en sangre (Mendoza-Lorenzo *et al.* 2013).

Además recientemente, se ha observado que la actividad calpaína se encuentra elevada en la mayoría de cánceres (cáncer de mama, renal, leucemias, meningiomas, etc); y que esta se correlaciona directamente con la migración celular o invasividad (Roumes *et al.* 2010; Storr *et al.* 2011). Centrándonos en los tumores mamarios, se ha observado que la expresión de calpastatina y de CAPN1, están significativamente asociadas con diversos criterios clinicopatológicos incluyendo el grado del tumor y la expresión del receptor de estrógenos (ER) (Storr *et al.* 2012). Además, se detectó que una elevada expresión de CAPN2 en tumores basales o triple negativos en humanos, se asoció con una disminución de la supervivencia específica. Otro estudio realizado en líneas de carcinoma de mama de ratón, en la que estas se inyectaban en el tejido mamario (*xenografts*), determinó que el silenciamiento de la

CAPN2 se correlacionaba con una reducción en la tasa de proliferación y migración *in vitro*, junto con un menor crecimiento tumoral. Mediante análisis bioquímicos se observó que la CAPN2 ejercía dicha acción a través de la vía PI3K-Akt-FoxO-p27 (Ho *et al.* 2012).

En otros tipos de cáncer, la calpaína también se ha visto implicada en los mecanismos moleculares que definen la patogenia y las características de un tumor. Así por ejemplo, se ha descrito que la calpaína media la migración y la invasión celular y con esto la formación de metástasis, especialmente en los casos de cánceres de pulmón, de próstata e hígado (Leloup *et al.* 2011; Chen *et al.* 2013). Por otro lado, también se ha visto que participa en los efectos angiogénicos del *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), mediante la regulación de la estructura de los filamentos de actina (Su *et al.* 2006). El uso de inhibidores específicos de calpaína como la calpeptina u otro tipo de inhibidores sintéticos, sería una manera eficaz de impedir el desarrollo de un tumor, mediante el bloqueo de la transformación y la proliferación de las células, así como la vascularización del tumor (Li *et al.* 2013).

Tabla 2: Condiciones patológicas ligadas a defectos en el sistema calpaína. (Huang *et al.* 2001; Bertipaglia *et al.* 2008).

| CALPAÍNA | ENFERMEDAD | MECANISMO |
|---|--|---|
| Enfermedades genéticas | | |
| Capn3a | Distrofia muscular de cintura (LGMD2A) | Disrupción del gen que codifica capn3a |
| Capn9 | Cáncer gástrico | Disminución de la expresión de <i>Capn9</i> |
| Capn10 | Diabetes Mellitus tipo 2 | Mutación del intrón 3 del gen de <i>Capn10</i> |
| Alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ | | |
| Capn1/2 | Distrofias Musculares (DMD) | La pérdida de la distrofina, lleva a la desregulación de la homeostasis de Ca ²⁺ , y esta, a la sobreactivación de calpaínas. |
| Capn1/2 | Isquemia neuronal | La sobreactivación de los receptores de NMDA, lleva a la elevación de los niveles de Ca ²⁺ , la calpaínas contribuyen a la necrosis y apoptosis del área afectada. |
| Capn1/2 | Cánceres | El desequilibrio en el sistema calpaína origina una mayor capacidad de migración celular e invasión (glándula mamaria, colón, hígado, próstata, etc). |

| | | |
|--------------|-------------------------|--|
| Capn2 | Enfermedad de Alzheimer | La sobreexpresión de CAPN2 desemboca en la "hiperfosforilación de tau" que forma los ovillos neurofibrilares en las neuronas. |
| Capn2 | Cataratas | La elevación de los niveles de Ca^{2+} , con la consiguiente sobreactivación proteolítica de CAPN2, produce acumulación de α y β -cristalinas (agregados opacos). |

3.6. DIANAS SUBCELULARES DE LAS CALPAÍNAS.

Como ya se ha comentado, una de las características que modulan en gran medida la actividad calpaína es la unión a membranas (Dargelos *et al.* 2008). De ahí que, existan numerosos estudios que investiguen el papel de las calpaínas a nivel de las membranas de diferentes orgánulos: lisosomas, mitocondrias y núcleos (Bever *et al.* 2008).

3.6.1. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA MITOCONDRIA

Las calpaínas son fundamentalmente enzimas citosólicas, sin embargo, se ha observado actividad calpaína en diferentes orgánulos celulares, entre ellos las mitocondrias, detectándose CAPN1 y CAPN2 en la matriz mitocondrial y en el espacio intermembrana de mitocondrias de hígado de rata (Hood *et al.* 2004; Ozaki *et al.* 2007). En la mayoría de casos, la sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} induce la activación de las calpaínas y conduce a una disfunción mitocondrial, a través de la escisión de diversas proteínas (Bid, Bax AIF, etc), proceso asociado clásicamente con la muerte celular programada (García *et al.* 2005).

Un reciente estudio demostró una clara asociación entre la CAPN1 y las mitocondrias (Kar *et al.* 2010). En él se demostraba que, tanto la subunidad catalítica como la reguladora, están presentes en el espacio intermembrana mitocondrial. Los resultados prueban además, que la subunidad catalítica de la CAPN1 contiene una secuencia de direccionamiento mitocondrial en el extremo aminoterminal, gracias a la cual, la proteasa es importada a la mitocondria (Badugu *et al.* 2008). Por otro lado, en mitocondrias de rata se detectó CAPN2, y además se vio que esta escindía el canal aniónico regulado por voltaje (VDAC) de forma Ca^{2+} dependiente. Esta escisión de VDAC promovía la acumulación mitocondrial de Bax y la liberación de AIF

truncado (tAIF) de las mitocondrias, a través de poros mitocondriales formados por VDAC-Bax (Ozaki *et al.* 2009).

Otros estudios han obtenido conclusiones similares. En el sistema nervioso, se ha descrito que la activación de las calpaínas provoca la degradación de Bax, Bid y de p53 induciendo de esta manera la liberación mitocondrial del citocromo c (Raynaud *et al.* 2006). Por otro lado, a nivel del sistema cardiovascular el uso de inhibidores de la calpaína ha demostrado preservar la función mitocondrial en el tejido cardíaco después de una lesión isquémica (Neuhof *et al.* 2003; Trumbeckaite *et al.* 2003).

3.6.2. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL LISOSOMA

Los lisosomas, son orgánulos que contienen más de 50 tipos de hidrolasas capaces de procesar gran cantidad de macromoléculas celulares, para su posterior reutilización (Luzio *et al.* 2007). Entre las hidrolasas lisosomales mejor estudiadas y caracterizadas, tenemos la familia de las catepsinas, que ya se han explicado en apartados anteriores.

La liberación del contenido lisosomal al citoplasma, es decir, la salida de catepsinas y otras enzimas digestivas al citosol debido a la permeabilización de la membrana lisosomal (PML), puede desencadenar diversas vías de muerte celular, tanto necróticas como apoptóticas (Gocheva *et al.* 2006). Una vez en el citosol, las catepsinas pueden iniciar la vía intrínseca de apoptosis a través de la escisión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Cirman *et al.* 2004). Es importante destacar que las catepsinas citosólicas también son capaces de desencadenar una muerte celular independiente de caspasas (Leist *et al.* 2001, Kreuzaler *et al.* 2011). Por lo tanto, el mantenimiento de la integridad de la membrana lisosomal es de suma importancia para la supervivencia celular (Kroemer *et al.* 2005).

Las vías de señalización que pueden conducir a una permeabilización de la membrana lisosomal dependen del tipo celular, pero se han llegado a identificar como agentes permeabilizadores: el TNF, los radicales libres, la esfingosina, el

hierro, las fosfolipasas, las calpaínas y la catepsina B (Fehrenbacher *et al.* 2008). Por ejemplo, en el sistema nervioso central, las calpaínas son las responsables de la PML. En dicho sistema, se ha descrito que la activación de las calpaínas lleva a la degradación de la proteína Hsp70, necesaria para la estabilización de la membrana lisosomal. Dicha escisión induce la permeabilización de esta membrana, la liberación de las catepsinas B, D y L y como consecuencia se promueve la apoptosis (Bröker *et al.* 2005; Yamashima *et al.* 2009). Este proceso de liberación de catepsinas por calpaínas, fue descrito por primera vez por Yamashima en 1998, y se conoce con el nombre de “hipótesis calpaína-catepsina”. Se basa en la idea de que las calpaínas activas, median la desestabilización de la membrana lisosomal, a través de la degradación de proteínas ubicadas en dicha membrana, induciendo la difusión de catepsinas al citoplasma y núcleo, y por tanto, conduciendo a la muerte celular programada (Yamashima *et al.* 1998).

3.6.3. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL NÚCLEO

A nivel nuclear, la calpaína puede actuar a través de dos mecanismos diferentes. Por un lado, puede actuar escindiendo proteínas ubicadas en el citosol que, tras su procesamiento, se traslocan al núcleo donde ejercerán su función (Bever *et al.* 2008). Entre este tipo de sustratos encontramos: p53, *Glycogen synthase Kinase 3* (GSK-3), β -catenina, *cyclin-dependent kinase 5* (CDK5), etc. En este sentido, por ejemplo, la β -catenina es proteolizada por calpaínas en neuronas expuestas a glutamato, y dicha escisión induce su translocación al núcleo para activar la transcripción de genes (Abe y Takeichi, 2007).

El otro mecanismo por el que la calpaína podría ejercer su función en el núcleo es debido a su translocación directa al compartimento nuclear (Bano *et al.* 2010). Se ha publicado que en diferentes tipos celulares, la elevación transitoria de Ca^{2+} intracelular, somete a las calpaínas a una relocalización subcelular específica desde el citosol al núcleo, donde pueden degradar directamente factores de transcripción y proteínas nucleares (Neuberger *et al.* 1997; Watt *et al.* 1993). Entre este tipo de sustratos nucleares, se encuentran *poly (ADP-ribose) polymerase-1* (PARP) (Pellicciari *et al.* 2004), topoisomerasa I (Chou SM *et al.* 2011), *Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase type IV* (Tremper- Wells *et al.* 2005). Un ejemplo de este mecanismo lo

constituye la pérdida de la permeabilidad nuclear producida por las calpaínas en un modelo de excitotoxicidad neuronal, donde estas se translocan al núcleo y escinden proteínas del poro nuclear, como Nup153 o Nup62, alterando el transporte nuclear y facilitando la apoptosis en este tipo de células (Bano *et al.* 2010)

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La actividad de NF- κ B aumenta durante el embarazo, cae en la lactancia y se incrementa de nuevo en la involución del tejido mamario (Clarkson y Watson, 1999). En un modelo experimental de sobreexpresión constitutiva de IKK2, y por tanto, de sobreactivación de NF- κ B durante la involución, se observa una disminución de la producción de los componentes lácteos y una activación temprana de caspasa-3 (Connelly *et al.* 2010). Gracias a experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se demostró que la activación y consiguiente translocación nuclear de NF- κ B durante la involución inducía la expresión de NOS-2, hecho que explicaba el incremento de óxido nítrico observado con la retirada de las crías (Zaragozá *et al.* 2005). Dicho trabajo enfatiza la interconexión entre dos vías de gran importancia durante la involución: la vía del NO y del NF- κ B. Siguiendo en esta línea, un trabajo posterior de nuestro grupo consiguió identificar y demostrar que a lo largo de la involución, NF- κ B no solo regulaba la expresión de NOS-2, sino también la expresión de numerosos genes (268 dianas génicas) implicados en diversas funciones fisiológicas, como la señalización celular y la apoptosis; situando a este factor de transcripción como nodo de regulación central de numerosas vías (Torres *et al.* 2011). Entre todas las dianas génicas identificadas de NF- κ B a las 48 horas de destete, como *Foxo 3*, *Trp73* y *Csl* entre otras, se seleccionaron para su posterior estudio las calpaínas: *Capn1* y *Capn2*, dos proteasas cuya actividad viene modulada por los niveles de calcio intracelular.

Por otro lado, una de las primeras consecuencias del destete es la acumulación de leche en la glándula mamaria, conduciendo a su vez a una acumulación de calcio intracelular (Reinhardt *et al.* 2004). De ahí que, entre todos los genes modulados por NF- κ B a las 48 horas de destete, se decidiera continuar con el estudio de las calpaínas, al ser éstas calcio-dependientes. En efecto, cuando se determinaron los niveles de actividad total de estas proteasas, se observó un incremento progresivo conforme avanza la involución. En vista de esto, decidimos plantearnos los objetivos principales del presente proyecto de tesis, los cuales pretenden elucidar el papel de la activación de las calpaínas en la remodelación tisular de la glándula mamaria tras el ciclo embarazo/lactancia. Para ello, se realizó un estudio pormenorizado de cada

uno de los orgánulos celulares implicados en la muerte celular programada: mitocondrias, lisosomas y núcleo. Entre los objetivos propuestos, se encuentran:

1. ELUCIDAR EL PAPEL Y LA IMPLICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA DE LAS CÉLULAS EPITELIALES SECRETORAS.

Como ya se ha comentado anteriormente, las calpaínas participan en numerosas funciones, entre ellas la muerte celular programada. Cuando las calpaínas están inactivas se localizan en el citoplasma unidas a la calpastatina, su inhibidor fisiológico. En ocasiones se ha visto que cuando se activan, se translocan a membranas, degradando proteínas típicas de este compartimento subcelular como canales iónicos, transportadores o receptores de membrana, etc (Goll *et al.* 2003; Dargelos *et al.* 2008; Ozaki *et al.* 2009). La hipótesis sería que en nuestro modelo de involución de la glándula mamaria, las calpaínas una vez activadas por la acumulación de Ca^{2+} , actuarían favoreciendo la muerte celular programada. En cada uno de los orgánulos se van a identificar dianas susceptibles al procesamiento por calpaínas, y las consecuencias biológicas de dicha proteólisis.

1.1. ESTUDIAR EL PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA MITOCONDRIA.

Aunque las calpaínas se consideran enzimas citosólicas, diferentes estudios han demostrado su presencia en la membrana mitocondrial (García *et al.* 2005), donde podrían ejercer determinadas funciones. Entre ellas, se ha demostrado que pueden favorecer la vía intrínseca de apoptosis (Sharma *et al.* 2004), no solo degradando transportadores sino también a través de la proteólisis/activación de determinadas proteínas del citosol, como Bax, Bid y p53 (Raynaud *et al.* 2006). Dichas proteínas una vez activadas se translocarían a la membrana mitocondrial, formando poros, liberando a través de éstos citocromo c y AIF, favoreciendo con ello la apoptosis (Cao *et al.* 2007). En este objetivo, se indagará en el papel de las calpaínas a nivel mitocondrial en relación con la muerte celular programada inducida por los estímulos de destete, y su relación con la liberación de citocromo c.

1.2. ESTUDIAR EL PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL LISOSOMA.

Puesto que nuestro grupo ya describió un incremento de la activación de las catepsinas a lo largo de la involución (Zaragozá *et al.* 2009), parece ser que los lisosomas podrían jugar un papel importante en la muerte celular programada de las células epiteliales. En efecto, recientemente se ha descrito que la muerte celular del epitelio mamario presenta características propias de una apoptosis atípica, en la que existe una permeabilización lisosomal a las pocas horas de destete (Kreuzaler *et al.* 2011). Por tanto, uno de los objetivos va a ser descubrir si las calpaínas podrían actuar como mediadoras de esta desestabilización lisosomal. Por otro lado, también se van a identificar dianas lisosomales susceptibles al procesamiento por calpaínas, que pueden estar implicadas en la desestabilización de la membrana de este orgánulo.

1.3. ESTUDIAR EL PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL NÚCLEO.

Aunque se han estudiado en gran medida las mitocondrias, la membrana plasmática o el retículo endoplásmico durante la cascada de muerte celular, poco se sabe acerca de las alteraciones estructurales de la membrana nuclear y de los complejos de los poros nucleares. En este sentido, se ha descrito en un modelo de excitotoxicidad neuronal que las calpaínas son capaces de traslocarse al núcleo y escindir proteínas del poro nuclear, con el fin de facilitar la apoptosis de estas células (Bano *et al.* 2010). Partiendo de la evidencia de que las calpaínas se encuentran activas durante la involución, éstas también podrían translocarse a la membrana nuclear, facilitando la pérdida de la selectividad del transporte nuclear, y con ello la muerte celular de las células epiteliales secretoras.

El hecho de que las calpaínas puedan actuar sobre factores de transcripción como CEBP α o PARP, como se ha demostrado en diversos modelos *in vitro* (Patel *et al.* 1999; Kaur *et al.* 2011), nos hace pensar que estas podrían actuar en otro sentido diferente al apoptótico, en otros tipos celulares. De ahí que, indagar en el estudio de las calpaínas en este orgánulo podría generar gran interés, al verse implicados factores de transcripción o proteínas nucleares, que podrían jugar un papel fundamental a nivel de regulación de la transcripción.

2. REMODELACIÓN TISULAR.

Simultánea a la muerte celular del componente epitelial de la glándula mamaria, la involución también se caracteriza por una remodelación de la matriz extracelular y del estroma, junto con una repoblación del tejido por los adipocitos. Esta remodelación acontece fundamentalmente durante la fase irreversible de la involución, la cual comienza aproximadamente a las 48 horas de destete (Lund *et al.* 1996). Teniendo en cuenta que esta fase se caracteriza por una actividad significativa de diferentes proteasas, como metaloproteasas o catepsinas, este segundo objetivo se va a centrar en elucidar si las calpaínas, al igual que las proteasas anteriores, presentan algún tipo de implicación en la diferenciación y/o proliferación de los adipocitos en el contexto del destete mamario.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES Y EXTRACCIÓN DE LOS TEJIDOS.

En el presente trabajo se emplearon ratones hembra de la cepa C57BL/6 de Taconic, “wild type” (WT), estabulados hasta un máximo de 6 animales por jaula en el animalario de la Facultad de Medicina. Las condiciones del recinto se mantuvieron en todo momento controladas a una temperatura ambiental de 20-22°C y unos periodos alternativos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno (08:00 - 20:00). Estos animales fueron alimentados *ad libitum* con dieta sólida de laboratorio proporcionada por Harlan, y libre acceso al agua hasta el momento en que fueron sacrificados. Todos los experimentos fueron realizados entre las 10:00 y las 15:00 horas para minimizar las posibles variaciones cíclicas diurnas. Se han utilizado al menos, de tres a cinco animales por condición experimental.

Los animales fueron tratados siguiendo estrictamente la Directiva 2010/63/UE, y posteriormente el Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión de Investigación Experimental Ética de la Universidad de Valencia.

El modelo experimental se basa en un destete artificial. El periodo fisiológico de lactancia del ratón (*M. Musculus*) es de 21 días. Si se interrumpe la lactancia en su punto central (9-11 d), bien por causas naturales o artificiales, como en nuestro caso un destete forzado; se obtienen cambios más drásticos y la sincronización de los procesos de muerte celular. De este modo, los ratones se cruzaron y tras el nacimiento de las crías, los animales se dividieron en los siguientes grupos:

a) Ratones lactantes control: tienen entre 7-10 crías y se encuentran en el pico de la lactancia (9-11 días después del alumbramiento).

b) Ratones lactantes sometidas a distintas condiciones de destete: Formado por ratones de las mismas características que las del grupo control, a las que se les

somete a destetes forzados mediante la retirada de las crías. Las crías fueron retiradas a las 6, 24, 48 y 72 horas antes de realizar los experimentos. Para los experimentos realizados con extractos de adipocitos mamarios también se retiraron las crías 5 días antes (figura 15).

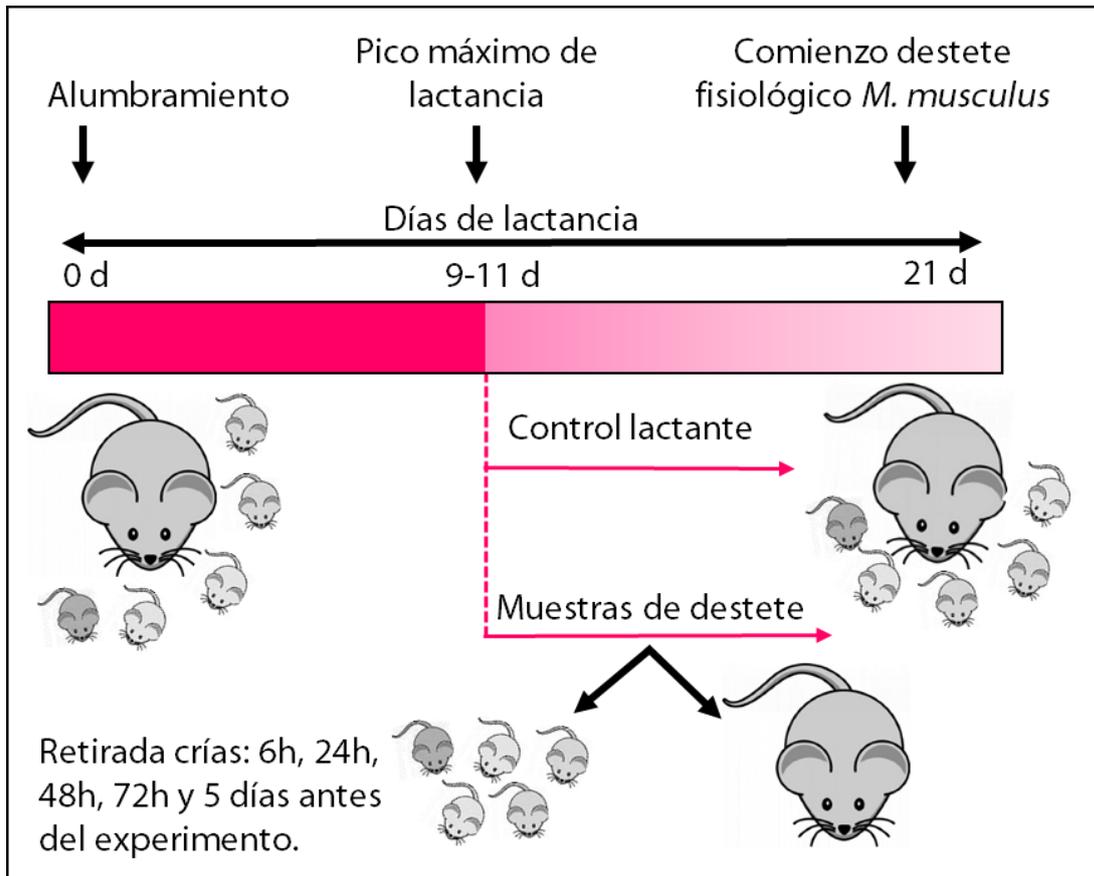


Figura 15: Representación del modelo experimental empleado.

Para la obtención de muestras tisulares, los animales fueron anestesiados con tiopental sódico mediante inyección intraperitoneal ($60 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ de peso corporal, en 0.9% NaCl). Después, las glándulas mamarias inguinales se extrajeron rápidamente, se lavaron con suero fisiológico, fueron secadas sobre papel de filtro e inmediatamente congeladas por la técnica del *freeze-clamped* (Quistorff *et al.* 1980). Los órganos ya congelados, se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior procesamiento, excepto en el caso de muestras necesarias para estudios histológicos o muestras de tejido fresco necesarias para otros experimentos (ver más adelante).

2. ANTICUERPOS UTILIZADOS.

Los anticuerpos utilizados a lo largo de este proyecto de tesis vienen descritos en la tabla 3. Se indica dependiendo de la aplicación, la concentración óptima de uso, así como la referencia y la casa comercial.

Tabla 3: Listado de anticuerpos usados, especificando la técnica en la que preferentemente han sido utilizados a la concentración optimizada. WB: Western blot. IP: Inmunoprecipitación, IF: Inmunofluorescencia.

| ANTICUERPO | APLICACIÓN | DILUCIÓN | REFERENCIA |
|------------------------|------------|----------|----------------------|
| Capn1 -COOH | WB | 1/4000 | Abcam, ab39170 |
| Capn1 -COOH | IP | 1/300 | Abcam, ab39171 |
| Capn1 -COOH | IF | 1/300 | Abcam, ab39170 |
| Capn2-COOH | WB | 1/1000 | Biovision, 3372 |
| Capn2- COOH | IF | 1/50 | Cell signaling, 2539 |
| Capn1 -NH ₂ | WB | 1/1000 | Abcam, ab28257 |
| Capn1 -NH ₂ | IF | 1/100 | Abcam, ab28257 |
| Capn2-NH ₂ | WB | 1/1000 | Abcam, ab39165 |
| AIF | WB | 1/1000 | Abcam, ab1998 |
| ATP6V1B2 (VATB2) | WB | 1/1000 | Abcam, ab73404 |
| Lamp2a | WB | 1/1000 | Pierce Ab., PA1-655 |
| Citocromo c | WB | 1/1000 | Santa Cruz, sc-7159 |
| TGN 38 | WB | 1/1000 | Santa Cruz ,sc-33784 |
| α -Tubulin | WB | 1/1000 | Santa Cruz, sc-5286 |
| GADPH | WB | 1/5000 | Abcam, ab8245 |
| Calnexin | WB | 1/1000 | Abcam, ab22595 |
| CcOx IV | WB | 1/1000 | Abcam, ab33985 |
| CcOx IV | IF | 1/200 | Abcam, ab33985 |
| LAMP2 | WB | 1/1000 | Abcam, ab13524 |
| LAMP2 | IF | 1/200 | Abcam, ab13524 |
| Nup153 | WB | 1/200 | Abcam, ab93310 |

| | | | |
|-----------------------------------|----|---------|------------------------|
| Nup107 | WB | 1/1000 | Abcam, ab73290 |
| Nup98 | WB | 1/1000 | Abnova, Mab6758 |
| Mab414 | WB | 1/5000 | Covance, MMS-120 R |
| Mab414 | IF | 1/400 | Covance, MMS-120 R |
| Mab414 | IP | 1/1000 | Covance, MMS-120 R |
| Histone H3 -NH₂ | WB | 1/5000 | Active Motif, 39763 |
| Histone H3 -NH₂ | IF | 1/5000 | Active Motif, 39763 |
| cleaved caspase-3 | WB | 1/1000 | Cell Signalling (9661) |
| cleaved caspase-3 | IF | 1/400 | Cell Signalling (9661) |
| Histone H3 -COOH | WB | 1/40000 | Millipore, 07-690 |
| Perilipin | WB | 1/1000 | Progen Bio., 651156 |
| Perilipin | IF | 1/400 | Progen Bio., 651156 |
| Histone H3K4me3 | WB | 1/1000 | Millipore 07-473 |
| Histone H3K4me3 | IF | 1/150 | Abcam, ab12209 |
| Histone H3K27me3 | WB | 1/1000 | Abcam, ab6002 |
| Histone H3K27me3 | IF | 1/ 200 | Abcam, ab6002 |
| Aldolasa | WB | 1/1000 | Abcam, ab71433 |

3. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.

Los tejidos de glándula mamaria lactante control y a diferentes tiempos de destete (6, 24, 48 y 72 h) se fijaron con paraformaldehído al 4%, y posteriormente se incluyeron en bloques de parafina. A continuación se realizaron cortes de 5µm de grosor, y se colocaron en un portaobjetos, con el fin de realizar bien tinciones con hematoxilina-eosina, así como inmunofluorescencias.

3.1. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA.

Dichas secciones ya cortadas en el portaobjeto, se desparafinaron en xileno, se rehidrataron a través de un gradiente descendente de alcoholes (100, 90, 70, 50 y 30% de EtOH), y se lavaron con agua para eliminar el exceso de alcohol. A

continuación se tiñe con hematoxilina (10 min) y se lava en agua y alcohol ácido (EtOH con 1% HCl). Después se sumergen las secciones 30 segundos en eosina. En este paso se revierte el protocolo, de tal forma que se deshidrata de nuevo la muestra con un gradiente creciente de alcoholes (70°, 95° y 100°), y se incuba 10 minutos en xileno antes de realizar el montaje final. Las imágenes se tomaron con la cámara Leica DMD 108.

3.2. ANÁLISIS DE INMUNOFLUORESCENCIA.

En este caso, las secciones también se desparafinaron y se rehidrataron a través de un gradiente descendente de alcoholes, pero en este caso el lavado final se realizó con PBS (Sigma). La exposición de los antígenos, se llevó a cabo hirviendo las muestras durante 10 min con una solución de citrato sódico 10 mM pH 6.0. Posteriormente, los cortes se bloquearon con una solución de suero de cabra, al 5% (Dako, Denmark) durante 1h a temperatura ambiente y se dejaron incubando durante toda la noche con los anticuerpos primarios especificados en la tabla 3, diluidos en PBS y 0.3% Triton-X100. Los secundarios Alexa Fluor 488 anti-ratón IgG, Cy3 anti-rata IgG (ambos de Invitrogen) y Cy3 anti-ratón IgG (Sigma Aldrich) diluidos 1:400 en una solución de PBS y 0.3% Tritón X-100, se usaron para la detección de los primarios. Las uniones no específicas del anticuerpo, se minimizaron incubando las muestras solo con anticuerpos secundarios (control negativo). Los núcleos siempre se han teñido con Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido 1:1000 en agua destilada. Las imágenes fueron visualizadas y adquiridas mediante el microscopio confocal Leica TCS-SP 2 ubicado en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM) de la Universidad de Valencia.

4. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP assay) permite identificar la unión de una determinada proteína o factor de transcripción al DNA. Partiendo de la glándula mamaria recién extraída, se añadió formaldehído (1%) diluido en PBS durante 9 min para establecer enlaces carbamida, entre el DNA y cualquier proteína que esté unida a él. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo glicina a una concentración final de 0.125 M. Los tejidos se

homogenizan con un homogenizador de tipo *Dounce* mediante una solución de lisis celular compuesta por 85 mM KCl, 0.5% Nonidet P40, 5 mM HEPES, pH 8.0 junto con inhibidores de proteasas (Sigma). Los lisados celulares se centrifugaron a 3500 g durante 30 min, y el precipitado nuclear así obtenido, se resuspendió en el tampón de lisis nuclear 10 mM EDTA, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1.

La cromatina se fragmentó mediante sonicación de 16 pulsos de 10 seg con una amplitud del 38% con descansos de 50 seg, en un sonicador *Vibra-Cell VCX500*, obteniéndose fragmentos de cromatina en torno a un tamaño aproximado de ~500 pb (pares de bases). Los extractos nucleares una vez sonicados, fueron centrifugados a 14000 g durante 10 min; y se continuó con los sobrenadantes, que contenían fragmentos de cromatina solubles. La concentración de la cromatina, se determinó diluyendo 1:200 (v/v) en 1 % de SDS. La medición se realizó a 260 nm en cubetas de cuarzo utilizando el espectrofotómetro UV-160. Como paso intermedio antes de seguir con el protocolo, se comprobó que los fragmentos de cromatina tuvieran un tamaño adecuado, mediante electroforesis en agarosa. Para esto, una alícuota de la cromatina sonicada y cuantificada, se purificó mediante el kit comercial *PCR purification kit QIAquick® DNA* (QIAGEN, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los sobrenadantes, que contenían la cromatina soluble (700-200 pb), se diluyeron en tampón de dilución 165 mM NaCl, 0.01 % SDS, 1.1 % Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.0 a una concentración final de 4.5 U/ml. 2 ml de la cromatina diluida, se prelavaron con *beads* de sefarosa A/G previamente bloqueadas, durante 4 h a 4°C en rotación. Las *beads* se bloquearon usando λ DNA (50 μ g/ml), tRNA (500 μ g/ml), y BSA (10 mg/ml). Aproximadamente un 10% de cantidad de muestra se guardó como *Input* o control positivo. Tras centrifugar las muestras, se tomaron alícuotas (4.5 U de cromatina /condición) de los sobrenadantes y se incubaron con 3 μ g de anticuerpo específico frente a capn1 (-COOH) de Abcam (ab39171) durante toda la noche a 4°C en rotación (Inmunoprecipitado, IP). Otra alícuota de este sobrenadante, se trató del mismo modo, pero añadiendo un anticuerpo no relacionado (IgG), también llamado *unrelated* (UR).

Al día siguiente, IP y UR se incubaron con *beads* previamente bloqueadas, y los inmunocomplejos se lavaron mediante la utilización de tampones de baja salinidad (150 mM NaCl, 0.5% Deoxicolato Sódico, 0.1 % SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl), alta salinidad (500 mM NaCl, 0.5% Deoxicolato Sódico, 0.1 % SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl), LiCl (250mM LiCl, 0.5% Deoxicolato Sódico, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA y 50mM Tris-HCl) y finalmente con tampón de elución, TE (0.25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl) (Zaragozá *et al.* 2005; Torres *et al.* 2010).

Los inmunocomplejos unidos aún a las *beads*, se separaron de estas mediante 30 seg de agitación vigorosa con 95 µl de una solución de elución (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) proceso que se repitió durante dos veces. La cromatina unida al anticuerpo, precipitada y arrastrada por las proteínas A/G de las *beads*, se eluyó; y el DNA fue purificado con el kit *QIAquick DNA*. Para determinar si nuestra proteína o factor de transcripción, se unía a una determinada región del genoma, se realizó una PCR (semicuantitativa y/o a tiempo-real) con cebadores diseñados para amplificar la región a estudiar: promotora o codificante (figura 16).

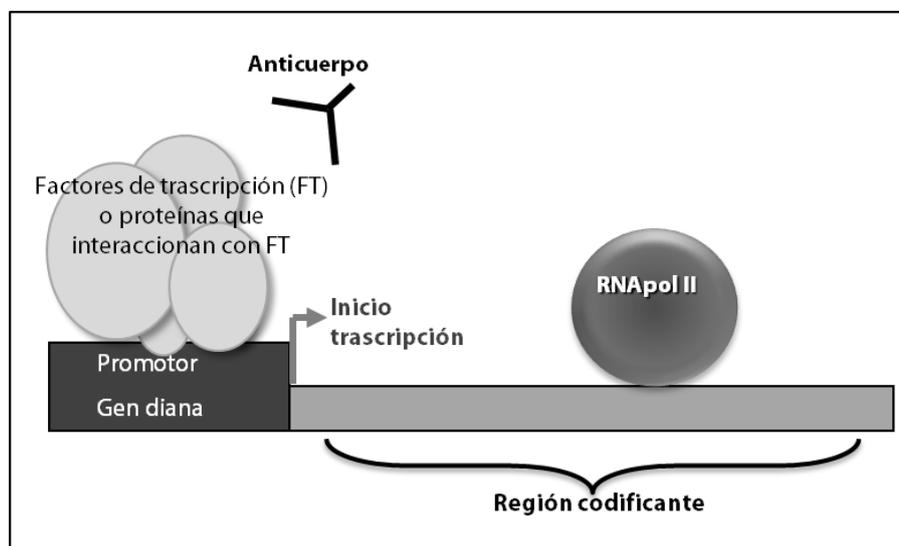


Figura 16: Esquema de los factores implicados en el inicio de la transcripción y que se utilizan para la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

4.1. ANÁLISIS POR PCR SEMICUANTITATIVA.

Se analizaron por PCR semicuantitativa los inmunoprecipitados resultantes del ChIP, realizado contra capn1. Tanto el input, el IP como el UR se analizaron por PCR con las siguientes condiciones de amplificación: 1 min a 93°C, 40 ciclos de 1,5 min, seguido de 4 min a 72°C. Cada uno de los 40 ciclos estaba comprendido por incubaciones a 93°C, seguido de una incubación a la temperatura específica para cada amplicón (ver tabla 4) y a 72°C, durante intervalos de 30 seg. Se utilizaron los pares de cebadores apropiados, para amplificar productos en torno 300 pares de bases de longitud, correspondientes al promotor de los genes que se indican (tabla 4).

Tabla 4: Cebadores sintetizados en los promotores de los genes utilizados para las PCR semicuantitativa. S.: Tamaño del amplicón. T.: temperatura de hibridación (°C). Pos.: Posición de hibridación con respecto al inicio de la transcripción.

| Gene | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') | S. | T | Pos. |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|-----|----|------|
| C/EBPα | TGACTTAGAGGCTTAAAGGA | CGGGGACCGCTTTTATAGAG | 283 | 58 | -315 |
| Leptina | GCCTTCTGTAGCCTCTTGCT | GCTCCATGCCCTGCCTGC | 301 | 62 | -323 |
| MBP | TTGTGTCCAAAGAAGCAGCG | AGAGGTCTAAATGGCATCGC | 239 | 60 | -372 |

Los fragmentos de PCR fueron separados por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con tampón TAE (40 mM Tris- HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA), teñidos con *Red Safe* (iNtRON biotechnology), y analizados con un sistema electrónico transiluminador de luz ultravioleta UVIDoc (UVITEC Limited).

4.2. ANÁLISIS POR PCR CUANTITATIVA.

Para llevar a cabo la cuantificación de los inmunoprecipitados usando la técnica de PCR a tiempo real, se utilizó el kit comercial *FAST SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados para la inmunoprecipitación contra capn1 se expresaron como el incremento relativo respecto al *Input* (control positivo) para los promotores (tabla 4) de los genes *CEBP α* y de la *Leptina*, utilizando la fórmula: $2^{(Ct\ Input - Ct\ IP)}$.

5. AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE RNA.

Para el aislamiento del mRNA total a partir de glándula mamaria de ratón lactante o a partir de extractos de adipocitos, se utilizó un reactivo comercial TRIzol® (Invitrogen), seguido de una purificación en columna (*RNeasy*, Qiagen). La cuantificación del RNA, se llevó a cabo mediante medida espectrofotométrica a 260nm usando el NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies). Teniendo en cuenta, que uno de los pasos críticos para el éxito de los análisis de RT-qPCR es la calidad del RNA, se midieron dos parámetros básicos referidos a esta propiedad: la integridad y la pureza. Para determinar la pureza, se analizó el valor del cociente 260/280 nm y 260/230 nm, de forma que valores comprendidos entre 1.8-2.0 y 2.0-2.2 para el primer y el segundo cociente respectivamente, indican que se obtuvo un RNA de buena calidad. La contaminación de la muestras con impurezas orgánicas e inorgánicas (p.ej. fenol, cloroformo), y proteínas afecta de forma significativa la sensibilidad y especificidad del resultado. Aunque la medida de la pureza nos da una indicación de la cantidad de RNA y del grado de contaminación, no nos informa sobre el nivel de degradación de RNA. Por tanto, para comprobar la integridad y por tanto el nivel de degradación, se observaron la calidad de las bandas del RNA ribosómico 28S y 18S, mediante una electroforesis de agarosa convencional.

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE mRNA POR RT-qPCR.

El análisis mediante RT-qPCR (retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa) es la técnica de elección para cuantificar el mRNA en pequeñas cantidades e incluso en un pequeño número de células (Wang *et al.* 1999). Metodológicamente, en primer lugar se realizó la retrotranscripción (RT), partiendo de 0,5µg de RNA por muestra, extraído y cuantificado como previamente se ha descrito. En cuanto a los reactivos de la RT, utilizamos las cantidades recomendadas por el *High-capacity RNA-to-cDNA kit* (Applied Biosystems). La muestra junto con los componentes del kit, se calentó a 37°C durante 60 min y después se incubó a 95°C durante 5 min en un termociclador *Gene Amp PCR system 2700* (Applied Biosystems). La amplificación mediante qPCR del cDNA sintetizado, se realizó empleando el kit *GeneAmp Fast PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, en el sistema

7900HT *Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 50°C para conseguir un efecto “hot-start”, 95°C durante 2 min y a continuación: 95°C durante 15 seg y 60°C durante 1 min. Esto último se repite durante 40 ciclos. Se usaron cebadores específicos diseñados por Taqman (ver tabla 5).

Tabla 5: *Primers utilizados en las PCRs cuantitativas, prediseñados por la casa comercial Applied Biosystems.*

| GEN | REF. |
|---------------------------------|----------------|
| Capn1 | Mm00482964_m1 |
| Capn2 | Mm00486669_m1 |
| Capn4 | Mm00501558_m1 |
| PMCA2 | Mm00447640_m1 |
| TGF-β | Mm01178820_m1 |
| Tenascin | Mm00495662_m1 |
| C/EBPα | Mm00514283_s1 |
| Leptin | Mm 00434759_m1 |
| Ipo8 | Mm01255158_m1 |
| 18S | 4319413E |

Obtenido el Ct (*Threshold cycle* o ciclo umbral) se calculó el nivel de expresión relativa para cada uno de los genes a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

donde $\Delta Ct = Ct \text{ (diana)} - Ct \text{ (housekeeping)}$, y $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ (destete)} - \Delta Ct \text{ (control lactante)}$.

El gen cuya expresión no cambia a lo largo de nuestras condiciones experimentales (*housekeeping*) fue el 18S ribosomal (18S), sin embargo, para los extractos de adipocitos, el *housekeeping* utilizado fue la importina 8 (*IPO8*), apropiada para tejidos adiposos que sufren proliferación o diferenciación de los adipocitos (Hurtado del Pozo *et al.* 2010).

7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y WESTERN BLOT.

La extracción de proteínas totales se realizó a partir de tejido congelado o fresco de glándula mamaria, según disponibilidad y tipo de experimentos. Para esto, 0.2 – 0.3 g de tejido correspondiente a los controles o destetes, se homogenizaron utilizando el homogenizador Ultra-Turrax® basis (IKA®-Werke GmbH & Co.), con tampón RIPA (1.8 mM NaH₂PO₄, 8.4 mM Na₂HPO₄, SDS 0.1 % (p/v), Tritón-X100 1.0 % (v/v), 0.1 M NaCl, Deoxicolato sódico 0.5% (p/v)) suplementado, con 1mM PMSF, 2µL/mL de inhibidores de proteasas y 5µL/mL de inhibidores de fosfatasa (Calbiochem) a 4°C. No se utilizaron inhibidores de proteasas en aquellos experimentos en los que se determinó actividad calpaína, ni tampoco en los experimentos en los que se incubaron las muestras con calpaína recombinante. Tras la homogenización, las muestras se incubaron a 4°C durante 30 min, sometiénolas a 3 ciclos de vórtex cada 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a máxima velocidad (14000 g) durante 30 min a 4°C. La fracción sobrenadante, que contiene el extracto proteico, se recogió y se congeló a -80°C hasta el momento de su uso.

Las muestras de proteínas, se cuantificaron mediante el reactivo comercial BCA (*Bicinchoninic acid*; Pierce Chemical Co), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el caso de los extractos nucleares y cromatínicos las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bio-Rad).

Una cantidad adecuada de proteínas (entre 10 y 25 µg) de cada muestra, se diluyeron con un tampón de carga (SDS-Laemmli Buffer: 50% glicerol v/v, 10% SDS, 25% β-mercaptoetanol y 0.05% azul de bromofenol en tampón 0.3 M Tris-HCl pH 6.8) y se calentaron 5 min a 100°C. Se prepararon geles de acrilamida a diferentes porcentajes, según el peso molecular de la proteína que se quiso determinar, para proceder a su separación por tamaño y carga. La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) se realizó según el método descrito por Laemmli (Laemmli *et al.* 1970); se usaron geles verticales de 1 mm de espesor y 15 µL de capacidad por pocillo. Los geles se sumergieron en tampón de electroforesis (0.25 M pH 8.6 Tris-HCl; 1.92 M glicina, 1 % SDS (p/v)) y se les aplicó una diferencia de potencial de 120 V.

Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Protran®, Whatman), en tampón de transferencia (0.25 M pH 8.6 Tris- HCl, 1.92 M glicina y 20% metanol (v/v)) durante 90 min, aplicando una diferencia de potencial de 60 V. Posteriormente, dicha membrana se bloqueó con PBS conteniendo BSA al 5% y 0.05% Tween 20 durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se añadieron sobre la membrana bloqueada, incubándose durante 18-24h a 4°C. Dichos anticuerpos vienen descritos en la tabla 3, con la correspondiente dilución y la referencia de la casa comercial. Después, la membrana de nitrocelulosa se lavó 5 veces con TTBS (0.05 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl y 0.1% Tween 20). Los inmunocomplejos formados se revelan usando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a una dilución 1/5000 (DAKO) durante 50 min y un reactivo quimioluminiscente (ECL Detection Kit, GE Healthcare, Suecia). La señal luminosa es impresionada sobre una película fotográfica (Amersham Hyperfilm MP), la cual se revela con la máquina Curix60 (AGFA). En numerosas ocasiones, se procede a la cuantificación de las bandas midiendo su intensidad a través de su digitalización y cuantificación por densitometría utilizando el software de análisis de imagen Image J.

8. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR:

8.1. FRACCIONES MITOCONDRIALES.

Para el aislamiento de las mitocondrias, se utilizó un protocolo basado en centrifugaciones diferenciales, como previamente había sido descrito (Borrás *et al.* 2010). Brevemente, las glándulas mamarias se trocearon en fragmentos de 2-3 mm², para ser homogenizadas con un homogenizador de vidrio tipo “Dounce” y centrifugadas a 1000 g durante 10 min, eliminándose membranas y restos celulares no solubilizados. Los sobrenadantes son después centrifugados a 10000g durante 10 min y el pellet mitocondrial se solubiliza en un tampón que contiene 0.3 M sacarosa, 1 mM EGTA, 5 mM MOPS, 14.7 µM BSA y 5 mM KH₂PO₄ pH 7.4 y guardados a -80°C para su posterior uso.

8.2. EXTRACTOS LISOSOMALES.

Para el aislamiento de lisosomas, se usó el kit comercial "*Lysosome Enrichment Kit for Tissue and Cultured Cells*" (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. A modo de resumen, las glándula mamarias inguinales se trocearon y homogenizaron con un homogenizador de vidrio tipo "Dounce" y se centrifugaron a 500 g durante 10 min para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se colocó en la parte superior de un gradiente discontinuo de iodixanol (17-30%) y se centrifugó a 145000 g en la Optima-XL Ultracentrifuge (Beckman) durante 2h sin freno. La fracción lisosomal se obtuvo mediante pipeteo de la parte superior del gradiente, para ser lavada con PBS. Después de 3 lavados, los lisosomas se resuspendieron en un tampón de solubilización (20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 250 mM sacarosa, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1mM EGTA y 8 mM DTT) al que añadimos en el momento de usar, inhibidores de proteasas y fosfatasa; a excepción de las muestras que van a ser utilizadas para medir actividad o para experimentos *in vitro* con calpaína recombinante.

8.3. FRACCIONES NUCLEARES Y CITOSÓLICAS.

Para el aislamiento de núcleos, se usó el kit comercial, "*Nuclear extract kit*" siguiendo las instrucciones del fabricante (Active Motif, Carlsbad). De forma descriptiva, las glándulas mamarias inguinales fueron troceadas en pequeños fragmentos de 2-3 mm² y homogenizadas en un homogenizador de vidrio tipo "Dounce" con tampón hipotónico. Después, se centrifugaron a 850 g durante 10 min para recoger las células intactas. A continuación, estas células fueron lisadas mediante incubación en tampón hipotónico suplementado con detergentes, durante 15 min en hielo. Después de esta incubación, los núcleos se recogieron por centrifugación (10 min, 14000 g a 4°C) y el sobrenadante se recuperó como fracción citosólica. El precipitado, formado fundamentalmente por núcleos intactos, se lisó utilizando un tampón de solubilización nuclear, en una plataforma oscilante durante 30 min con agitación suave. Las fracciones solubles (extractos nucleares) e insoluble (enriquecida en proteínas cromatínicas) se separaron por centrifugación (10 min, 14000 g a 4°C).

8.4. EXTRACTOS CROMATÍNICOS.

Partiendo de los precipitados anteriores, constituidos fundamentalmente por la fracción nuclear insoluble y por tanto enriquecida en cromatina, se consiguieron extractos ricos en proteínas cromatínicas, siguiendo un protocolo descrito en la literatura (Wysocka *et al.* 2001). Dichos precipitados nucleares, se lavaron dos veces con una solución tampón que contenía 3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 1 mM DTT y el cóctel inhibidor de proteasas (2 μ l/ml de tampón). Finalmente, el precipitado se resuspendió en este mismo tampón y se sometió a sonicación, con una amplitud del 26% se realizaron 8 pulsos de 10 seg descansando 50 seg. Estos sonicados se centrifugaron a 14000 g durante 10 min y el sobrenadante se guardó como extracto cromatínico.

9. INMUNOPRECIPITACIONES

Partiendo de extractos de proteínas nucleares (300 μ g) de glándulas mamarias de ratones lactantes o sometidos a un destete de 48h, se realizaron inmunoprecipitaciones, con el fin de comprobar interacción entre dos proteínas.

Las muestras fueron sometidas a *preclearing* con 30 μ l proteína A/G unidas a beads 50: 50 (v/v) durante 1h a 4°C. Los sobrenadantes, se inmunoprecipitaron durante la noche con la dilución de anticuerpo especificada en la tabla 3, o la misma cantidad de IgG *anti-rabbit* o *anti-mouse* (control negativo) para cada anticuerpo correspondiente, en rotación a 4°C. Al día siguiente, se añadieron 50 μ l de beads con el objetivo de retener los complejos antígeno-anticuerpo (inmunocomplejos), los cuales después de centrifugar, precipitan al fondo. Los sobrenadantes se descartaron, y cada sedimento (las beads junto con los inmunocomplejos) se lavó con PBS y Tris-HCl 0.05 M pH 8, para retirar las impurezas y las uniones no específicas. Después de los lavados, los inmunocomplejos se hirvieron en tampón de carga para separar las proteínas A/G y los anticuerpos de las proteínas inmunoprecipitadas. Luego se sometieron a western blot, como se ha descrito anteriormente en el apartado correspondiente. Un 1% de los extractos de proteínas utilizados para la inmunoprecipitación, son cargados como controles positivos (Input).

10. ENSAYO *IN VITRO* DE CALPAÍNA.

Para confirmar la rotura observada “*in vivo*” de determinadas proteínas, realizamos experimentos “*in vitro*”, en los que la adición de concentraciones crecientes de calpaína recombinante a las muestra, produjo una degradación proporcional de sus sustratos diana. La ruptura específica de la “posible diana” por las calpaínas y no por cualquier otra proteasa, también se demostró incubando las muestras con calpaína recombinante y diversos inhibidores de calpaínas y catepsinas. Entre los inhibidores utilizados encontramos: Ca074 Me (Calbiochem), inhibidor específico de catepsinas; calpeptin (Calbiochem), inhibidor específico de calpaínas; y *calpain inhibitor* VI y ALLN (ambos de Calbiochem), inhibidores mixtos de calpaínas, catepsinas y otras proteasas. Se ha trabajado siempre con muestras de ratón control lactante, en los que no se ha iniciado la muerte celular programada, y por tanto, no se ha observado todavía la rotura de ninguna diana de las calpaínas.

10.1. ENSAYOS EN EXTRACTOS MITOCONDRIALES.

Por un lado, a nivel mitocondrial, se llevaron a cabo experimentos de análisis de la permeabilización de la membrana del orgánulo. Para ello, se aislaron extractos mitocondriales y se incubaron durante 15 min a 37°C con diferentes unidades de CAPN1 recombinante (r-CAPN1) en presencia de Ca²⁺ (0.5 mM). Después de la incubación, las muestras se centrifugaron 15 min a 10000 g a 4°C. Los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente (SB), y las mitocondrias residuales (P) solubilizadas en un tampón que contiene 0.3 M sacarosa, 1 mM EGTA, 5 mM MOPS, 14.7 µM BSA y 5 mM KH₂PO₄ pH 7.4; también se guardaron para su posterior análisis, vía western blot.

10.2. ENSAYOS EN EXTRACTOS LISOSOMALES

Para confirmar la rotura de proteínas lisosomales también se utilizaron experimentos *in vitro*. Partiendo de extractos lisosomales control de ratones lactantes, se añadieron concentraciones crecientes de r-CAPN1 (tabla 6) en presencia o ausencia de Ca²⁺ (0.5 mM) durante 15 min a 37°C en el tampón de solubilización de lisosomas, detallado con anterioridad. Después de la incubación, los lisosomas se centrifugaron a 17000 g durante 15 min a 4°C y se resuspendieron

en un potente detergente específico para solubilizar proteínas de membrana hidrofóbicas, llamado CHAPS (*3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate*), para su posterior análisis mediante western blot. El mismo procedimiento se siguió para la CAPN2 (tabla 6), pero esta vez con una concentración de Ca^{2+} superior (5 mM). Por último, para evaluar si las posibles dianas, se escindían por calpaínas o por catepsinas, se utilizaron diferentes inhibidores de estas proteasas. En este caso, los extractos de lisosoma se incubaron como se ha descrito anteriormente, pero suplementados con diferentes concentraciones de los inhibidores mencionados arriba Ca-074Me (5, 20 μM); calpeptina (15, 50 μM), inhibidor de calpaína VI (50, 95 μM) o ALLN (50, 95 μM).

Tabla 6: Lista de proteínas recombinantes usadas.

| PROTEÍNAS RECOMBINANTES | |
|-------------------------|--------------------|
| Proteína recombinante | Referencia |
| r-CAPN1 | Sigma, C 6108 |
| r-CAPN2 | Calbiochem, 208718 |
| r- Histona H3 | Millipore, 14-494 |

10.3. ENSAYOS EN FRACCIONES NUCLEARES.

Sobre los extractos nucleares se procedió del mismo modo. A excepción de que se utilizaron las fracciones nucleares de ratones control solubilizadas en el tampón de lisis nuclear proporcionado por el kit mencionado anteriormente.

Para abordar la comprobación de la proteólisis de la Histona H3 por las calpaínas, se incubaron extractos nucleares mamarios control y de 48h de destete, junto con la proteína recombinante sustrato, r-Histona H3, y se analizó por WB el resultado de dicha incubación. En este sentido, para comprobar que CAPN1 escinde directamente y sin ninguna proteasa intermediaria Histona H3, se realizaron otro tipo de experimentos *in vitro* con proteínas recombinantes. Básicamente, se añadió en un tubo tanto, r-Histona H3 (2,5 g) como r-CAPN1 (2 U) y se incubó 15 min a 37°C en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,5; para comprobar que la calpaína escindía directamente la Histona H3. A

continuación, la mezcla de incubación se cargó en un gel de electroforesis (SDS-PAGE 13,5%), y se tiñó con azul Coomassie. Mediante una hoja de bisturí, se separó la banda del gel correspondiente al fragmento de la histona H3, y se mandó a identificar a la Unidad de Proteómica y Bioinformática del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra (Pamplona, España).

Además de esta identificación por espectrometría de masas, con el fin de predecir el sitio de escisión más probable, un análisis de comparación de pesos moleculares se realizó utilizando el software ImageQuant TL Software (General Electric Healthcare) (Mandal *et al.* 2012). Para esto, se extrapola el peso molecular correspondiente a la Histona H3 intacta y fragmentada, a partir de una recta de regresión logarítmica correspondiente al patrón de pesos moleculares. Dicho análisis, se completó gracias al uso de una aplicación informática, que permite calcular los pesos moleculares de determinadas secuencias peptídicas (<http://www.encorbio.com/protocols/Prot-MW.htm>). El posible sitio de corte calculado de forma teórica en nuestro modelo, fue confirmado de forma general, mediante el uso de otra aplicación informática llamada *multiple kernel learning*, que es capaz de predecir mediante algoritmos las posibles dianas de corte de las calpaínas en sus sustratos (DuVerle *et al.* 2011).

11. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D DIGE).

Para la realización del 2D DIGE, se partieron de fracciones lisosomales de ratones control, que no presentan todavía ninguna degradación de los sustratos diana de calpaína. A las muestras tratadas se les añadió 10U de CAPN-2 recombinante (r-CAPN2) durante 1h a 37 °C en presencia de 5 mM de Ca²⁺. Las muestras control (sin tratamiento) se incubaron en las mismas condiciones, pero sin r-CAPN2. Después del tratamiento, los extractos control se marcaron con Cy-3 y los tratados con Cy-5. Para comprobar que el marcaje no presenta ninguna influencia sobre las diferentes muestras también se marcaron a la inversa. Una mezcla de ambas muestras, se marcó con Cy-2 para la normalización de los niveles proteicos. Posteriormente, las proteínas fueron sometidas a la primera dimensión, separándose en este caso, según su punto isoeléctrico gracias al uso de tiras de

gradientes de pH (pH 3-7, GE Healthcare) en un Ettan IPGphor™ 3 (GE healthcare). Dichas tiras se cargaron a continuación, en la parte superior de un gel de acrilamida (12,5% de SDS-PAGE), para separar las proteínas en este caso en función del tamaño. Los geles se tiñeron siguiendo las instrucciones del fabricante con *Sypro Ruby*. Para la cuantificación relativa de los *spots* del gel, se utilizó el software DeCyder (v7.0.). Las imágenes de los geles por separado, se emparejaron con el DeCyder utilizando la imagen marcada con Cy-2 (gel normalizado). Solo se aceptaron como diferencias cuantitativas cuando se observó al menos un cambio de 1,5 veces con respecto a la muestra control, en tres experimentos independientes. La significación estadística de las diferencias, se calculó mediante la prueba t de Student, y se aceptó cuando el valor fue de $p < 0,05$. El análisis por espectrometría de masas fue realizado por el Servicio de Proteómica y Bioinformática del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra (Pamplona), para identificar las manchas o *spots* que presentaban una degradación diferencial. Posteriormente, algunas de estas dianas fueron comprobadas de forma independiente por western blot.

12. INHIBICIÓN *IN VIVO* DE CALPAÍNA.

12.1. ADMINISTRACIÓN DE UN INHIBIDOR FARMACOLÓGICO ESPECÍFICO, CALPEPTINA.

A ratones lactantes tras 10d de destete, se les retiraron las crías y se les administró calpeptina con el fin de impedir la activación de las calpaínas durante el destete. La calpeptina (03-34-0051, Merck Chemicals) se disolvió en primer lugar en DMSO, para posteriormente diluirse en solución salina fisiológica (10mg/ml). 40 mg/kg se administraron mediante inyección intraperitoneal cada 12 horas durante tres días. Un segundo grupo de ratones control, recibió solo el vehículo. Después de tres días, se extrajeron las glándulas mamarias inguinales. La inhibición efectiva de las calpaínas se confirmó mediante western blot a partir de extractos proteicos totales obtenidos de los lisados de las glándulas.

12.2. SILENCIAMIENTO DE CAPN1 MEDIANTE SiRNA.

Ratones lactantes en el pico de lactancia, fueron sometidos a un destete forzado de 72 h mientras se les administraba RNAs de interferencia para silenciar la CAPN1 (*small interference RNA, siRNA*) de Sigma (Mission® esiRNA, EMU057001). 5 µg de *siRNA* se inyectaron cada 24 h a lo largo de 3 d, a nivel local en las glándulas mamarias inguinales, mezclados con L-PEI (in vivo-jetPEI™, PolyPlus-transfección), siguiendo las instrucciones del fabricante. El silenciamiento de calpaína-1 gracias al uso del *siRNA Capn1* se confirmó mediante inmunoblot a partir de extractos proteicos totales obtenidos de los lisados de las glándulas.

13. MEDIDA DE ACTIVIDAD CALPAÍNA.

Para determinar los niveles de actividad calpaína usando el kit comercial “*Calpain activity assay kit*” (QIA-120, Calbiochem), se utilizaron alícuotas de 50 µg de extractos lisosomales o mitocondriales para cada condición de destete. Con el fin de comprobar que la actividad proteasa medida, se correspondía con la actividad calpaína, se utilizó un inhibidor de calpaínas (BAPTA, quelante de Ca²⁺) y un sustrato fluorogénico sintético específico de calpaínas, *Suc-LLVY-AMC*. De este modo, la actividad calpaína se obtuvo a partir de la diferencia entre las muestras que llevaban una solución activadora (con Ca²⁺ y un agente reductor, TCEP), con respecto a las muestras que llevaban el inhibidor, de acuerdo a las instrucciones descritas por el fabricante.

14. MEDIDA DE ACTIVIDAD CASPASA-3

La actividad caspasa-3 se midió en lisados de tejido mamario utilizando el “*Caspase-3 Colorimetric Assay Kit*” (BioVision). Las glándulas mamarias fueron homogenizadas en tampón de lisis proporcionado por el kit, incubadas en hielo durante 10 min y centrifugadas a 10000 g durante 15 min. Los sobrenadantes de los homogenizados, correspondiente a la fracción citosólica se utilizaron para medir la actividad caspasa-3, siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, la concentración de proteínas se midió y ajustó a 200 µg de proteína por muestra,

diluyéndose en caso necesario. A este volumen, se añadió un volumen igual de “tampón de reacción 2X” (que contiene 10 mM de DTT), seguido de la adición del sustrato fluorogénico DEVD-pNA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicha mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C, antes de leer la placa con el lector de placas *Multiskan FC* (Thermo Scientific) a 405 nm.

15. DETERMINACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA OLIGONUCLEOSOMALES.

Una forma de determinar el estado de muerte celular programada (MCP) es medir el porcentaje de fragmentos oligonucleosomales que aparecen en el citosol de las células apoptóticas, como consecuencia de la activación de las nucleasas endógenas. Dichas enzimas Ca^{2+} y Mg^{2+} -dependientes, se activan durante el proceso apoptótico y digieren el DNA en regiones internucleosomales, ya que no está protegido por el octámero de histonas (Bonfoco *et al.* 1995). Por tanto, la presencia de estos fragmentos de cromatina solubles (uno o varios octámeros de histonas: mononucleosomas y oligonucleosomas, respectivamente) son indicativos de muerte celular. Mediante el uso de un kit comercial denominado “*Cell Death Detection Assay*” (Roche Diagnostics) conseguimos determinar estos complejos histona –DNA, como indicativos de la MCP.

Dicho kit se basa en el uso del principio básico de un ELISA. En este caso, unida a la base de la placa se encuentra la estreptavidina. Sobre la muestra, se añade un anticuerpo α -Histona unida a Biotina y otro anticuerpo α - DNA unido a una peroxidasa. Se incuban las muestras con estos dos anticuerpos, y al añadirlo a la placa, la estreptavidina se une a biotina y retiene los complejos formados por los anticuerpos (anti-DNA e anti-Histona) y los oligonucleosomas (ver figura 17). Después de varios lavados, se añadió un sustrato colorimétrico de la peroxidasa, ABTS (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*), que se cuantificó espectrofotométricamente a 405nm. A mayor cantidad de complejos solubles histona-DNA, mayor cantidad de anticuerpos quedarán fijados, y por tanto mayor absorbancia.

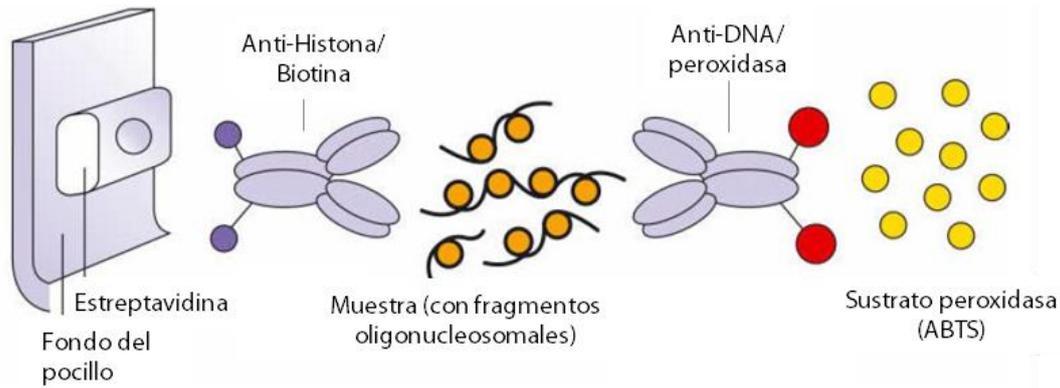


Figura 17: Mecanismo de detección de fragmentos mono- y oligonucleosomales con el kit “Cell Death Detection Assay”.

El enriquecimiento específico (factor de enriquecimiento) en mono- y oligonucleosomas solubles en el citosol de las células en MCP, se calculó como la relación entre los valores de absorbancia de las muestras obtenidas a 72h de destete (sin tratar y tratadas) con respecto a los controles lactantes (10 d de lactancia).

16. SEPARACIÓN DE ADIPOCITOS DE GLÁNDULA MAMARIA: AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS Y mRNA.

Con el objetivo de obtener la fracción de adipocitos se utilizó una versión modificada de un protocolo existente (Rodbell *et al.* 1964). La glándula mamaria se cortó en trozos pequeños (3-4 mm²) y se colocó en tubos de plástico estériles con tampón Krebs-Ringer (25 mM de NaHCO₃, 11 mM de glucosa, 25 mM HEPES (pH 7,4) y 1,5 mg/ml colagenasa A). La relación entre el tejido mamario y la solución de incubación fue de 1:4 (p/v). La suspensión de tejido se incubó a 37 °C con agitación suave durante 60 min. Una vez que se completó la digestión, las muestras se pasaron por una malla de nylon estéril de 250 µm. El filtrado se centrifugó a 200 g durante 10 min, y las células flotantes se consideraron la fracción enriquecida en adipocitos, mientras que la fase inferior estaba constituida por el resto de células (células estromales, vasculares, epiteliales, etc). Los adipocitos se lavaron dos veces con el tampón mencionado anteriormente y se centrifugaron 200 g durante 10 min. Después del lavado, la fracción de adipocitos se sometió a sonicación (8 pulsos de 10 seg descansando 50 seg al 26% de amplitud) y se añadió tampón SDS-Laemmli

para realizar los inmunoblots usando anticuerpos descritos en la tabla 3. Para obtener mRNA a partir de extractos de adipocitos, se utilizó el kit comercial Qiagen (74804, Quiagen).

17. ANALISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados presentados en las gráficas corresponden a la media aritmética de los valores obtenidos en cada experimento \pm el error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas entre el grupo control y otros grupos se realizaron mediante ANOVA, con el programa estadístico SPSS v9. Las diferentes letras usadas indican diferencias significativas, $p < 0,05$; donde la letra "a" representa siempre el valor más bajo dentro del grupo. Todos los experimentos fueron llevados a cabo como mínimo, en tres réplicas por condición, para permitir la comparación estadística.

En los experimentos en los que solo había dos parámetros a comparar (figuras 31B, 40A, 45B y 54B), se utilizó la prueba t-Student con la corrección de Bonferroni. Aquellos grupos de datos en los que sí que existían diferencias significativas se han indicado mediante asteriscos (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

RESULTADOS

RESULTADOS

1.1. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA MITOCONDRIA.

La mayoría de señalización intracelular implicada en la apoptosis converge en las mitocondrias. Una de las primeras alteraciones morfológicas que suceden durante la muerte celular programada es la alteración mitocondrial, que tiene lugar incluso antes de los cambios característicos que ocurren a nivel nuclear. Entre los cambios que puede experimentar la mitocondria durante el proceso apoptótico encontramos la permeabilización de su membrana, la cual favorece la salida del citocromo c al citoplasma y otras proteínas proapoptóticas como Smac/ DIABLO, AIF, etc. Una vez en el citosol, el citocromo c, junto con APAF-1 y en presencia de ATP, forma un complejo denominado apoptosoma, que activa la procaspasa-9 y desencadena la activación del resto de caspasas efectoras (Ghayur *et al.* 1997). De ahí que, la permeabilización de la membrana mitocondrial sea un proceso fundamental en el estudio de la muerte celular.

Dicha permeabilización, la mayoría de las veces, está mediada por la formación de poros transmembrana producidos por agregación de proteínas efectoras del grupo II de la familia de bcl-2 con carácter proapoptótico como bak, bax, bad, bid, bim, etc (García *et al.* 2005); aunque también se han visto implicadas otras proteínas, como por ejemplo el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) (McCommis *et al.* 2012). Sin embargo, en extractos mitocondriales aislados, la permeabilización mitocondrial puede estar inducida por gran variedad de estímulos químicos e iones como: Ca^{2+} , radicales libres de oxígeno, el ácido araquidónico, el óxido nítrico, etc. En este mismo sentido, se ha descrito que las calpaínas pueden influir en gran medida en el daño mitocondrial (Kar *et al.* 2010; Mizukoshi *et al.* 2010).

Dado que al inicio de la involución se induce la liberación del citocromo c al citosol (Renz *et al.* 2001), nos propusimos determinar si las calpaínas podrían estar involucradas en la pérdida de la estabilidad mitocondrial. Para ello se aislaron extractos mitocondriales puros, y se determinaron los niveles de proteínas y la

actividad calpaína. Por western blot (WB), se analizaron los niveles de calpaínas en extractos mitocondriales, citosólicos y totales de glándulas mamarias lactantes. En la **figura 18A**, se observa como CAPN1 está presente no solo en el citosol, sino también en mitocondrias. Por el contrario, CAPN2 solo aparece en fracciones citosólicas, por lo que parece que es la CAPN1 la que podría tener una acción específica sobre la mitocondria. Para comprobar la pureza del fraccionamiento subcelular, se emplearon distintas proteínas como marcadores, tanto mitocondriales (AIF) como de otros orgánulos: LAMP2a (lisosomas), Calnexina (retículo endoplásmico), Nup62 (núcleo), TGN38 (Golgi) y GADPH (citosol). Además, en dicha fracción, enriquecida en proteínas mitocondriales, se midió la actividad calpaína (**figura 18B**), observándose un patrón de activación similar al obtenido en los extractos totales (Arnandis *et al.* 2012), es decir, un incremento a medida que transcurre el destete, siendo significativo a partir de las 48-72h de destete.

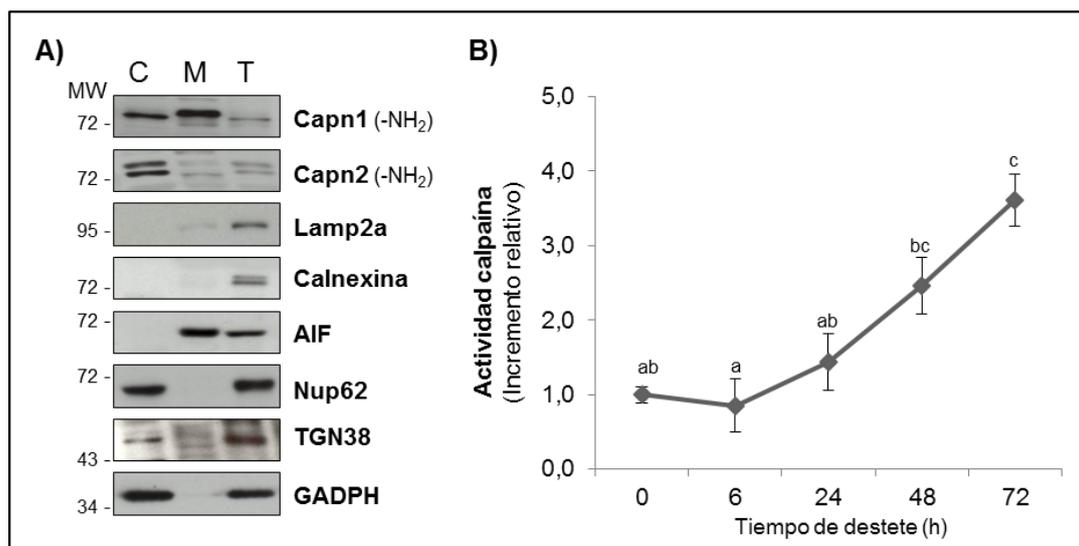


Figura 18: Niveles de actividad calpaína en fracciones mitocondriales. A) Western blots de extractos mitocondriales (M), citosólicos (C) y totales (T) de ratones lactantes con anticuerpos contra CAPN1 y CAPN2 y los siguientes marcadores: LAMP2a (lisosomas), Calnexin (retículo endoplásmico), AIF (mitocondria), Nup 62 (núcleos), TGN38 (aparato de Golgi) y GADPH (citosol). **B)** Medida de actividad calpaína en los extractos mitocondriales de ratones control lactantes (0h) y a diferentes tiempos de destete (6, 24, 48, 72h). Las diferentes letras indican diferencias significativas tras el análisis ANOVA de los datos, $p < 0.05$; la letra “a” siempre indica el menor valor dentro del grupo.

Aunque, no se detectó CAPN2 en los extractos mitocondriales de los ratones control lactantes (**figura 18A**), debe considerarse que a lo largo del destete podría translocarse a la mitocondria, y por tanto, ser responsable junto con CAPN1 de la liberación del citocromo c observada a las pocas horas del inicio del destete (Renz *et al.* 2001). Para comprobar este hecho, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencias de tejidos control y destete de 48h, usando anticuerpos contra CAPN1, CAPN2 y Citocromo c Oxidasa IV (CcOx IV), que se utilizó como un marcador mitocondrial (**figura 19**). La colocalización de CAPN1 junto con CcOx IV tanto en control como durante el destete, confirman la presencia de esta proteasa en la mitocondria (puntas de flecha) (**figura 19A**). Sin embargo, no se detectó colocalización de CAPN2 y CcOx IV, ni en el control durante la lactancia, ni en ratones tras el destete (**figura 19B**). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, podemos decir que CAPN2 no presenta un papel en la desestabilización mitocondrial durante la MCP de las células epiteliales secretoras.

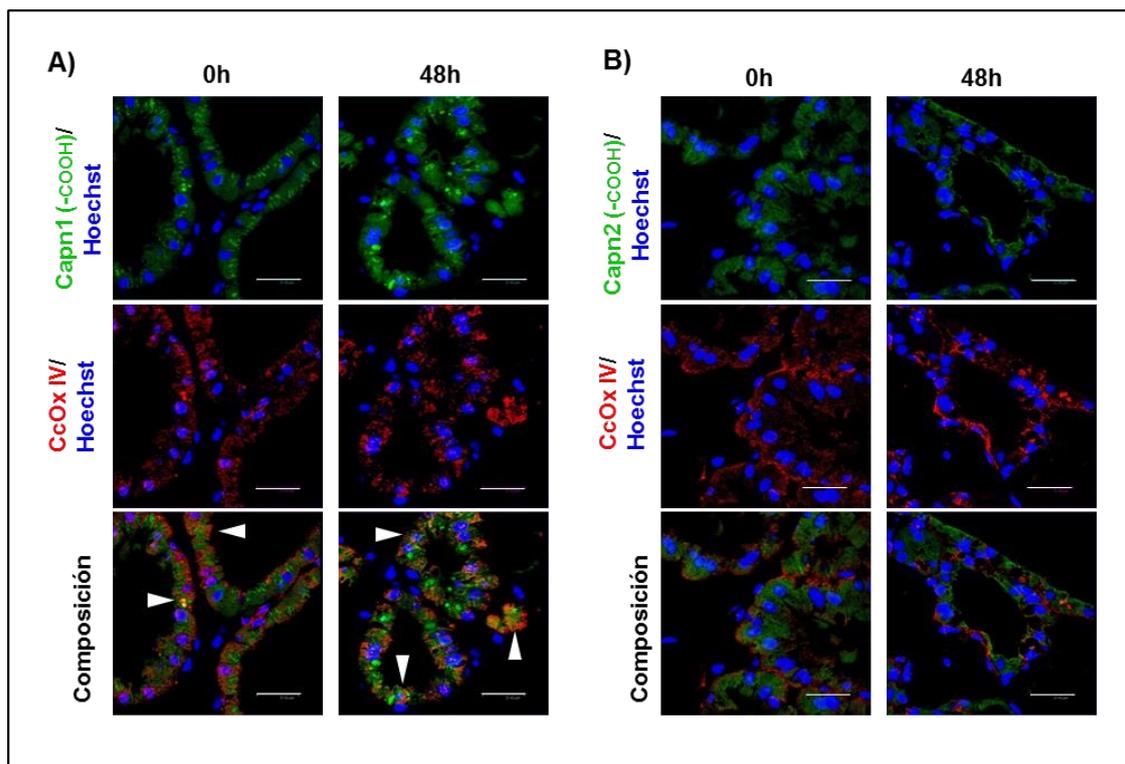


Figura 19: Localización de calpaínas junto con CcOx IV, como marcador mitocondrial, en secciones de glándula mamaria de ratones control (0h) y destete (48h). Inmunofluorescencias contra CAPN1 (A) y CAPN2 (B), junto con un marcador de mitocondrias CcOx IV. Las puntas de flecha muestran zonas amarillas de colocalización.

A continuación, se realizó mediante WB un análisis a diferentes tiempos de destete y se comprobó que CAPN1 estaba presente en fracciones mitocondriales, tanto en ratones control (0h) como en destetados (**figura 20**). A su vez, junto con el aumento de actividad proteasa ya determinada (**figura 18B**), existe una pérdida del dominio amino-terminal de CAPN1, proteólisis que se produce tras la activación. Conforme se sucede esta activación, se induce una liberación del citocromo c al citosol, indicativo de la progresiva pérdida de la integridad mitocondrial (**figura 20**). Todos estos resultados apoyan la idea de que CAPN1 es el actor principal de la desestabilización mitocondrial.

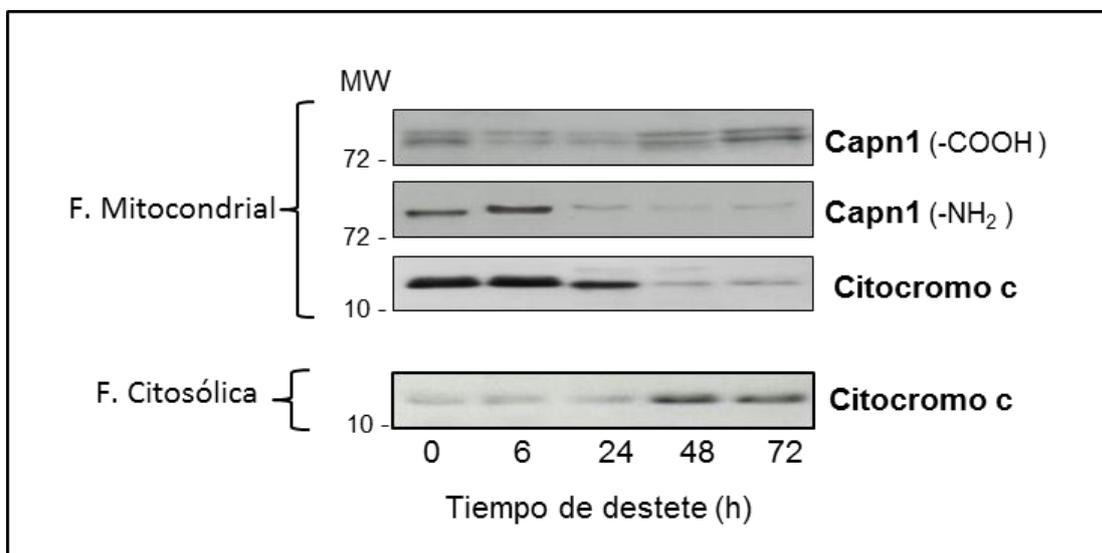


Figura 20: *Translocación de CAPN1 al compartimento mitocondrial y liberación de citocromo c, tanto en extractos citosólicos como mitocondriales. Immunoblots correspondientes a fracciones mitocondriales y citosólicas a diferentes tiempos de destete. Por un lado, en los extractos mitocondriales se observa una translocación de CAPN1 a la mitocondria, concomitante a la pérdida del extremo amino de la misma (activación). El incremento de citocromo c en la fracción citosólica, coincide a su vez con la disminución de esta misma proteína de la fracción mitocondrial y con la translocación y activación de CAPN1.*

Con el objetivo de aclarar el papel que juega CAPN1 en la vía apoptótica mitocondrial, se llevaron a cabo experimentos *in vitro*, cuyo diseño viene esquematizado en la **figura 21**. Para esto, se incubaron extractos mitocondriales de

ratones lactantes, cuyas mitocondrias se suponen intactas por no haberse iniciado el proceso de MCP, junto con r-CAPN1 y Ca^{2+} . Mediante centrifugación de las mitocondrias incubadas, se separó el contenido mitocondrial liberado (sobrenadante) de las mitocondrias remanentes (precipitado). En la **figura 21** se muestra que la adición de r-CAPN1 desencadena la liberación del citocromo c de la mitocondria, de forma concentración-dependiente. Es importante también señalar, que la incubación de mitocondrias aisladas simplemente con Ca^{2+} , ya induce una ligera liberación de citocromo c, probablemente debido a la presencia, como se ha demostrado en ratones lactantes, de CAPN1 en estos orgánulos. Dichos experimentos, demuestran la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial mediada por CAPN1.

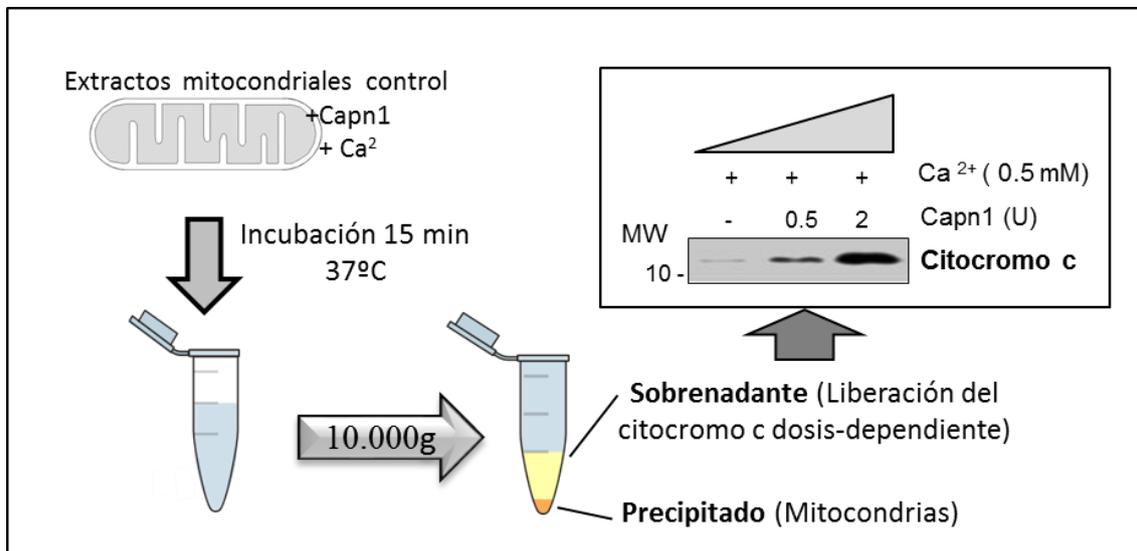


Figura 21: Liberación concentración-dependiente de citocromo c mediada por adición de calpaína. Esquema representativo del experimento llevado a cabo con extractos mitocondriales de ratones control. Se muestra también el WB correspondiente a los sobrenadantes obtenidos al centrifugar las mitocondrias tratadas con r-CAPN1 y Ca^{2+} . Dicho tratamiento induce una liberación concentración-dependiente de citocromo c al sobrenadante.

1.2. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL LISOSOMA.

1.2.1. LA ACTIVIDAD CALPAÍNA SE INCREMENTA EN LOS LISOSOMAS.

Recientemente, se ha visto que el sistema calpaína presenta un papel importante en la regulación de la muerte celular, no solo a través de la vía mitocondrial, sino también en la ruta lisosomal (Kosenko *et al.* 2011). A lo largo de la involución de la glándula mamaria, se han observado rasgos de una apoptosis atípica, en tanto y cuanto, las células apoptóticas presentan dos núcleos hipercondensados, hinchazón y ausencia de formación de vesículas. Kreuzaler *et al.* identificaron que los rasgos de este tipo especial de apoptosis son debidos a la liberación del contenido lisosomal por la permeabilización de la membrana de dicho orgánulo (Kreuzaler *et al.* 2011). Sin embargo, no hallaron el agente causante de esta desestabilización de la membrana lisosomal.

Con el objetivo de demostrar que las calpaínas pueden actuar como responsables de la permeabilización de la membrana lisosomal durante el destete, se aislaron fracciones enriquecidas en lisosomas partiendo de glándulas mamarias tanto de ratones control, como destetados. La pureza de la fracción lisosomal se evaluó mediante WB, utilizando anticuerpos contra marcadores de diferentes orgánulos: AIF (mitocondrias), Calnexina (retículo endoplásmico), Nup62 (núcleo), TGN38 (Golgi) y GADPH (citosol) (**figura 22A**). Tanto la presencia de LAMP2a como marcador lisosomal, como la ausencia de marcadores de otros orgánulos, demuestran el enriquecimiento de la fracción.

Para demostrar que las calpaínas se traslocan a la fracción lisosomal a lo largo del destete, se utilizaron muestras enriquecidas en lisosomas tanto de ratones lactantes control como de diferentes tiempos de destete (**figura 22B**). Por un lado, para CAPN1 la translocación comienza a ser significativa a las 72h de destete, mientras que para CAPN2, la significación empieza a observarse a las 24h. La actividad calpaína medida en los extractos de lisosomas, aumentó hasta 2 veces a las 24h de involución, permaneciendo elevada desde entonces (**figura 22C**).

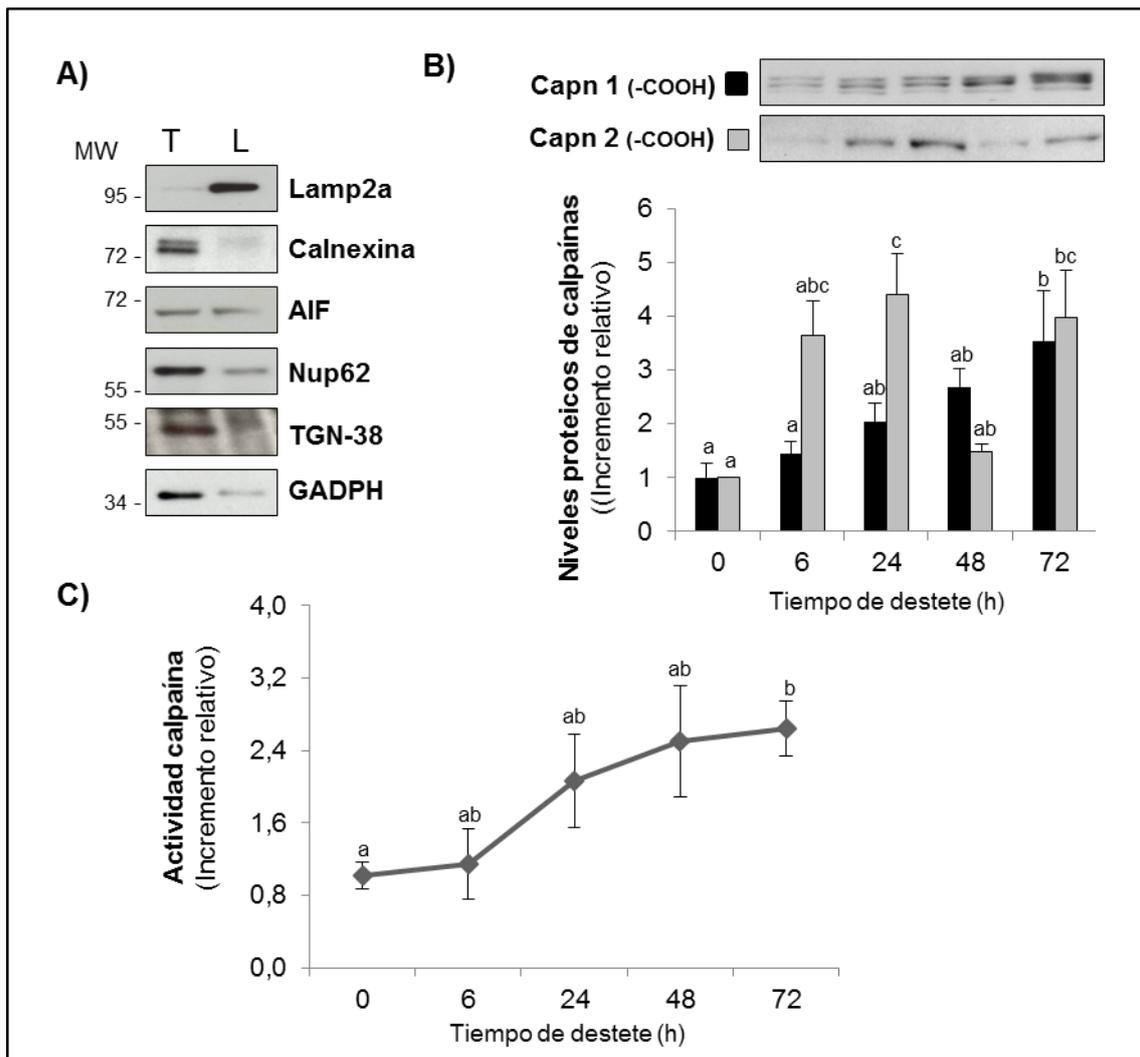


Figura 22: Presencia y niveles de actividad calpaína en extractos lisosomales.

A) Western blots de extractos mamarios totales (T) y lisosomales (L), de ratones lactantes contra LAMP2a (Lisomas), Calnexin (Retículo endoplásmico), AIF (mitocondria), Nup62 (Núcleos), TGN38 (Aparato de Golgi) y GADPH (citosol). **B)** Immunoblots correspondientes a fracciones enriquecidas en lisosomas. El resultado, representativo de un mínimo de tres experimentos, fue cuantificado por densitometría usando el Image J. **C)** Medida de actividad calpaína en extractos lisosomales de ratones control lactantes (0h) y a diferentes tiempos de destete (6, 24, 48, 72h). Las diferentes letras indican diferencias significativas tras el análisis ANOVA de los datos, $p < 0.05$; la letra “a” siempre indica el menor valor dentro del grupo.

Los anteriores resultados quedaron confirmados mediante inmunofluorescencias. Para ello, se utilizaron muestras de tejido de ratones lactantes

control o de 24h de destete. Tal como se presenta en la **figura 23**, las dos calpaínas colocalizan con LAMP2 en muestras de destete y no lo hacen en tejido control, lo que indica que tras su activación, ambas calpaínas se trasladan a los lisosomas para actuar sobre sustratos específicos.

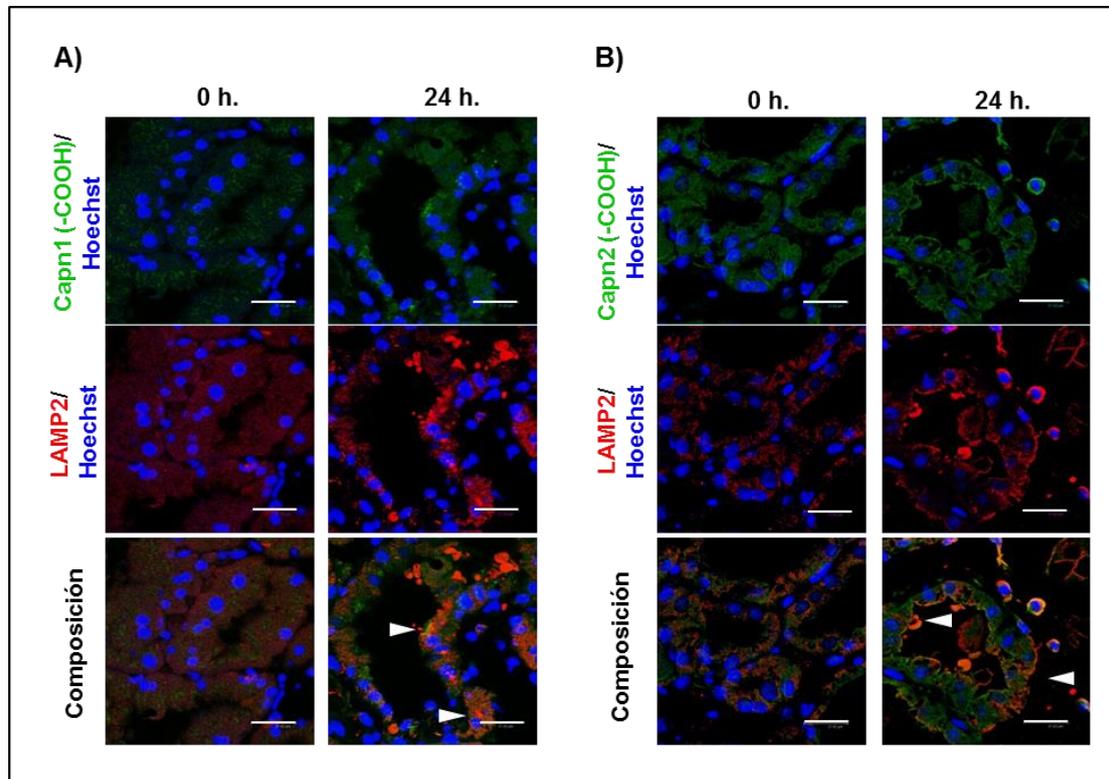


Figura 23: Localización de calpaínas junto con LAMP2, como marcador de lisosomas, en secciones de glándula mamaria control (0h) y de 24h de destete. Inmunofluorescencias contra CAPN1 (A) y CAPN2 (B), junto con un marcador de lisosomas LAMP2. En ratones sometidos a un destete de 24 h se observa colocalización de CAPN1 y CAPN2 (puntas de flecha) con LAMP2, mientras que ninguna de las dos proteasas colocaliza con el marcador lisosomal en ratones lactantes control (0h).

La proteína LAMP2 (*Lysosome Associated Membrane Protein 2*), que ha venido siendo utilizada como marcador de fracción lisosomal, fue uno de los primeros sustratos en ser identificados como diana lisosomal de las calpaínas. LAMP2 es una proteína específica de la membrana lisosomal altamente glicosilada cuya función aún permanece por especificar. Se ha propuesto que podría proteger a la membrana lisosomal del ataque de las propias proteasas lisosomales, además de actuar como

receptor para la degradación selectiva de proteínas citosólicas (Cuervo *et al.* 2000). Se conocen tres isoformas de LAMP2 (a, b y c), que difieren en la composición aminoacídica de la cola citosólica de la proteína. A pesar de que los niveles totales de mRNA y de proteína total de LAMP2 aumentan durante la involución (Kreuzaler *et al.* 2011 y **figura 24**), cuando se utiliza un anticuerpo contra la cola citosólica, que reconoce la isoforma LAMP2a, se detecta una disminución de la misma (**figura 24**). Dicha parte de LAMP2a es la que queda accesible a las calpaínas, y por tanto, la que puede ser degradada por las mismas.

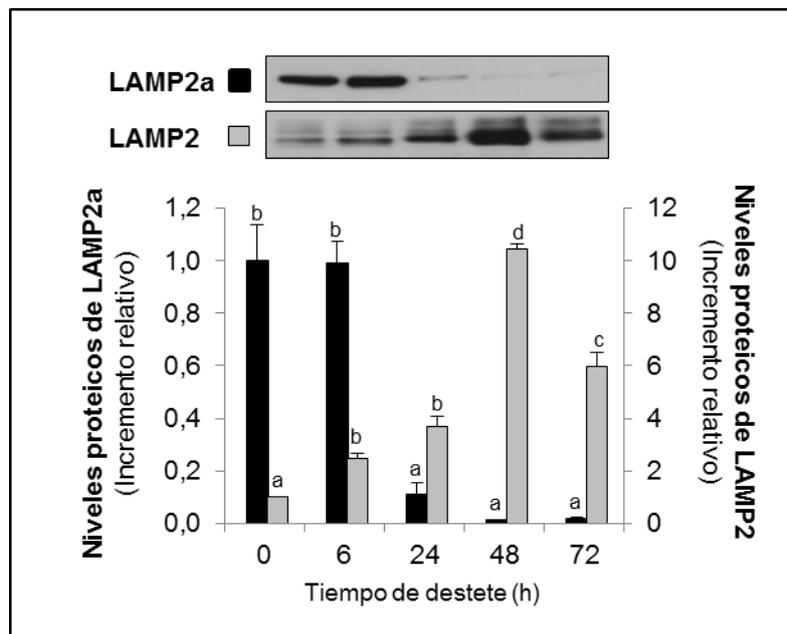


Figura 24: Degradación de LAMP2a a medida que avanza la involución. Immunoblots correspondientes a fracciones enriquecidas en lisosomas. Por un lado, la degradación de LAMP2a, una de las isoformas de LAMP2 comienza a ser significativa a las 24 h de destete. Utilizando el anticuerpo que reconoce el dominio transmembrana (a su vez reconoce todas las isoformas) se observa un aumento general de la expresión de la proteína a medida que avanza el destete. El resultado, representativo de un mínimo de tres experimentos, fue cuantificado por densitometría usando el ImageJ. Las diferentes letras indican diferencias significativas tras el análisis ANOVA de los datos, $p < 0.05$; la letra “a” siempre indica el menor valor dentro del grupo.

1.2.2. LA CALPAÍNA MEDIA LA ESCISIÓN PROTEOLÍTICA DE LAMP2A EN LA MEMBRANA LISOSOMAL, INDUCIENDO UN INCREMENTO DE LA PERMEABILIDAD LISOSOMAL.

Con el objetivo de demostrar que LAMP2a es un sustrato de CAPN1 y CAPN2, se realizaron experimentos *in vitro* usando calpaínas recombinantes. Se añadieron r-CAPN1 y r-CAPN2 sobre extractos lisosomales aislados de glándulas mamarias lactantes, cuyos lisosomas se presuponen intactos al no haberse iniciado la MCP del epitelio. En la **figura 25**, se muestra como LAMP2a desaparece de forma proporcional cuando las fracciones enriquecidas en lisosomas se incuban con concentraciones crecientes de CAPN1 (**figura 25A**) y de CAPN2 (**figura 25B**) en presencia de Ca^{2+} . En ausencia de calpaína y de Ca^{2+} , no se observó degradación de LAMP2a (pocillo 1, en la parte superior de los paneles), sin embargo, se observó una ligera disminución en los niveles de LAMP2a tras la adición de Ca^{2+} , probablemente debido a la activación de las calpaínas intrínsecas. La escisión proteolítica de LAMP2a por las calpaínas también se demostró de forma no solo concentración-dependiente, sino también tiempo-dependiente (**figura 25C**).

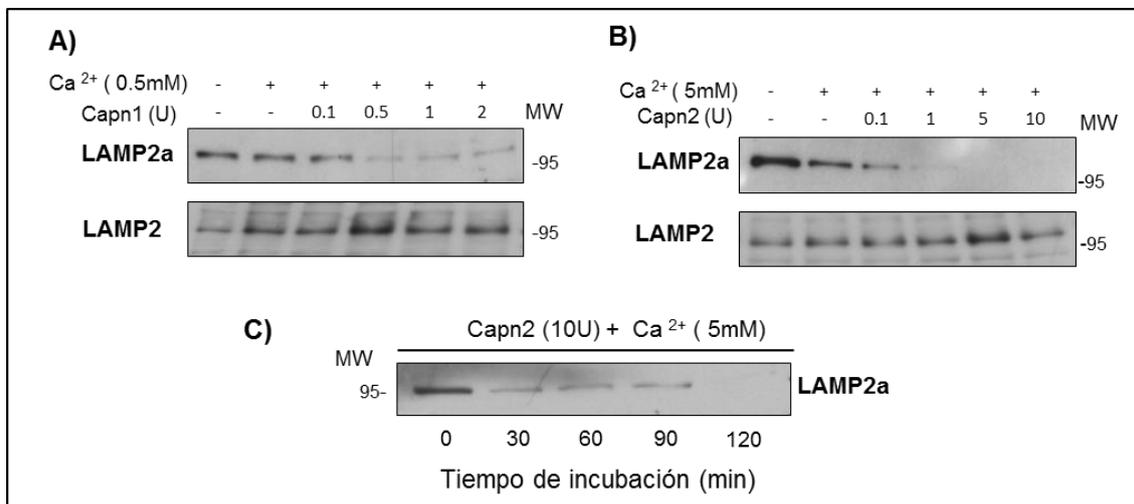


Figura 25: Degradación dosis- y tiempo-dependiente de LAMP2a por calpaínas. Western blots contra LAMP2a y LAMP2 en lisosomas control tratados con concentraciones crecientes de CAPN1(A) y CAPN2 (B), junto con Ca^{2+} (0.5 mM y 5 mM, respectivamente). C) Western blots contra LAMP2a en lisosomas de ratones control tratados con CAPN2 durante diferentes periodos de incubación.

Sin embargo, se ha publicado que la degradación de LAMP2 en líneas celulares transformadas, viene mediada por catepsinas, las cuales se expresan en mayor cantidad y con mayor actividad proteolítica en este tipo de líneas oncogénicas (Fehrenbacher *et al.* 2008). Para descartar que, en nuestro modelo las catepsinas pudieran jugar algún papel en la rotura de la cola citosólica de LAMP2a, los extractos lisosomales se incubaron con CAPN1 o 2 en presencia de Ca^{2+} y un conjunto de inhibidores de proteasas (**figura 26**). La adición de un inhibidor específico de catepsina B (Ca-074Me) no bloqueó la degradación de LAMP2a (**figura 26**, pocillos 3-4, paneles A y B). La adición de inhibidores de la calpaína, tales como calpeptina (inactiva CAPN1, CAPN2 y las papaínas), el inhibidor VI o ALLN (inhiben tanto calpaínas como catepsinas B y L); evitaron la degradación de LAMP2a *in vitro* (**figura 26**, pocillos 5-10, paneles A y B). Estos resultados proporcionan pruebas concluyentes de que las calpaínas son responsables del procesamiento proteolítico de LAMP2a durante la involución de la glándula mamaria.

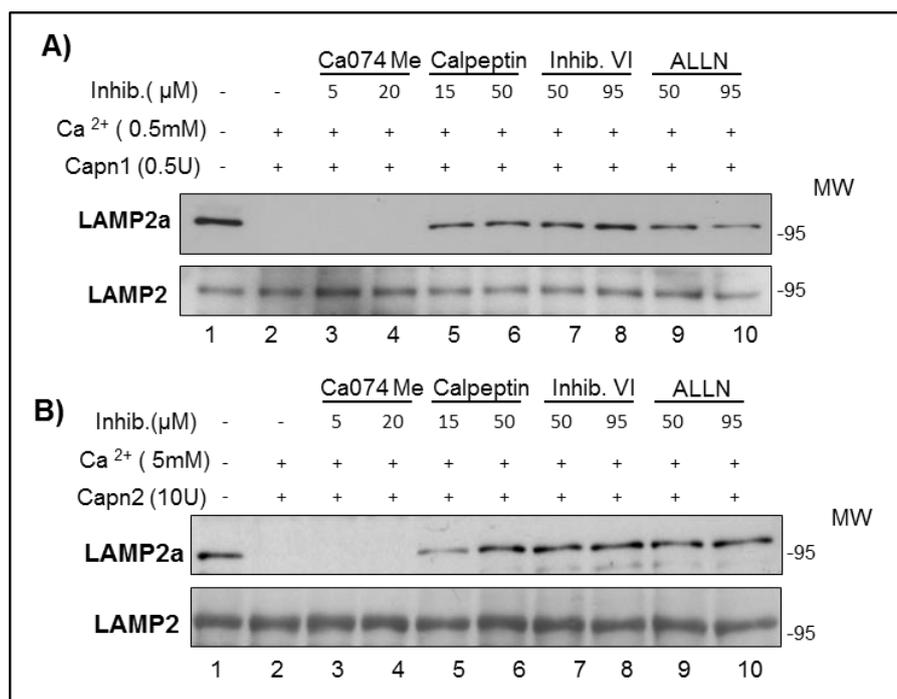


Figura 26: Degradación específica de LAMP2a por calpaínas. Western blots contra LAMP2a y LAMP2 en lisosomas intactos, obtenidos de ratones control tratados con r-CAPN1(A) y r-CAPN2 (B), junto con Ca^{2+} (0.5 mM y 5 mM, respectivamente) y diversos inhibidores de calpaínas y catepsinas: Ca074 Me, inhibidor específico de catepsinas; calpeptin, inhibidor específico de calpaínas; y calpain inhibitor VI y ALLN, inhibidores mixtos de calpaínas y catepsinas.

Las consecuencias inmediatas de esta ruptura proteolítica, serían la pérdida de la integridad lisosomal, con la consiguiente liberación del contenido lisosomal al citosol. Para comprobar esta idea, se midieron niveles de catepsinas liberados al medio y niveles remanentes en los lisosomas, en extractos tratados con dosis crecientes de r-CAPN1, donde ya se había observado una degradación dosis-dependiente de LAMP2a (**figura 25A**). Este experimento demuestra que, la degradación de LAMP2a induce a su vez la pérdida de la integridad lisosomal, con la consiguiente liberación de catepsinas al medio (**figura 27**).

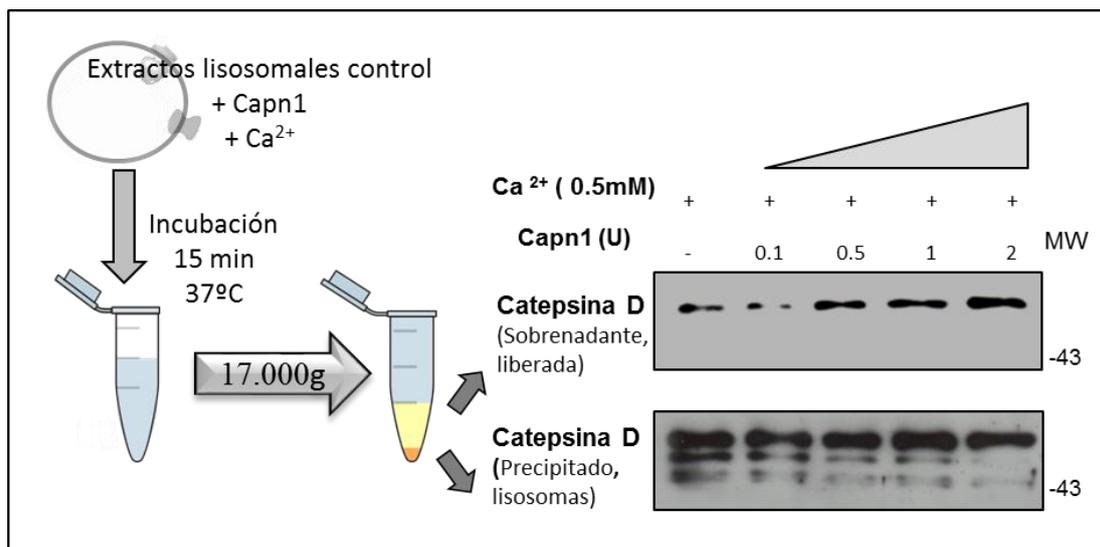


Figura 27: Liberación concentración-dependiente de catepsinas al sobrenadante mediada por adición de calpaína. Esquema representativo del experimento llevado a cabo con extractos lisosomales de ratones control. La adición de r-CAPN1 y Ca²⁺ induce una liberación proporcional de catepsinas al sobrenadante.

1.2.3. ANÁLISIS 2D-DIGE DE LOS SUSTRATOS DE LA CALPAÍNA EN EXTRACTOS LISOSOMALES.

Con el objetivo de determinar las proteínas lisosomales diana de CAPN2, se llevó a cabo un estudio proteómico a gran escala. Para esto, partimos de fracciones enriquecidas en lisosomas de glándula mamaria, correspondientes a ratones control lactante, cuyos lisosomas se suponen intactos por no haberse iniciado aún la muerte celular del epitelio. Dichos extractos se incubaron en presencia y ausencia de r-CAPN2 y Ca²⁺. Tanto las muestras control, como las tratadas, se analizaron mediante 2D-DIGE tal y como se explica en material y métodos. Antes de proceder

a la separación electroforética de las muestras en las dos dimensiones (punto isoeléctrico y peso molecular), se comprobó que el tratamiento con r-CAPN2 había funcionado, al observar degradación de LAMP2a, el primer sustrato que identificamos como diana lisosomal de las calpaínas (**figura 28A**). Las muestras tratadas solo con Ca^{2+} se marcaron con el fluoróforo verde, mientras que las muestras tratadas con r-CAPN2 y Ca^{2+} se marcaron con el fluoróforo rojo. De ahí que, puntos o *spots* amarillos en el gel (puntos de colocalización), señalen proteínas no degradadas, mientras que puntos verdes nos indicarían los sustratos de la CAPN2 (**figura 28B**). Dichos puntos, con una diferencia estadística significativa, se analizaron por espectrometría de masas.

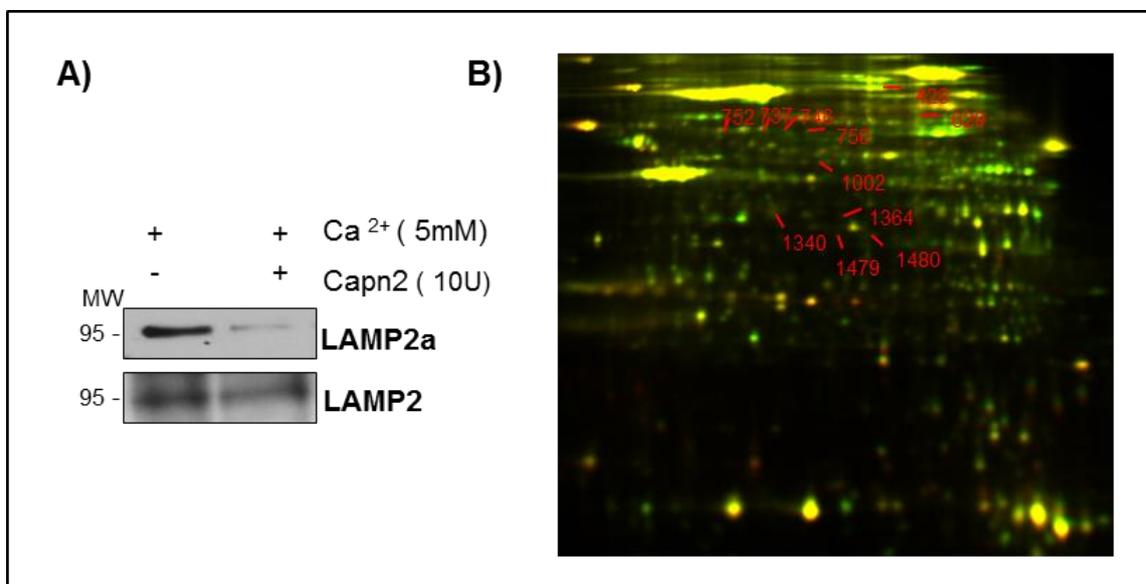


Figura 28: Validación del tratamiento con calpaína y gel resultante del 2D DIGE. A) Comprobación de la eficacia del tratamiento con r-CAPN2 y Ca^{2+} sobre los extractos lisosomales, antes de la realización del 2D-DIGE. Se realizaron western blots contra los anticuerpos *Lamp2a* (sustrato ya identificado) y *Lamp2*. **B)** Gel resultante de la separación electroforética de las muestras marcadas con cada fluoróforo. Los sustratos de la calpaína aparecen en verde, mientras que las proteínas resistentes a la digestión por calpaína se ven amarillas. Los puntos que aparecen numerados se extrajeron y se identificaron mediante espectrometría de masas.

De entre todos los puntos o *spots* seleccionados y analizados por espectrometría de masas, solo 11 fueron identificados como posibles sustratos lisosomales de la calpaína. Gracias al uso de una herramienta de software llamada *Multiple Kernel Learning algorithms*, una aplicación capaz de predecir los posibles sitios

de corte de calpaína (DuVerle *et al.* 2011), se predijeron los posibles sitios de escisión en sus dianas. En la **tabla 7**, se presentan las proteínas correspondientes a los 11 *spots* que se extrajeron, junto con las zonas más probables de corte para cada proteína. Algunas de las proteínas identificadas se localizan en los endosomas, tales como la ligasa de ácidos grasos de cadena larga (LACS) o la β 2-glicoproteína1. Teniendo en cuenta que a partir de nuestro protocolo de fraccionamiento subcelular, se obtiene una fracción enriquecida en lisosomas, no podemos descartar la posibilidad de que aparezcan proteínas que no pertenezcan exclusivamente al compartimento endosoma- lisosoma. La presencia de la subunidad b2 de la bomba de protones V-ATPasa (VATB2, *V-type proton ATPase subunit B, brain isoform*) resultó muy interesante, no solo por su función en la célula, ya que es la encargada del mantenimiento del pH ácido lisosomal, sino también porque la misma proteína se identificó en varios *spots* diferentes del gel (737, 746, 752 y 756).

Tabla 7: Listado de puntos degradados de forma diferencial por la calpaína, seleccionados en el análisis 2D-DIGE, e identificados mediante espectrometría de masas. SC%: porcentaje de proteína que se solapa con los fragmentos identificados en el espectrómetro de masas. Score: puntuación teórica estimada con el algoritmo de Multiple Kernel, indicativa de la probabilidad de corte en cada punto dentro de la proteína. Con negrita se ha señalado la de mayor probabilidad.

| Núm. spot | Número de entrada NCBI | Proteína | SC% | Gene ontology classification | Posible sitio de corte | Score |
|-----------|------------------------|---|-----|---|---|-----------|
| 428 | NP_032007.2 | <i>Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1</i> (LACS 1) | 25% | Ligasa de ácidos grasos de cadena larga, dependiente de ATP. | 40, 44, 105, 255, 280 , 403, 415, 435, 448, 607. | 0.11-0.17 |
| | NP_598738.1 | <i>Serotransferrin</i> (Transferrin) | 13% | Transportador transmembrana de iones férricos | 26, 92, 273, 268 , 455, 459, 462, 478, 525, 610 | 0.11-0.16 |
| 629 | NP_032007.2 | LACS 1 | 17% | | | |
| | NP_598738.1 | <i>Serotransferrin</i> (Transferrin) | 12% | | | |
| | NP_038503.4 | <i>Beta-2-glycoprotein 1</i> (Apo-H) (B2GPI) (Beta(2)GPI) | 9% | Regulación de la coagulación sanguínea, procesamiento metabólico de los triglicéridos | 49, 69, 75, 104, 108 , 154, 214, 249, 338. | 0.09-0.13 |

| | | | | | | |
|------|-------------|---|-----|---|--|-----------|
| 737 | NP_031535.2 | <i>V-type proton ATPase subunit B, brain isoform (V-ATPase subunit B2)</i> | 36% | Transportador de protones ATP-dependiente | 4, 41 , 46, 73, 308, 337, 349, 462, 501, 503. | 0.11-0.14 |
| 746 | NP_031535.2 | V-ATPase subunit B2 | 20% | | | |
| 752 | NP_031535.2 | V-ATPase subunit B2 | 48% | | | |
| 756 | NP_031535.2 | V-ATPase subunit B2 | 20% | | | |
| | NP_058662.2 | <i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (3-PGDH)</i> | 7% | Actividad oxidorreductasa | 60 , 194, 262, 312, 343, 389, 405, 446, 461, 527. | 0.1-0.15 |
| 1002 | NP_082253.1 | <i>Adipocyte plasma membrane-associated protein</i> | 20% | Actividad estriictosidina sintasa | 9, 21, 85, 203, 256, 289, 315, 323 , 354, 365. | 0.1-0.14 |
| 1340 | NP_081269.1 | <i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH-1) (Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1)</i> | 35% | Actividad hidrolasa | 4, 18, 19, 50, 98, 142, 211, 218, 236 , 256. | 0.1-0.13 |
| | NP_038664.2 | <i>Serine/ threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit (PP-1G)</i> | 9% | Actividad fosfatasa Serina/Treonina | 20, 121, 183, 267, 301, 305, 306, 314 , 315, 318. | 0.09-0.24 |
| 1364 | NP_031501.1 | <i>60S acidic ribosomal protein P0</i> | 15% | Componente estructural del ribosoma | 55, 70, 120, 141, 239, 275, 285, 286 , 291, 292. | 0.1-0.2 |
| 1479 | NP_666245.2 | <i>Golgi phosphoprotein 3</i> | 13% | | 38, 59 , 62, 65, 72, 75, 88, 162, 212, 315. | 0.11-0.18 |
| 1480 | NP_666245.2 | <i>Golgi phosphoprotein 3</i> | 19% | | | |

Como se ha comentado, la proteína VATB2 constituye una diana de gran trascendencia en el mantenimiento de la homeostasis del pH lisosomal, ya que es una subunidad de la H⁺-ATPasa vacuolar (V-ATPasa). La V-ATPasa es una bomba de protones con múltiples subunidades, anclada a la membrana lisosomal, y encargada de la acidificación de los compartimentos intracelulares (Beyenbach *et al.* 2006). De ahí que, una alteración en dicha bomba conduzca a problemas en el funcionamiento del aparato de Golgi, del retículo endoplásmico, de vacuolas y de vesículas

endocíticas y exocíticas. A nivel patológico, mutaciones en diferentes subunidades de la bomba pueden acarrear desde sordera hasta osteopetrosis, una enfermedad caracterizada por el endurecimiento de los huesos, debido a la reducción de la actividad osteoclástica (Beyenbach *et al.* 2006). La escisión de VATB2 también se comprobó *in vivo*. Partiendo de extractos lisosomales de diferentes tiempos de destete, se realizaron western blots, en los que se observa que dicha subunidad de la V-ATPasa desaparece de la fracción lisosomal. La degradación de dicha bomba, junto con la escisión de LAMP2a, apoya la idea de que, los lisosomas a lo largo de la involución de la glándula mamaria, sufren una progresiva desestabilización de sus membranas debida a la acción de las calpaínas (**figura 29**).

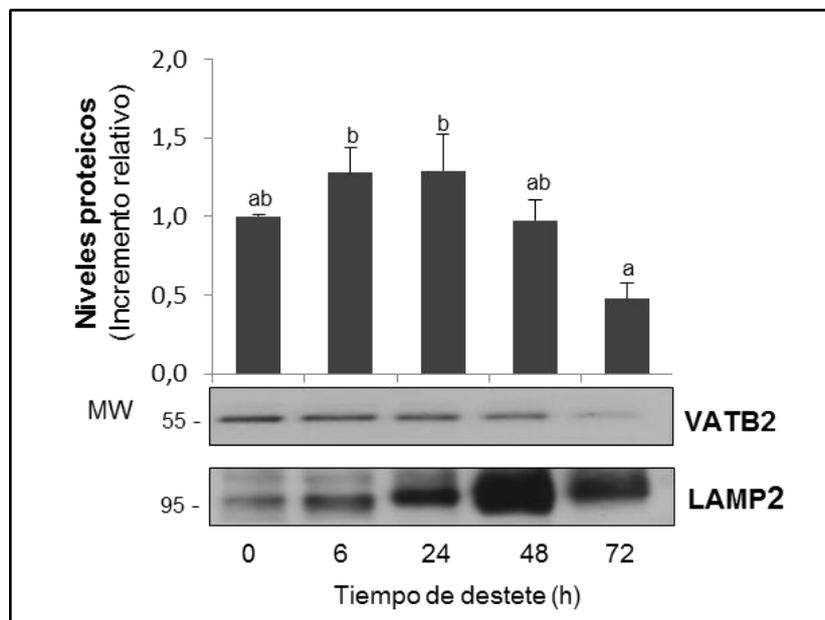


Figura 29: Niveles de VATB2 a lo largo de la involución. *Immunoblots correspondientes a fracciones enriquecidas en lisosomas. Se observa que a las 72h de destete, se produce una degradación de VATB2, una de las subunidades de la V-ATPasa. Como marcador de carga se utilizó LAMP2. El resultado, representativo de un mínimo de tres experimentos, fue cuantificado por densitometría usando el Image J. Las diferentes letras indican diferencias significativas tras el análisis ANOVA de los datos, $p < 0.05$; la letra “a” siempre indica el menor valor dentro del grupo.*

1.2.4. LA INHIBICIÓN *IN VIVO* DE LA CALPAÍNA RETRASA LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

Para determinar la relevancia de las calpaínas en el contexto de la involución, y determinar exactamente las consecuencias de su actividad a nivel global, decidimos hacer experimentos de inhibición *in vivo* de las mismas, tanto con el uso de un inhibidor específico (calpeptina) como con el uso de siRNA. La inhibición *in vivo* de las calpaínas mediante inyección intraperitoneal de calpeptina cada 24 horas durante las primeras 72 horas de destete, conduce a un retraso en la involución, como se puede observar en las tinciones de hematoxilina-eosina (**figura 30**). La presencia de estructuras túbulo-acinares y una mayor cantidad de células secretoras en las muestras tratadas con calpeptina, en comparación con tejido de 72h tratado con vehículo, demuestran el esperado retraso en la involución. Es más, las muestras a las que se les inyectó el vehículo presentan las características típicas de un destete de tres días: la matriz ya está remodelada, se han colapsado la mayoría de estructuras lóbulo-alveolares y la glándula está prácticamente repoblada por los adipocitos.

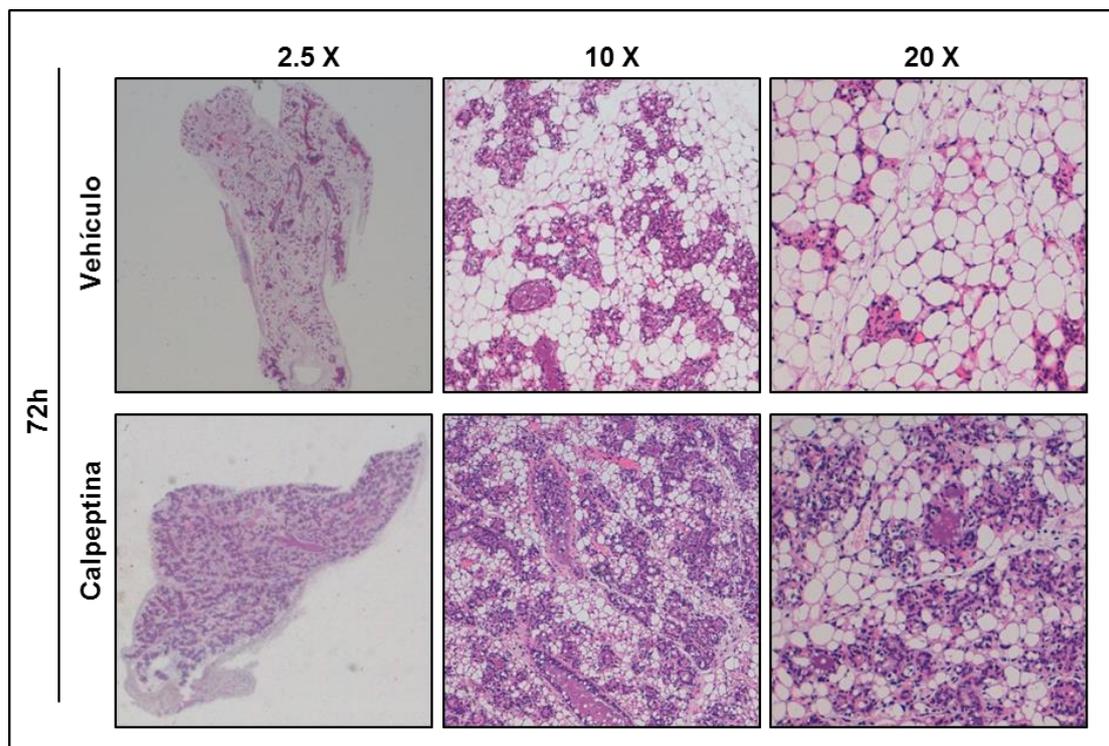


Figura 30: Hematoxilina-eosinas de secciones de glándula mamaria con vehículo o calpeptina de 72h de destete. Se presentan diferentes aumentos 2.5, 10 y 20 X.

Una vez vistos los efectos a nivel microscópico nos propusimos comprobar a nivel molecular, que efectivamente con el tratamiento con calpeptin, se impedía la activación de las calpaínas, y lo que esto conlleva. Es decir, un retraso en la degradación de los sustratos lisosomales, que en última instancia conduce a una demora en la muerte celular programada mediada por la liberación del contenido lisosomal. Mediante WB, se confirmó el efecto inhibitorio de calpeptina sobre las calpaínas (sobre todo en CAPN1) ya que hay una mayor cantidad de extremo amino, indicativo de una menor activación. También encontramos una menor degradación de LAMP2a. Sorprendentemente, ni la activación ni los niveles de CAPN2 se ven afectados, lo que sugiere que la escisión de LAMP2a *in vivo* se produce mayoritariamente por la acción de CAPN1 (**figura 31A**).

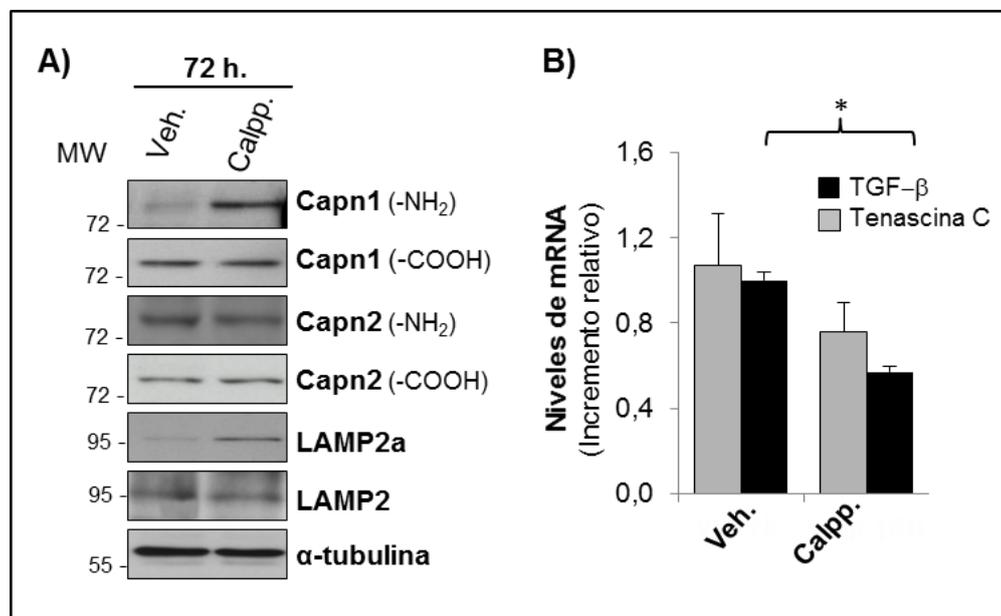


Figura 31: Niveles de calpaínas y de marcadores de remodelación tisular tras el tratamiento *in vivo* de calpeptina. A) Western Blots de los extractos proteicos obtenidos a partir de glándula mamaria de ratones de 72h de destete a los que se les ha inyectado vehículo o calpeptina. **B)** Niveles de mRNA de TGF-β y Tenascina C en las muestras de 72h de vehículo y calpeptin. El análisis estadístico se llevó a cabo con el test *t*-Student, donde $*p < 0.05$

Puesto que la histología observada (**figura 30**), muestra una alteración también a nivel del estroma y de la matriz extracelular tras el tratamiento con calpeptina, se midieron los niveles de mRNA de *Tenascina-C* y de *TGF-β1*. La

Tenascina-C es una glicoproteína de adhesión de la matriz extracelular que incrementa su expresión durante la involución (O' Brien *et al.* 2011). La expresión de esta proteína se encuentra disminuida en los ratones inyectados con calpeptina. El TGF- β 1, es un factor regulador clave de la involución del tejido mamario, y su sobreexpresión se ha relacionado con una aceleración del remodelado acontecido durante el destete (Booth *et al.* 2007). En nuestro caso, los ratones tratados con calpeptina, al igual que en el caso anterior, presentan unos niveles de mRNA de *TGF- β 1* disminuidos de forma significativa. Por tanto, la disminución de los niveles de mRNA de *Tenascina-C* y *TGF- β 1* (**figura 31B**) confirman esta menor remodelación de la glándula, sugiriendo la idea de que la inhibición de la activación de las calpaínas, retrasa, sin llegar a suprimir, el proceso de remodelación postlactancia.

Para evaluar el grado de demora de la muerte celular programada de las células epiteliales secretoras utilizamos diversos enfoques. Por un lado, se determinó la presencia de fragmentos de cromatina, en forma de oligonucleosomas en las células (**figura 32A**). En este caso, se observa una disminución del mismo en los ratones tratados con calpeptina verificando el retraso observado en la involución. Por otro lado, la medida de la activación de caspasa-3 también se ha utilizado como forma de evaluar la apoptosis. Para cada una de las tres técnicas empleadas, western blot (**figura 32B**), medida de actividad caspasa-3 mediante espectrofotometría (**figura 32C**) e inmunofluorescencia (**figura 32D**), se obtiene el mismo resultado. En todos los casos, se detecta que las muestras con calpeptina presentan mayor cantidad de caspasa-3 activa. Estos resultados, aunque inicialmente podrían ser contradictorios con un retraso en el inicio de la involución, se pueden explicar por el hecho de que los ratones tratados con el vehículo, ya han sufrido la mayor parte de la muerte celular, y la glándula mamaria ya ha sido prácticamente remodelada. Es decir, la inhibición de la actividad calpaína frena el proceso involutivo, pero no lo impide, ya que el proceso continúa, como se puede ver por la mayor cantidad de caspasa-3 activa. De hecho, podría tratarse de una señal compensadora, frente a la falta de actividad de las calpaínas.

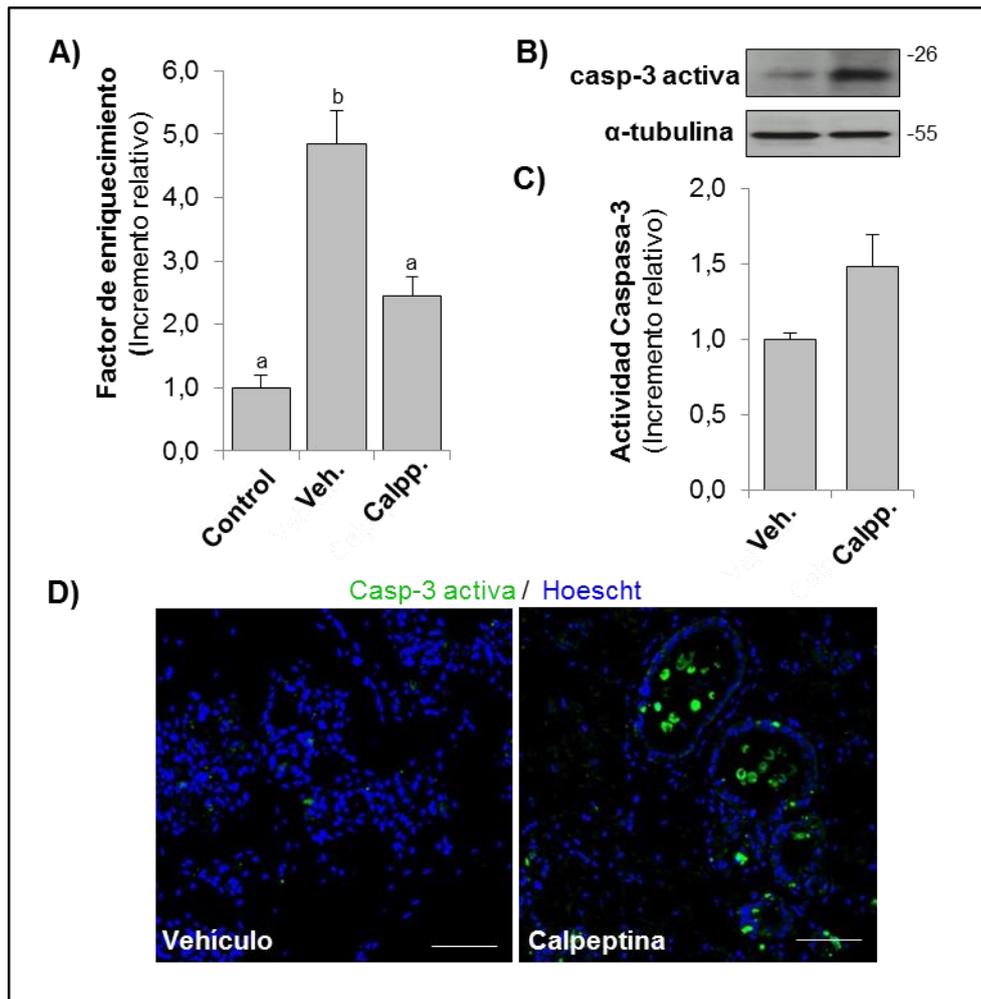


Figura 32: Evaluación del grado de muerte celular: determinación de fragmentos oligonucleosomales y medida de la actividad caspasa-3, tras el tratamiento in vivo con calpeptina. A) Cantidad de mono- y oligonucleosomas (factor de enriquecimiento) en citoplasma, medida en extractos proteicos de ratones control (0h) y de 72h de destete a los que se les ha inyectado vehículo o calpeptina. Dicho parámetro se expresa como un incremento relativo respecto al control. **B)** Western Blots de extractos proteicos obtenidos tras 72h de destete con ratones inyectados bien con calpeptina o con vehículo. **C)** Medida de actividad caspasa-3 por espectrofotometría, según se ha explicado en material y métodos. **D)** Inmunofluoresencias con un anticuerpo contra caspasa-3 en muestras de 72h de destete tratadas con el inhibidor de calpaínas o el vehículo. Los núcleos se tiñen con Hoechst. Escala: 75 μ m.

Todo lo expuesto anteriormente parece indicar que, *in vivo*, CAPN1 sería la calpaína implicada en la escisión de LAMP2a, y por tanto en la desestabilización lisosomal. Con el objetivo de demostrar esta idea, se silenció esta proteasa mediante *siRNA Capn1* durante las primeras 72h de destete, inyectándose de forma local en la glándula mamaria con una periodicidad diaria. Tras el tratamiento, se extrajeron fracciones proteicas totales, y se verificó el silenciamiento parcial de CAPN1 por western blot. Los ratones transfectados mostraron una clara disminución en los niveles de proteína de CAPN1, en comparación con los ratones de 72h de destete. Es de destacar, la especificidad en el silenciamiento, ya que no se afectaron los niveles de CAPN2. También se puede apreciar en esta figura que la disminución de los niveles totales de CAPN1, conduce a una disminución de forma muy intensa en la degradación de LAMP2a, manteniéndose los niveles de LAMP2, el anticuerpo que reconoce el conjunto de isoformas en el dominio transmembrana, constantes. Como ya se había observado antes con el tratamiento con calpeptina (**figura 31A**), parece ser que *in vivo*, es CAPN1 la encargada de la escisión de LAMP2a (**figura 33**), y por tanto, la principal mediadora de la desestabilización lisosomal.

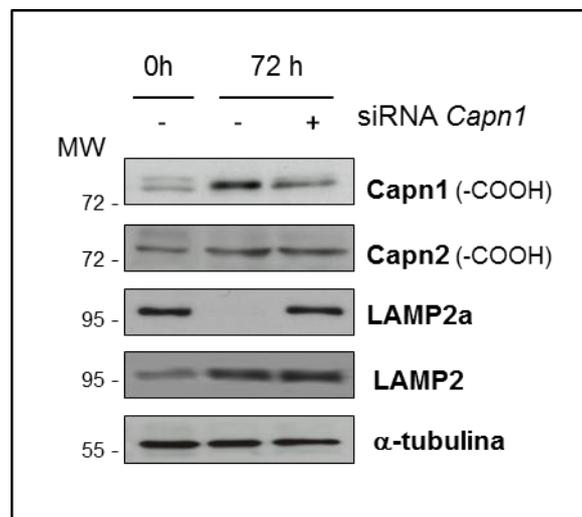


Figura 33: Niveles proteicos en extractos de glándula mamaria tratados con *siRNA Capn1*. Western Blots de extractos proteicos obtenidos a partir de glándula mamaria de ratones control (0h) y de 72h de destete a los que se les ha inyectado *siRNA*. La igualdad de carga se ha comprobado con el uso de α -tubulina. El resultado es representativo de un mínimo de tres experimentos.

1.3. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL NÚCLEO.

1.3.1. LAS CALPAÍNAS ESTÁN PRESENTES Y ACTIVAS EN FRACCIONES NUCLEARES.

En diferentes tipos celulares se ha detectado un papel nuclear de las calpaínas (Chou *et al.* 2010; Chang *et al.* 2011) donde podrían ejercer su función gracias a su translocación directa al compartimento nuclear (Bano *et al.* 2010). En estos modelos experimentales, la elevación transitoria del Ca^{2+} intracelular, somete a las calpaínas a una relocalización subcelular específica desde el citosol al núcleo, donde pueden degradar directamente factores de transcripción y proteínas nucleares (Neuberger *et al.* 1997; Watt *et al.* 1993). Entre este tipos de sustratos nucleares, se encuentran *poly (ADP-ribose) polymerase-1* (PARP) (Pellicciari *et al.* 2004), topoisomerasa I (Chou SM *et al.* 2011), *Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase type IV* (Tremper- Wells *et al.* 2005).

Mediante inmunofluorescencia pudimos comprobar que, tras 72 horas de destete, las calpaínas se encuentran presentes en torno a los núcleos de las células epiteliales. Con el objetivo de confirmar dicha presencia y conocer las funciones de las calpaínas en los núcleos, se aislaron fracciones nucleares, y se realizaron WB. Dichos experimentos muestran que ambas calpaínas, aparecían en núcleos a las 72h de destete (**figura 34A**). Por otra parte, cuando se determinó la pérdida del extremo aminoterminal de ambas proteasas; se halló que, además de estar presentes también estaban activas. La pureza de las fracciones nucleares, se evaluó mediante WB, utilizando anticuerpos contra marcadores de diferentes orgánulos (**figura 34B**). En secciones de glándula mamaria de ratones de 72h de destete en las que se realizó un ensayo de inmunofluorescencia, se detectó CAPN1 y CAPN2 circundando determinados núcleos de células epiteliales de acini (**figura 34C**). Para comprobar estas observaciones, se inmunoprecipitaron las nucleoporinas periféricas (como Nup 358, Nup 214, Nup 153, Nup 62 reconocidas por el anticuerpo Mab414) y se realizó un WB contra calpaínas. El anticuerpo Mab414 es capaz de reconocer el epítipo hidrofóbico FXFG, secuencia altamente conservada y con diferente número de repeticiones en cada nucleoporina periférica (Bano *et al.* 2010). Los resultados permiten verificar que tras 72h de destete se produce una interacción de las calpaínas

con las nucleoporinas ubicadas en posiciones externas dentro del complejo del poro nuclear (figura 34D).

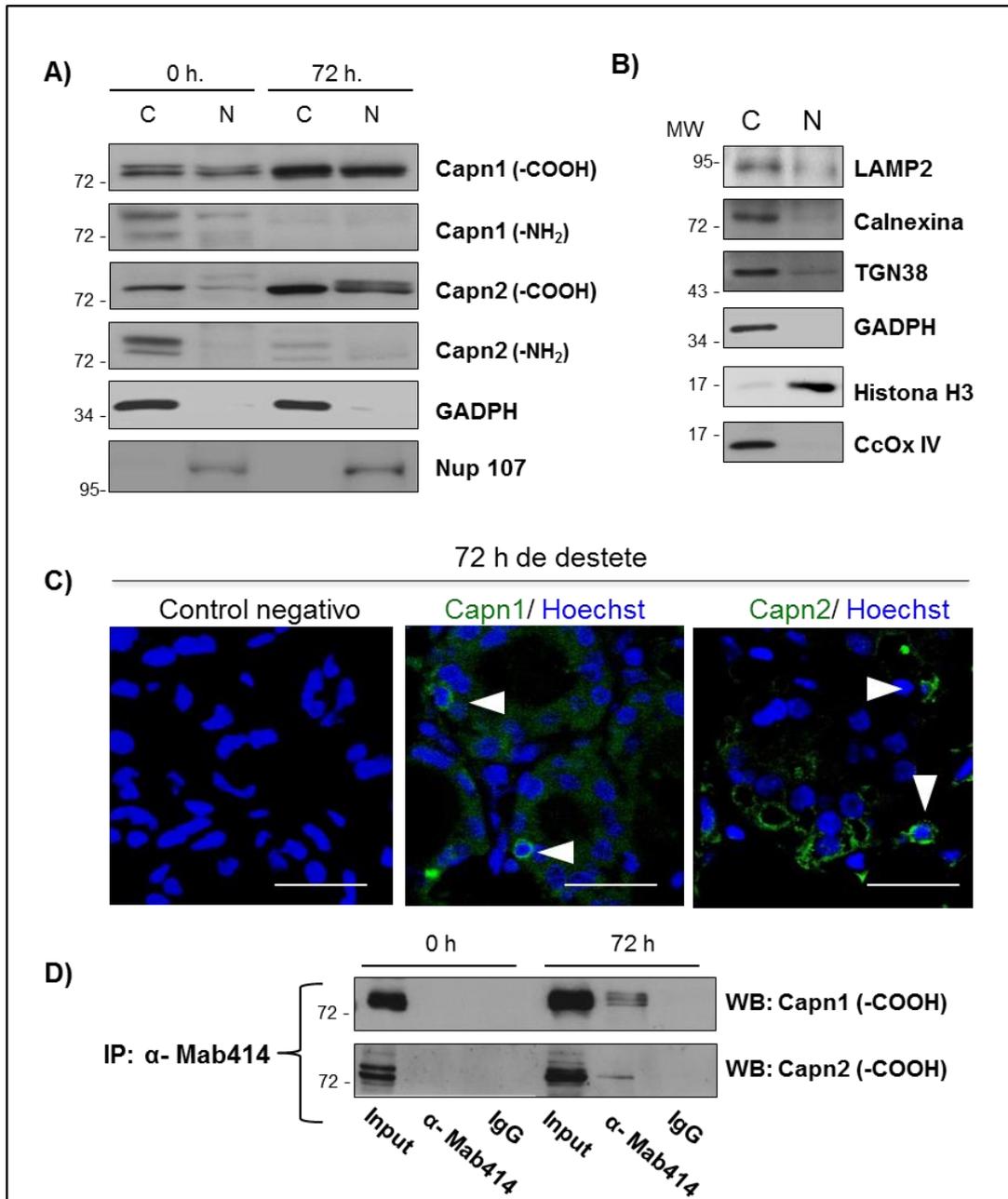


Figura 34: Las calpáinas están presentes y activas en núcleos de células epiteliales. **A)** Western blots de extractos nucleares (N) y citosólicos (C) de ratón lactante (0h) y de destete tras 72h. Se han determinado tanto los niveles como la activación de las calpáinas, usando los anticuerpos contra el extremo carboxi- y aminoterminal, respectivamente. GADPH (citósol) y Nup107 (núcleo) se ha usado como marcadores de fracción. **B)** Western blots de extractos mamaríos citosólicos (C) y nucleares (N), de

ratones lactantes contra *Lamp2* (Lisosomas), *Calnexin* (Reticulo endoplásmico), *CcOx IV* (mitocondria), *Histona H3* (Núcleos), *TGN38* (Aparato de Golgi) y *GADPH* (citósol). **C)** Inmunofluorescencias de 72h de destete contra *CAPN1* y *CAPN2*. Las puntas de flecha indican una señal de calpaína más intensa en torno al núcleo de células epiteliales. Escala 37,5 μm . **D)** Inmunoprecipitación con Anti-Mab414, un anticuerpo que reconoce nucleoporinas periféricas, seguido de WB contra *CAPN1* y *CAPN2*.

La translocación nuclear de calpaína también se evaluó a diferentes tiempos de involución, mediante inmunoblots de extractos nucleares purificados. Estos experimentos demostraron que ambas proteasas incrementan su presencia en los núcleos sobre todo tras 48h de destete (**figura 35**).

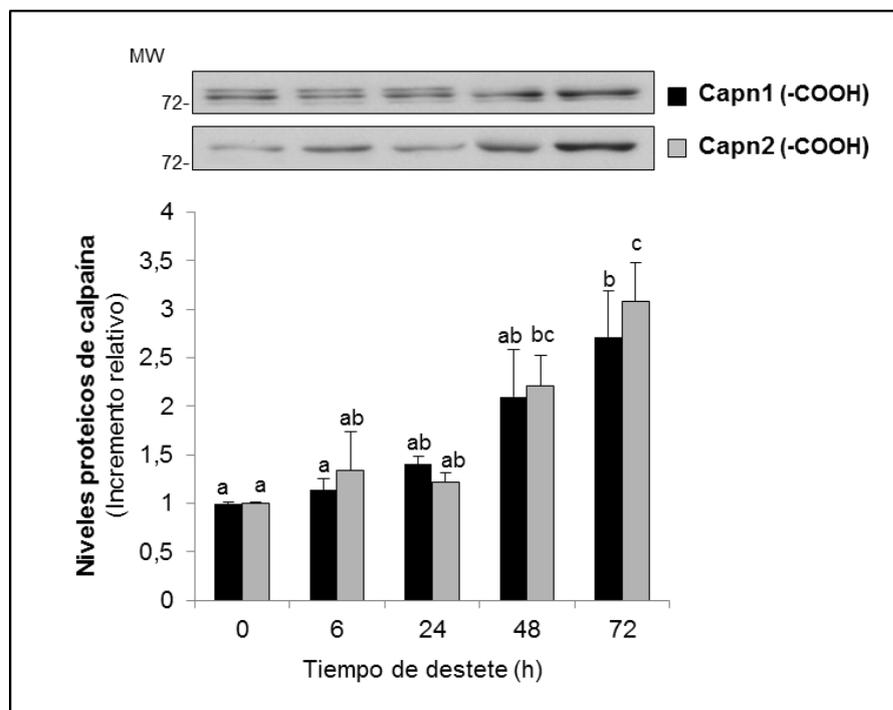


Figura 35: Translocación progresiva de las calpainas al compartimento nuclear. Inmunoblots correspondientes a fracciones enriquecidas en proteínas nucleares a diferentes tiempos de destete. El resultado, representativo de un mínimo de tres experimentos, fue cuantificado por densitometría usando el Image J. Las diferentes letras indican diferencias significativas tras el análisis ANOVA de los datos, $p < 0.05$; la letra “a” siempre indica el menor valor dentro del grupo.

1.3.2. LAS CALPAÍNAS INTERVIENEN EN LA ESCISIÓN DE NUCLEOPORINAS UBICADAS EN POSICIONES PERIFÉRICAS DEL COMPLEJO DEL PORO NUCLEAR.

Dado que ya había sido descrito que, en modelos neuronales de excitotoxicidad, la muerte celular programada estaba mediada por las calpaínas a través de la escisión de nucleoporinas (NUP) (Bano *et al.* 2010); decidimos estudiar si en el contexto de la involución tenía lugar esta misma degradación. Para ello, se determinaron mediante WB los niveles de NUP, tanto periféricas como las ubicadas en la parte central del poro nuclear, en extractos nucleares aislados de ratones sometidos a diferentes tiempos de destete. Las NUP periféricas, reconocidas mayoritariamente por el anticuerpo Mab414 (Nup 358, Nup 214, Nup 153, Nup 62, etc) se degradan durante la involución (**figura 36**). La proteólisis de estas NUP parece limitarse solo a las que ocupan posiciones periféricas, ya que la Nup 107, como ejemplo de nucleoporina ubicada en posición central dentro del poro nuclear, no aparece afectada a medida que avanza el destete.

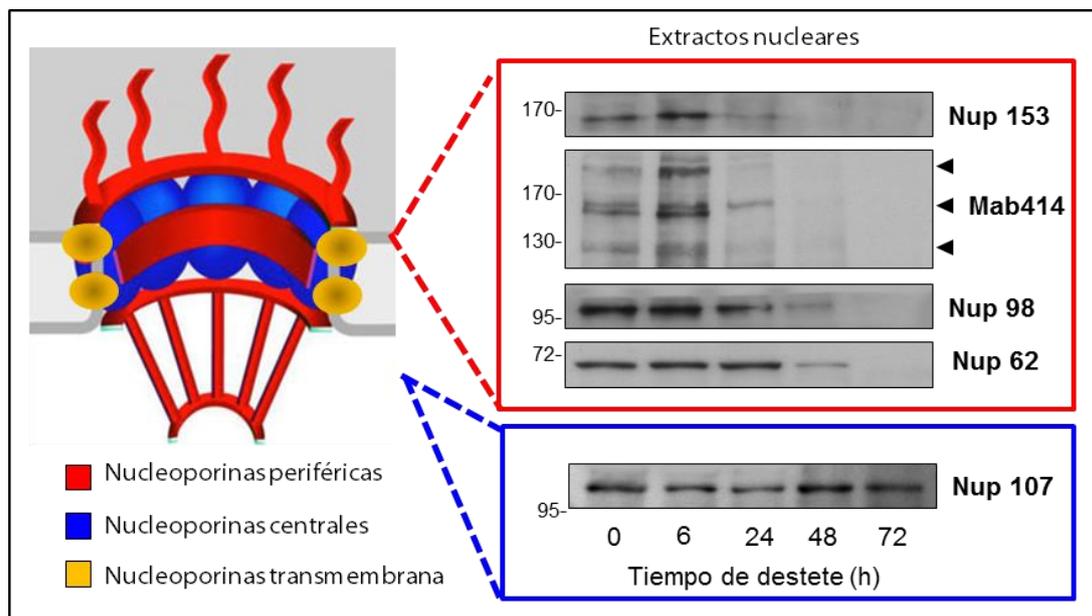


Figura 36: Degradación de NUP periféricas a lo largo de la involución. Representación esquemática de la estructura del complejo del poro nuclear, donde se clasifican las diferentes nucleoporinas que lo componen según su localización dentro de esta estructura. A la derecha, se muestran los inmunoblots de extractos nucleares contra diferentes nucleoporinas periféricas (encuadre rojo), así como la nucleoporina central Nup107 (encuadre azul).

En secciones de glándula mamaria se realizó un ensayo de inmunofluorescencia, para comprobar la posible colocalización de las calpaínas con estas NUP periféricas, utilizando el anticuerpo Mab414. En dicho ensayo se observó que ambas calpaínas colocalizaban con este anticuerpo a 72h (**figura 37**, puntas de flecha), fenómeno que no era observado en los ratones lactantes.

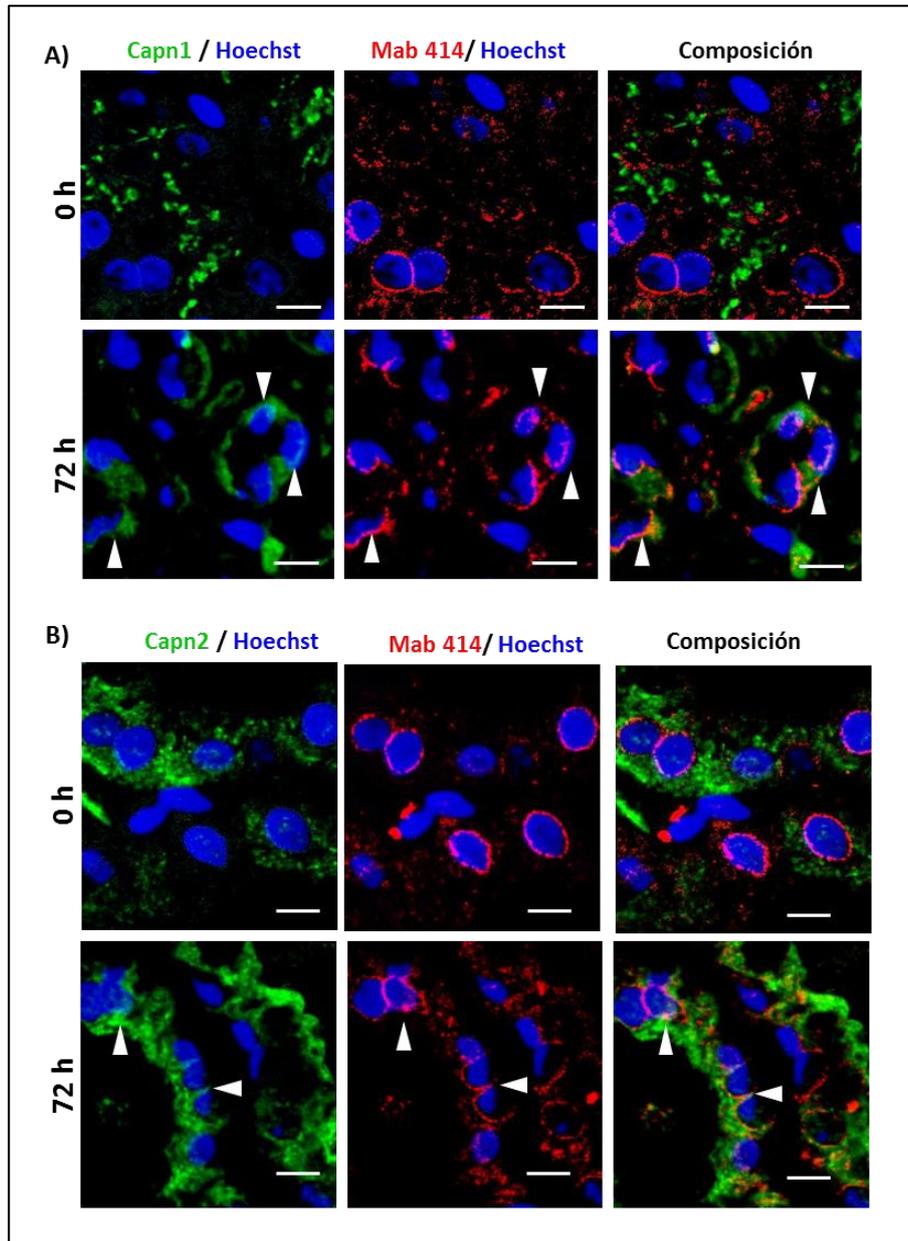


Figura 37: Localización de calpaínas junto con NUP periféricas en secciones de glándula mamaria control y tras 72h de destete. Inmunofluorescencias contra la CAPN1 (A) y la CAPN2 (B), junto con un marcador de nucleoporinas periféricas, Mab414. Las puntas de flecha muestran zonas anaranjadas de colocalización. Escala: 20 μ m

1.3.3. LA INHIBICIÓN DE CALPAÍNAS MEDIANTE siRNA O CON CALPEPTINA IMPIDE LA ROTURA DE NUCLEOPORINAS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

Para demostrar la degradación de las NUP periféricas del poro nuclear por las calpaínas, se realizaron varios experimentos *in vivo* e *in vitro*. La inhibición *in vivo* de CAPN1, ya sea por siRNA o mediante calpeptina, un inhibidor farmacológico específico; se realizó con muestras de 72h de destete, ya que es cuando se observa una mayor degradación de las NUPs. Cuando se utilizó siRNA *Capn1*, los niveles de CAPN1 se redujeron significativamente, manteniéndose constante los niveles de CAPN2, lo que demostró la especificidad en el silenciamiento (**figura 38A**). En los ratones tratados con calpeptina, no se observan diferencias en los niveles totales de calpaínas, sin embargo, se percibe una disminución de la activación de CAPN1, como demuestra la mayor cantidad de extremo amino indicativo de una menor activación (línea superior **figura 38B**). En ambos casos se bloqueó la degradación de las NUP periféricas, tanto las de alto peso molecular (Mab414: Nup358, Nup214, Nup153) como las de bajo (Nup62) (**figura 38**).

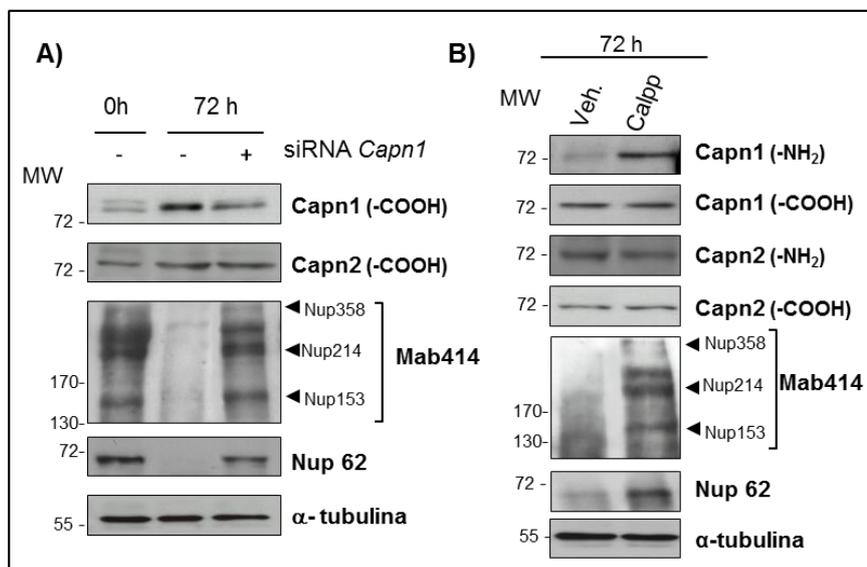


Figura 38: Consecuencias nucleares de la inhibición *in vivo* de calpaínas. A) Western blots representativos de CAPN1 y CAPN2 en ratones control lactantes (0h), en ratones destetados durante 3 días, y en ratones con el mismo tiempo de destete, pero a los que se les ha silenciado la CAPN1 mediante tratamiento con siRNA (siRNA

Calpain-1). También se miden niveles de degradación de nucleoporinas periféricas (*Mab414* y *Nup62*). **B)** *Inmunoblots* representativos donde se muestra los niveles de *CAPN1* y *2* (utilizando anticuerpos contra los dominios amino- y carboxiterminal), *Mab414* y *Nup62*, en extractos de glándulas mamarias vehículo y tratadas con calpeptina a las 72h del destete. α -tubulina se utilizó como control de carga en ambos casos.

Por otro lado, se realizaron experimentos *in vitro* partiendo de extractos nucleares de glándulas mamarias extraídas de ratones lactantes, ya que estos conservan la completa integridad de los poros nucleares y de las nucleoporinas que los componen. Estos extractos frescos se trataron con concentraciones crecientes de calpaínas recombinantes en presencia de Ca^{2+} , a 37°C durante 1h. Tras el tratamiento, las muestras se cargaron en un gel de acrilamida para su posterior análisis vía WB. La adición de una dosis creciente de calpaínas, induce una degradación proporcional de NUP periféricas. En ausencia de calpaínas y Ca^{2+} , no se observa la escisión de dichas NUP, confirmando el papel de las calpaínas en el procesamiento proteolítico de determinadas proteínas que componen el complejo del poro nuclear (**figura 39A y 39B**).

Además, se emplearon diferentes inhibidores de calpaínas para comprobar la especificidad de rotura. En este caso se procedió del mismo modo que en los experimentos anteriores, es decir, se partieron de extractos nucleares control a los que se les añadieron diferentes inhibidores de calpaínas: calpeptina, un inhibidor específico de calpaínas; *calpain inhibitor VI* y ALLN, inhibidores mixtos de calpaínas y otras proteasas. Tras el tratamiento se realizaron WB de los extractos y se observó que la presencia de inhibidores de calpaínas bloquea la degradación de las NUP (**figura 39C y 39D**), lo que demuestra la participación directa de las calpaínas en la desestabilización de los poros nucleares durante el destete. En ambos experimentos el uso de un anticuerpo contra el extremo amino de la histona H3, confirma la igualdad de carga.

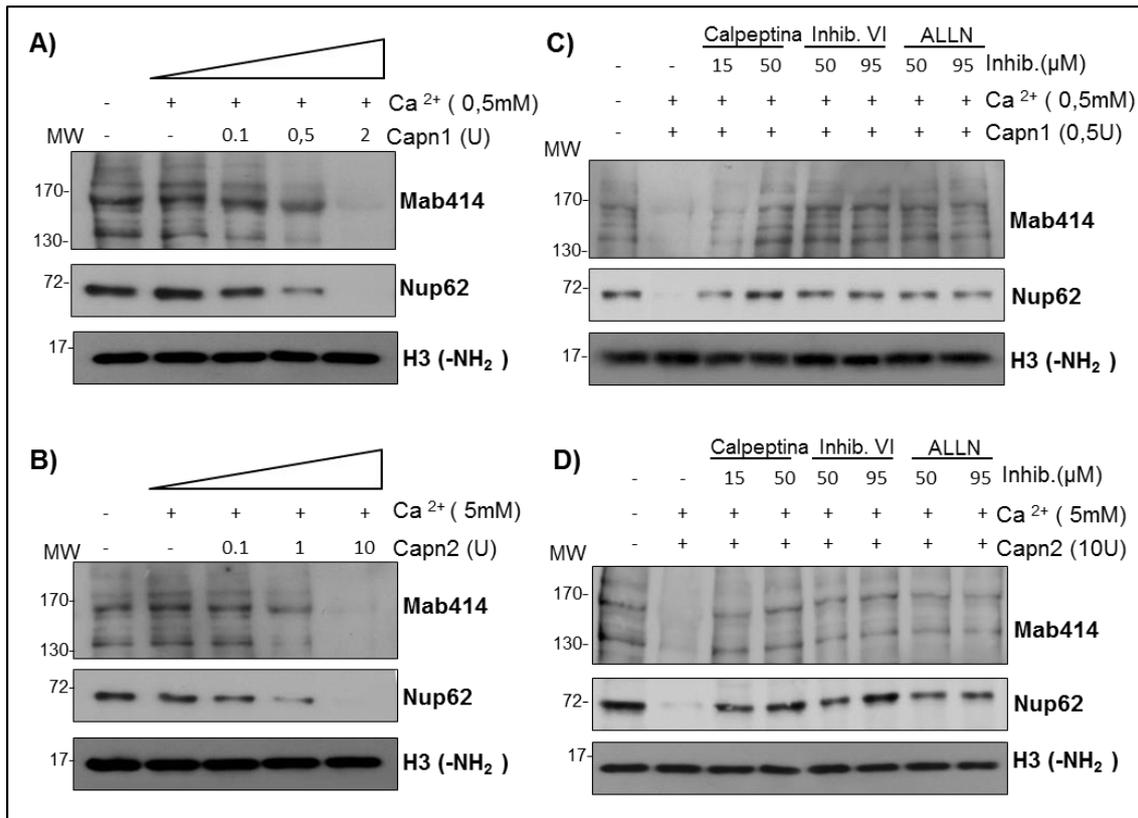


Figura 39: Degradación específica y dosis-dependiente de NUP periféricas por calpaínas. Western blots contra nucleoporinas periféricas, las de alto peso molecular reconocidas por Mab414, y Nup62; en extractos nucleares control tratados con concentraciones crecientes de r-CAPN1(A) y r-CAPN2 (B), junto con Ca²⁺ (0.5 mM y 5 mM, respectivamente). Western blots contra por Mab414, y Nup62 en extractos nucleares control tratados con r-CAPN1(C) y r-CAPN2 (D), junto con Ca²⁺ (0.5 mM y 5 mM, respectivamente) y diversos inhibidores de calpaínas: calpeptin, inhibidor específico de calpaínas; y calpain inhibitor VI y ALLN, inhibidores mixtos de calpaínas y otras proteasas. En todas las figuras el extremo amino de la histona H3, confirma la igualdad de carga.

1.3.4. LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE CALPAÍNA IMPLICA LA PÉRDIDA DE SELECTIVIDAD DEL TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA MEMBRANA NUCLEAR DE LAS CÉLULAS EPITELIALES.

Se ha descrito que la escisión de las NUP periféricas genera una alteración en los complejos de los poros nucleares, induciendo muchas veces la consiguiente

pérdida de la selectividad del transporte nuclear (Bano *et al.* 2010). Una consecuencia de esta alteración progresiva de la pérdida del transporte selectivo, sería el paso de proteínas citoplasmáticas al núcleo y viceversa. De hecho, en algunos modelos se ha observado que esta pérdida de la selectividad, puede cursar con la acumulación intranuclear de α -tubulina citoplasmática (D'angelo *et al.* 2009). Para comprobar en qué medida estaba afectada la selectividad del transporte nuclear, examinamos los niveles de α -tubulina y aldolasa (otro marcador citosólico) en núcleos y citosol, correspondientes a ratones control y de 72h de destete.

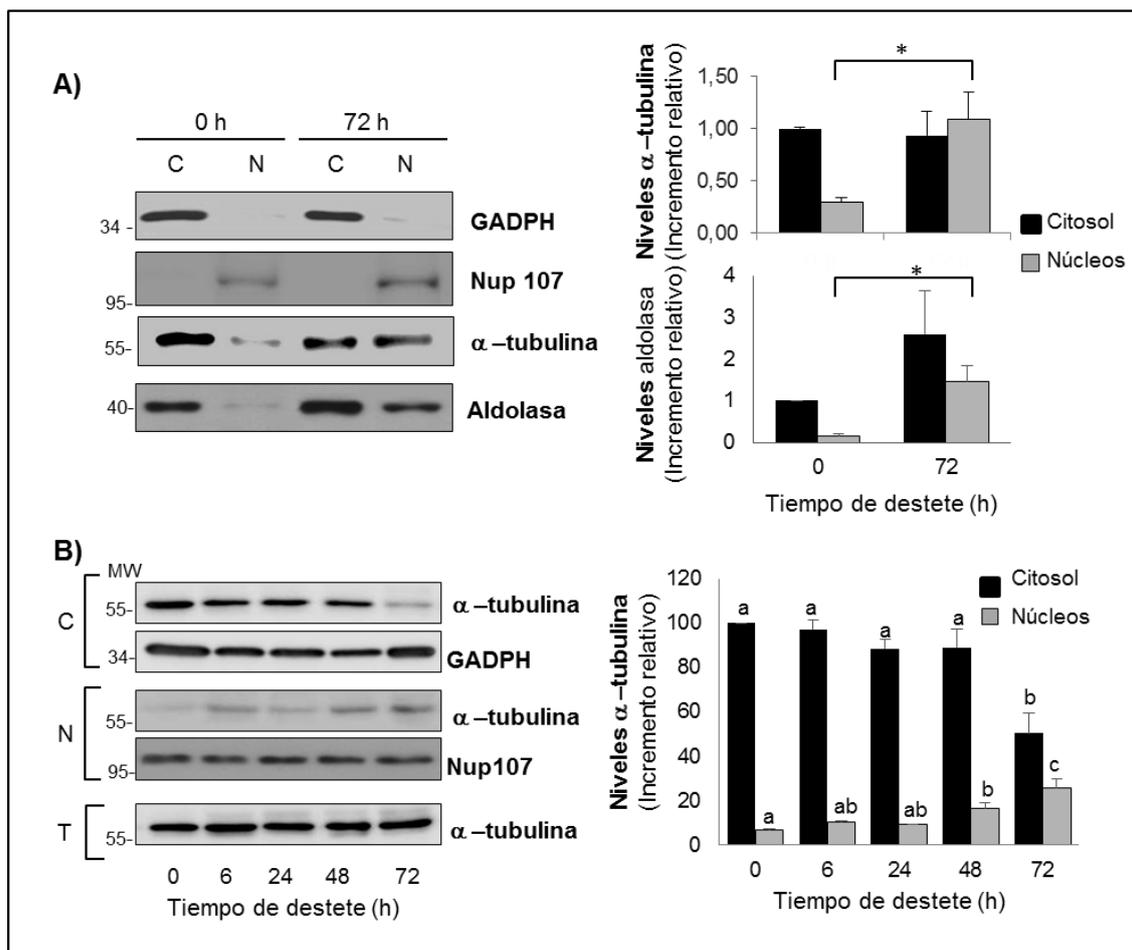


Figura 40: Consecuencias de la pérdida de la selectividad del transporte nuclear: α -tubulina y aldolasa en núcleos de ratones destetados. A) Immunoblots en extractos citosólicos (C) y nucleares (N) de ratones control (0h) y tras 72h de destete. GADPH y Nup107 se han usado como marcadores de fracción citosólica y nuclear, respectivamente. El análisis estadístico se llevó a cabo con el test t-Student, donde $*p < 0.05$ para 0h vs 72h. B) Immunoblots en fracciones citosólicas (C), nucleares (N) y

de extractos totales (T) de α -tubulina en control (0h) y a diferentes tiempos de destete. GADPH y Nup107 se han usado como marcadores de fracción citosólica y nuclear, respectivamente. El resultado, representativo de un mínimo de tres experimentos, fue cuantificado por densitometría usando el Image J. Las diferentes letras indican diferencias significativas tras el análisis ANOVA de los datos, $p < 0.05$; la letra "a" siempre indica el menor valor dentro del grupo.

En la figura se muestra que, tanto la α -tubulina como la aldolasa en ratones control, se ubican mayoritariamente en el citosol; sin embargo en los ratones tras 72h de destete, ambas proteínas aparece de forma uniformemente distribuida en el compartimento nuclear y citosólico, sugiriendo una pérdida del transporte selectivo nuclear (**figura 40A**). De hecho, cuando se determinan los niveles de α -tubulina a diferentes tiempos de destete, se observa una pérdida proporcional de esta proteína citoplasmática, al mismo tiempo que comienza a aparecer en el compartimento nuclear (**figura 40B**).

Otro tipo de experimento *in vitro*, confirma esta pérdida de la integridad de la membrada nuclear mediada por calpaínas. La estrategia seguida en este experimento fue la siguiente: a extractos nucleares control, cuyas estructuras nucleares se presuponen intactas, por no haberse iniciado la muerte celular programada; se añadió calpaína y Ca^{2+} durante 15 min a 37°C. Una posterior centrifugación, con el consiguiente análisis mediante WB de los sobrenadantes y los precipitados, muestran un incremento de Histona H3 en el sobrenadante, concomitante a una degradación de la NUP periféricas en los precipitados (núcleos residuales); cuando se trata con calpaína y Ca^{2+} (**figura 41**). Dichos experimentos confirman que, la translocación nuclear de las calpaínas en células epiteliales, puede mediar la pérdida de la selectividad del transporte nuclear gracias a la escisión proteolítica de las NUP periféricas a las 72h destete.

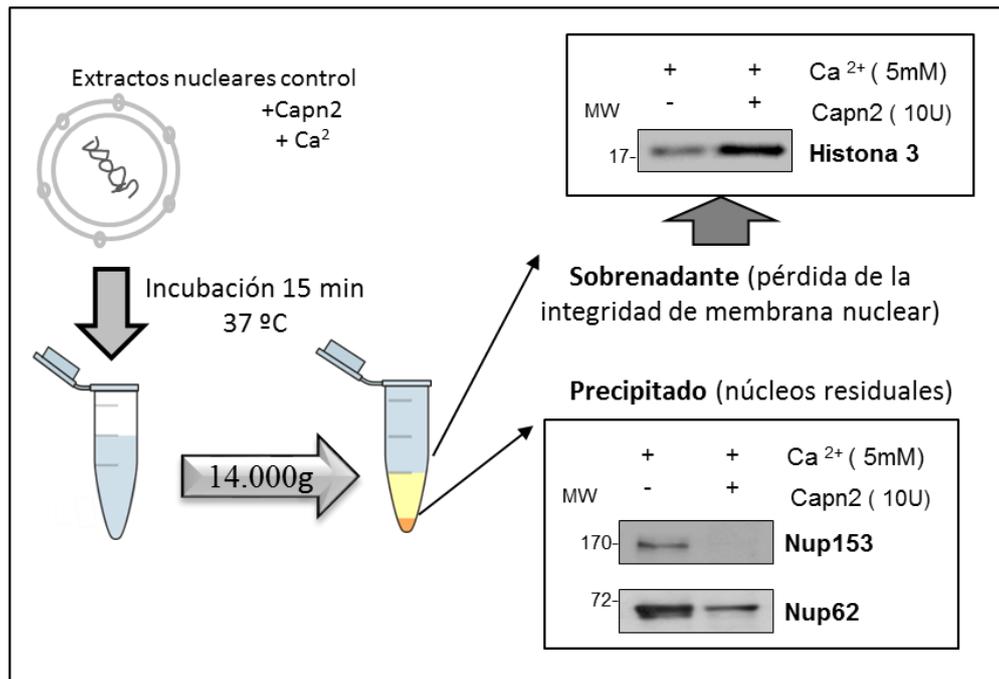


Figura 41: Liberación de Histona H3 al sobrenadante mediada por adición de calpaína sobre extractos nucleares control. Esquema representativo del experimento llevado a cabo con extractos nucleares de ratones control. La adición de r-CAPN2 y Ca²⁺ induce una liberación de Histona H3 a los sobrenadantes de las muestras tratadas, junto a una disminución de las NUP periféricas en los núcleos.

2. PAPEL DE CAPN1 EN LAS CÉLULAS DEL ESTROMA DEL TEJIDO MAMARIO.

2.1. CAPN1 ESTÁ PRESENTE EN FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN CROMATINA DE CÉLULAS ESTROMALES.

Examinando con atención las inmunofluorescencias en la que se estudiaba la localización de CAPN1 alrededor de los núcleos, en ratones tras 72h de destete, se observó que ésta no solo se encontraba en los núcleos de las células epiteliales, sino también en torno a los núcleos de células estromales (**figura 42**, puntas de flecha). El estroma mamario, que deriva fundamentalmente del mesodermo, está constituido por matriz extracelular y células estromales, las cuales pueden clasificarse a su vez en adipocitos, fibroblastos, macrófagos y células hematopoyéticas (Hennighausen & Robinson, 2005).

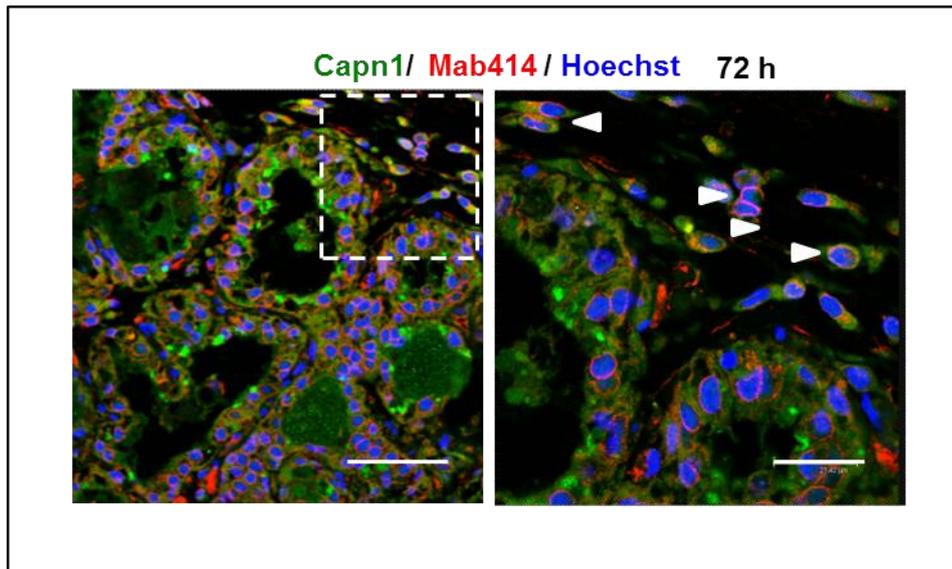


Figura 42: Inmunofluorescencia contra CAPN1 y Mab414. En ratones sometidos a un destete de 72h se detecta localización de CAPN1 en torno a núcleos de células epiteliales y estromales. Escala 37,5 μm y 20 μm , respectivamente.

A pesar de que los primeros indicios de localización nuclear de CAPN1 en células estromales se obtuvieron en ratones sometidos a 72h de destete, el posterior estudio y análisis de la función de esta proteasa en el núcleo de las células estromales, se centró en un intervalo temporal anterior (48h), ya que la estructura de la glándula mamaria, tanto epitelio como estroma, presentan una distribución más homogénea y menos colapsada. Experimentos posteriores, confirman que es más significativo desde un punto de vista funcional el papel de la CAPN1 en células estromales a 48h de destete que a 72h.

Para identificar con exactitud, qué tipo de subpoblación de células del estroma eran positivas para la localización nuclear de CAPN1, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Se utilizó la perilipina, como marcador de adipocitos, ya que se trata de una proteína que se asocia a las gotas de lípidos almacenadas en este tipo de células (Bickel *et al.* 2009). Las secciones muestran que solo en ratones destetados, la CAPN1 está presente en los núcleos de las células del estroma, que a su vez, son positivas para perilipina. Además se puede constatar que la presencia de calpaína en estas células no se limita a la periferia de la membrana nuclear, sino también parece estar presente en el interior de los núcleos (**figura 43**).

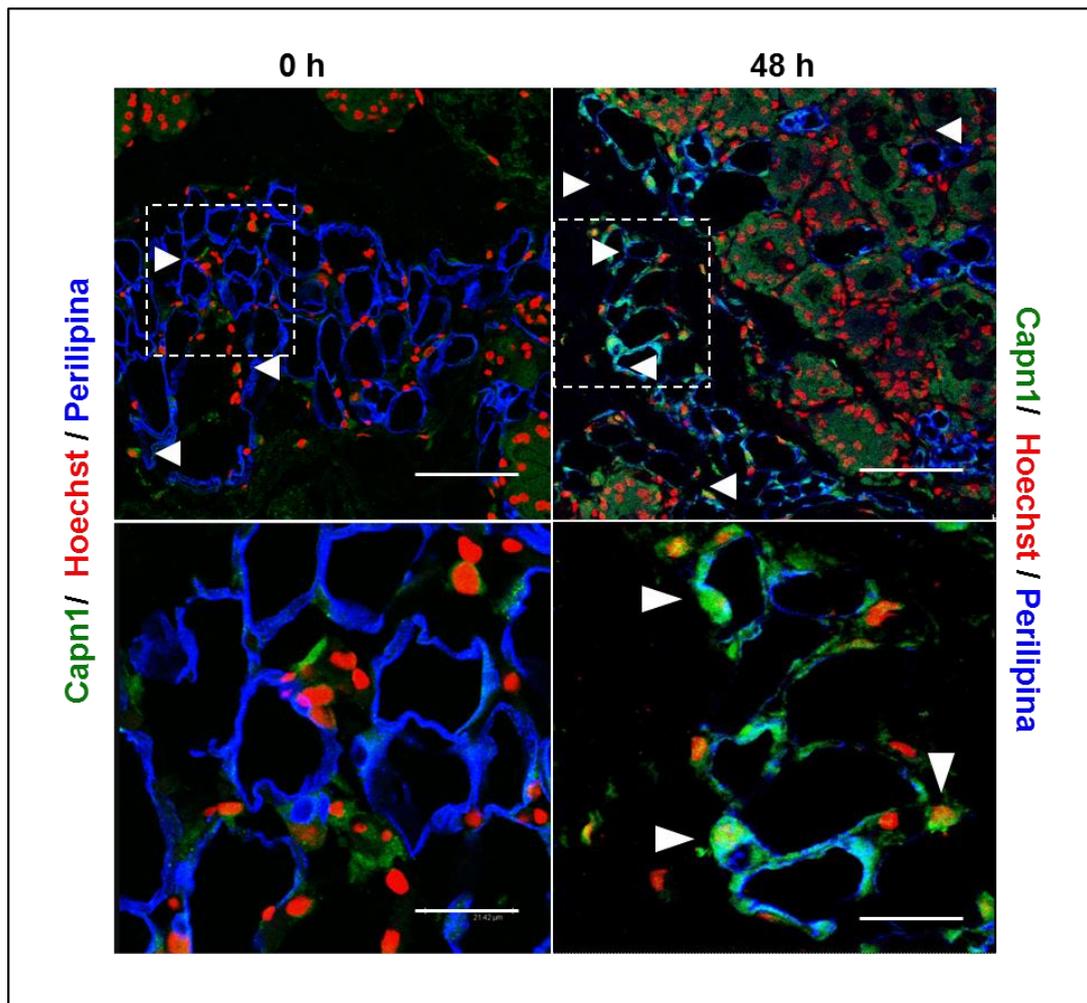


Figura 43: Inmunofluorescencias contra la CAPN1 junto con un marcador de adipocitos, la perilipina. En ratones sometidos a un destete de 48h se observa colocalización de CAPN1 en núcleos de células con señal positiva para la perilipina. Esta misma colocalización no se observa en los adipocitos de ratones control. Escala: 75 μm y 20 μm , respectivamente en las imágenes superiores e inferiores.

Como se observa en la imagen 43, CAPN1 está presente en núcleos de adipocitos de muestras de ratones hembras lactantes destetadas. La translocación de las calpaínas al núcleo como evento implicado en la diferenciación y la adipogénesis ya había sido descrito en modelos *in vitro* (Yajima *et al.* 2006). En el contexto de la involución de la glándula mamaria, la muerte celular programada del epitelio secretor acontece de forma simultánea a la repoblación del tejido adiposo mamario por los adipocitos (Resemann *et al.* 2013). De hecho, esta recolonización de la glándula con adipocitos diferenciados, empieza a ser significativa a las 48-72h de destete (**figura 44A**).

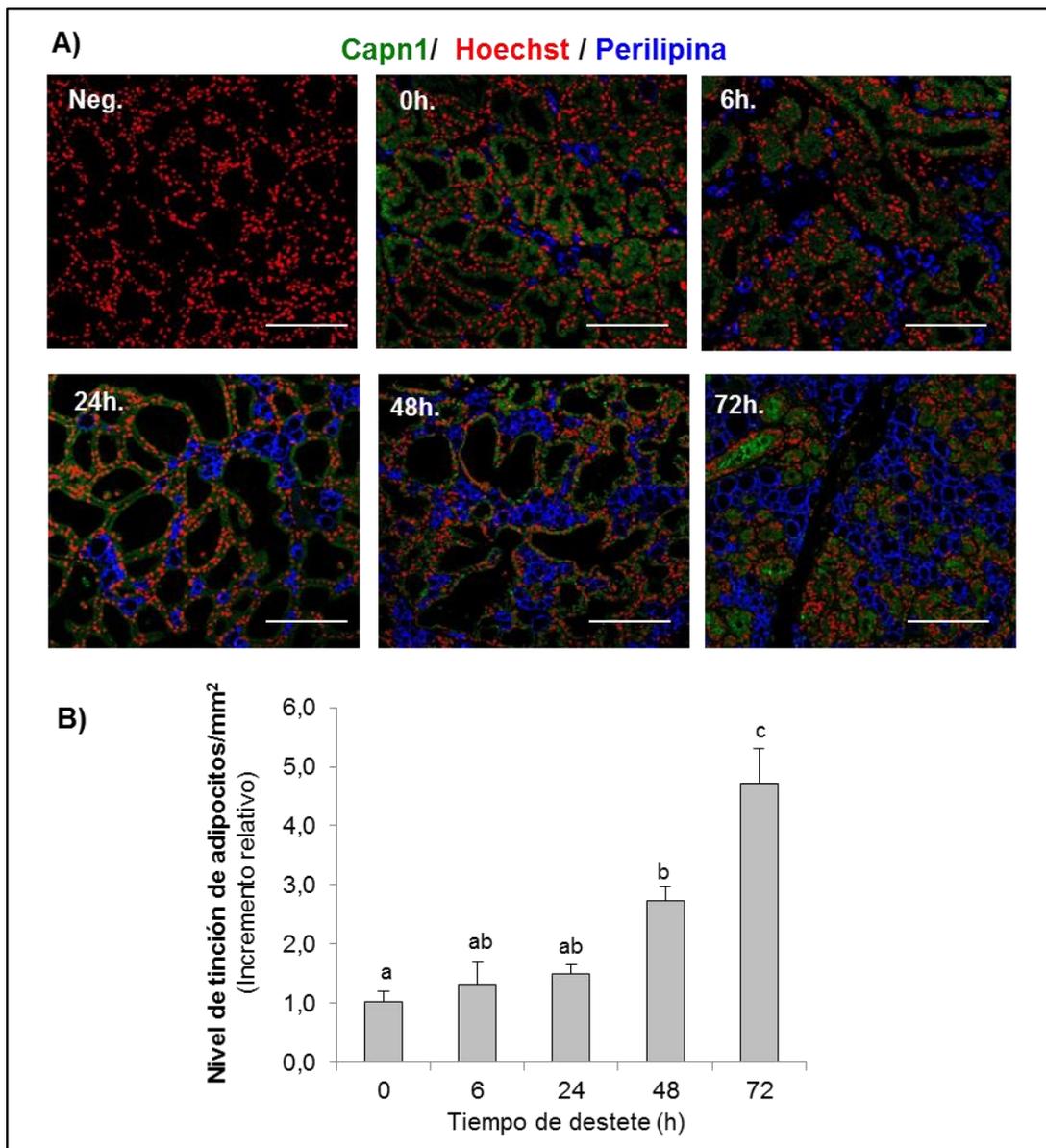


Figura 44: Repoblación de la glándula por los adipocitos. A) Inmunofluorescencias contra la CAPN1, perilipina (marcador de adipocitos) y Hoechst (marcador de núcleos) a diferentes tiempos de destete. La imagen muestra la colonización progresiva de la glándula por los adipocitos (azul). Escala 150 μm . **B)** Medida de la repoblación de la glándula por los adipocitos a lo largo de la involución con respecto al control. Se compara la intensidad de señal de la perilipina/ mm^2 en un mínimo de tres ratones por condición. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA, donde las diferentes letras indican diferencias significativas, $p < 0.05$; la letra “a” siempre indica el menor valor dentro del grupo.

La expansión de los adipocitos, cuantificada mediante el área ocupada en cada campo por la perilipina (en azul) se llevó a cabo con el software Image J. Dicho análisis muestra que, el incremento en la cantidad de adipocitos por área de tejido, empieza a ser significativo a las 48h de destete, justo en el momento en el que se observa esta localización nuclear de la calpaína (**figura 44B**). De hecho, este fue el motivo que nos llevó a seleccionar las 48 horas como tiempo idóneo para el estudio de la CAPN1 en células estromales.

Dado que en la glándula mamaria existen numerosos procesos de secreción de proteasas a la matriz extracelular, con el fin de alcanzar el remodelado postlactancia (Green *et al.* 2005), nuestro siguiente objetivo fue determinar la procedencia de esta CAPN1 detectada en los núcleos de adipocitos a las 48h de involución. Para esto, se midieron niveles de mRNA en fracciones de adipocitos extraídas a diferentes tiempos de destete mediante RT-qPCR. Dicho análisis mostró que los niveles de CAPN1 se incrementaban en adipocitos conforme transcurría el destete (**figura 45A**), confirmando la idea de que no se trata de una proteasa secretada al medio por las células epiteliales adyacentes, sino expresada directamente por los adipocitos.

Una vez confirmada la procedencia, se decidió indagar en el nivel de activación de la misma, mediante la detección del extremo amino en extractos de adipocitos. Como puede observarse en la **figura 45B**, tanto la CAPN1 de los extractos totales como de las fracciones de adipocitos, pierde su extremo aminoterminal a medida que avanza la involución, demostrando su activación en los dos tipos celulares.

Por otro lado, con el fin de examinar que efectivamente CAPN1 presentaba una función completamente diferente a la observada en las células epiteliales, se realizaron inmunoblots contra NUP periféricas. Dichos experimentos muestran una clara degradación de nucleoporinas (como previamente se ha descrito) en los extractos totales; mientras que en los extractos de adipocitos, dicha rotura no se observa (**figura 45C**). A la vista de estos resultados se podría sugerir que la CAPN1 presenta una función diferente en las células adipocíticas, a la que presenta en las células epiteliales.

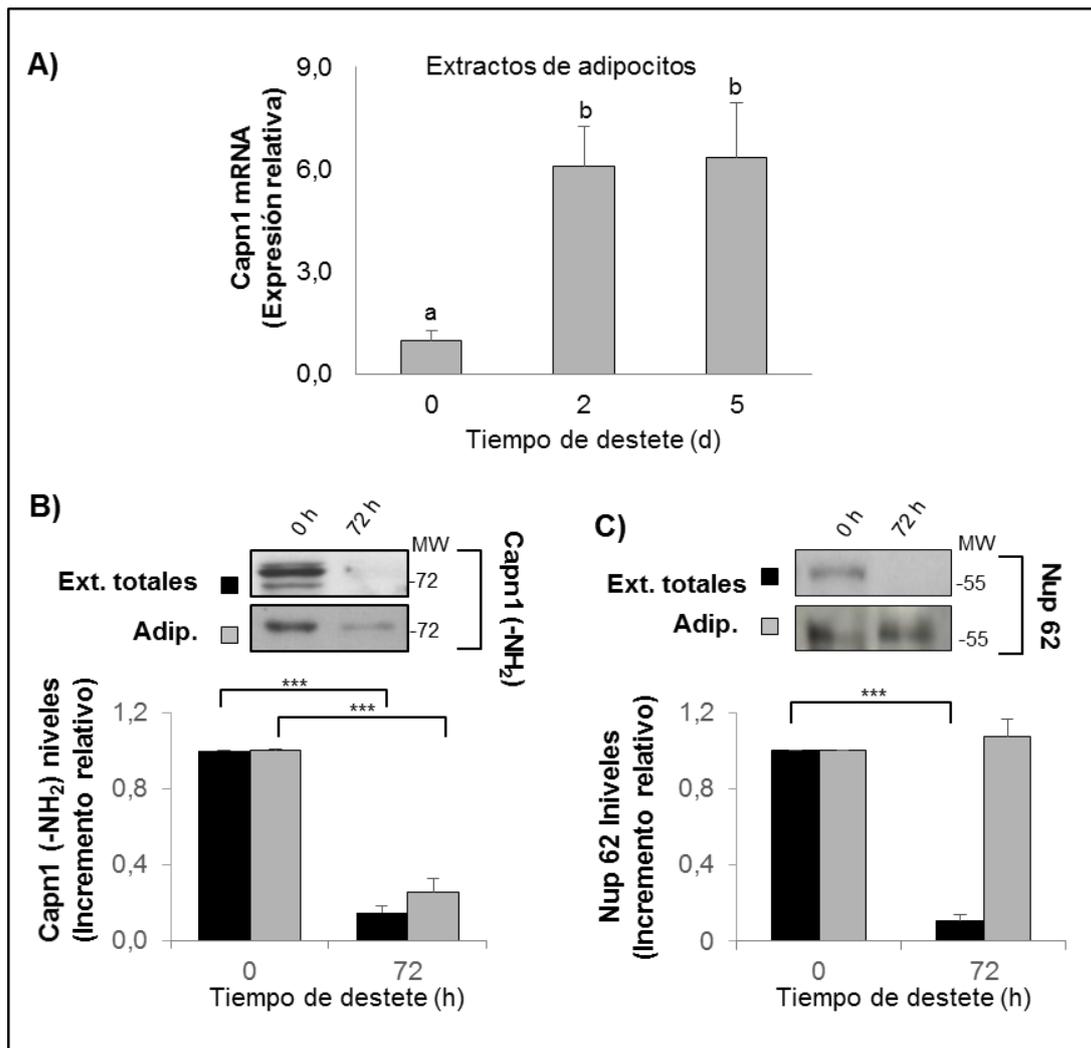


Figura 45: Niveles de expresión y de activación de CAPN1 en extractos de adipocitos control (0h), 2 y 5 días de involución. A) Mediante RT-qPCR. Se determinaron niveles de mRNA de Capn1 en extractos de adipocitos a diferentes tiempos de destete. Los valores se normalizaron usando como housekeeping IPO8. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA, donde las diferentes letras indican diferencias significativas, $p < 0.05$; la letra “a” siempre indica el menor valor dentro del grupo. B) Niveles de activación de CAPN1 en extractos de adipocitos control (0h), 2 y 5 días de involución mediante WB. El T-test se realizó para el análisis estadístico de Nup 62 donde * $p < 0,001$ 0h vs 72h en los extractos totales. C) Niveles de Nup62 en extractos totales y de adipocitos en ratones control (0h) y 72 horas de destete. El T-test se realizó para el análisis estadístico de Nup 62 donde *** $p < 0,001$ 0h vs 72h en los extractos totales.**

2.2. CAPN1 COLOCALIZA CON HISTONA H3 EN ADIPOCITOS DURANTE LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

El hecho de que la calpaína no se limitara solo a la región periférica del núcleo, nos hizo plantearnos si ésta podía estar asociada con alguna proteína estructural o reguladora de la cromatina. Para poder comprobar que efectivamente CAPN1 estaba interaccionando con alguna proteína cromatínica en núcleos de ratones destetados, se aislaron extractos enriquecidos en proteínas cromatínicas partiendo de la fracción nuclear insoluble. Dicha fracción se lavó con sucesivas centrifugaciones y tras la sonicación del precipitado, se obtuvieron extractos enriquecidos en proteínas ligadas a la cromatina (Wysocka *et al.* 2001). En los WB de este fraccionamiento subnuclear, se puede distinguir la presencia de CAPN1 en fracciones cromatínicas a las 48h de destete, hecho que no se cumple ni para la CAPN2, ni para ninguna de las dos calpaínas en las condiciones control (0h). La validez del protocolo de fraccionamiento subnuclear se determinó mediante la presencia mayoritaria de Histona H3 en las fracciones enriquecidas en cromatina (Cr), mientras que en los extractos control también se puede distinguir una mayor cantidad de NUP periféricas en la fracción nuclear soluble (N) (**figura 46**).

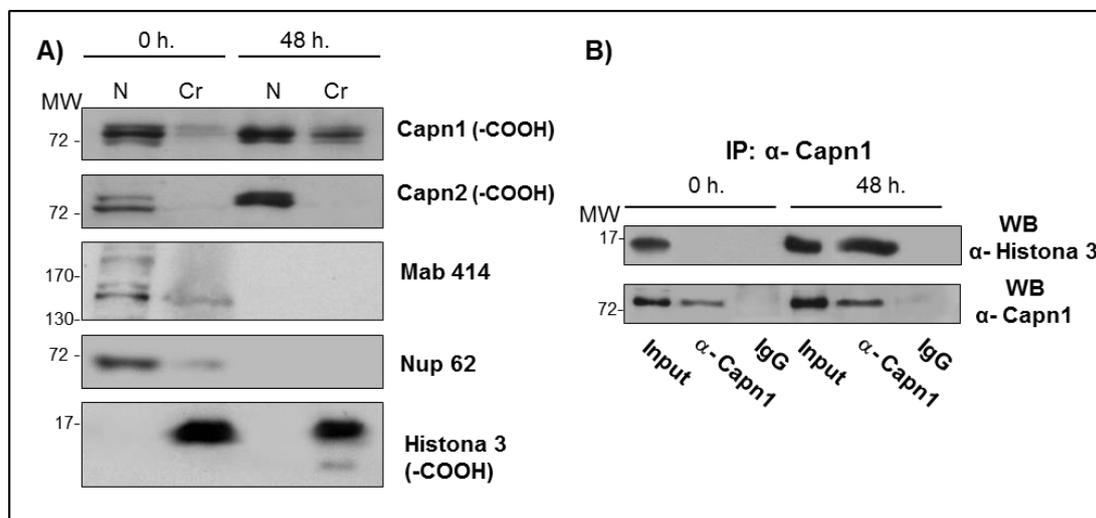


Figura 46: *Immunoblots en extractos nucleares solubles (N) y enriquecidos en cromatina (Cr), de ratones control (0h) y de 48h de destete. A) Se ha analizado la presencia y niveles de CAPN1 y CAPN2. NUP periféricas (Mab414 y Nup 62) e Histona H3, se han usado como marcadores de fracción nuclear y enriquecida en cromatina, respectivamente. B) Inmunoprecipitación contra CAPN1 en extractos*

nucleares. El Western Blot se realiza contra la Histona H3 y Capn1. Un 1% de la muestra inicial es cargada como Input.

Comprobada la interacción de la calpaína con la cromatina, bien de forma directa o indirecta; se decidió realizar una inmunoprecipitación con CAPN1 seguido de WB contra Histona H3. En este caso, se observa que a las 48h de destete (**figura 46A**), la CAPN1 inmunoprecipitada se encuentra interaccionando con la Histona H3 (**figura 46B**), mientras que esta interacción no se observa en los ratones control. El resultado se confirmó por inmunofluorescencia, usando anticuerpos contra ambas proteínas. La colocalización de CAPN1 con Histona H3, se detecta fundamentalmente en los núcleos de células con una morfología clásica de adipocito: núcleo excéntrico desplazado del centro celular por la presencia de una gran vacuola de lípidos. Las imágenes de las inmunofluorescencias muestran a los adipocitos como, células huecas con el citoplasma y el núcleo formando una banda estrecha en las proximidades de la membrana citoplasmática. Ello es debido a que, los lípidos que se almacenan en las vacuolas de grasa son eliminados con los solventes orgánicos (como el xileno) empleados en el procesamiento del tejido, para su tinción con los anticuerpos correspondientes (**figura 47, puntas de flecha**).

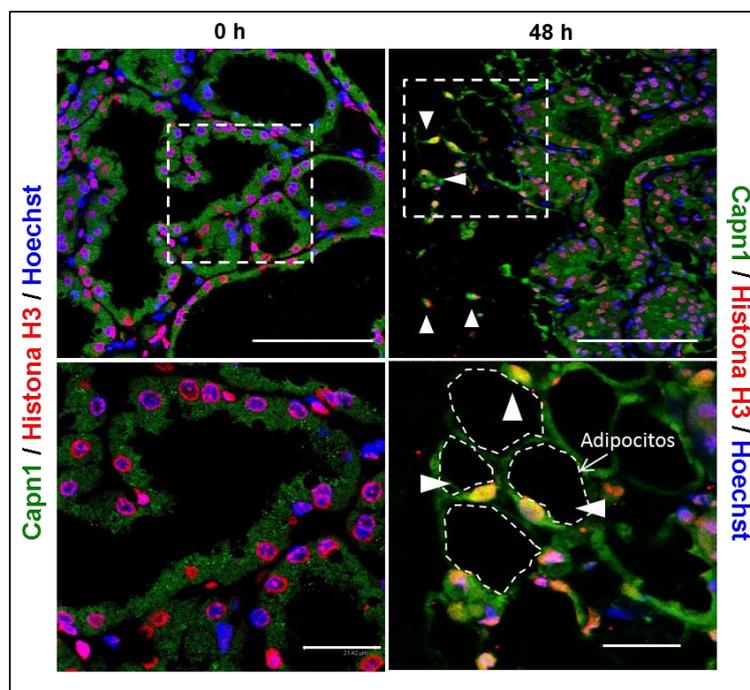


Figura 47: Localización de CAPN1 en núcleos de células con morfología de adipocito. Inmunofluorescencias contra CAPN1 e Histona H3 en secciones de glándula mamaria lactante (0h) y tras 48h de destete. Destacar la colocalización de ambos

anticuerpos en el núcleo de las células con una morfología típica de adipocito a las 48h de destete (puntas de flecha). Escala: 75 y 20 μm , en los paneles superiores e inferiores respectivamente.

Los resultados anteriores parecen confirmar una especificidad de colocalización en adipocitos y no en células epiteliales. Con el fin de confirmar esta idea, se analizó también la localización de las dos proteínas en células apoptóticas, que han sido liberadas al lumen acinar durante el destete. Para esto, se realizaron inmunofluorescencias y no se observó colocalización de CAPN1 con Histona H3 en los núcleos de las células apoptóticas, confirmando esta especificidad de interacción CAPN1-Histona H3 solo en adipocitos (**figura 48**).

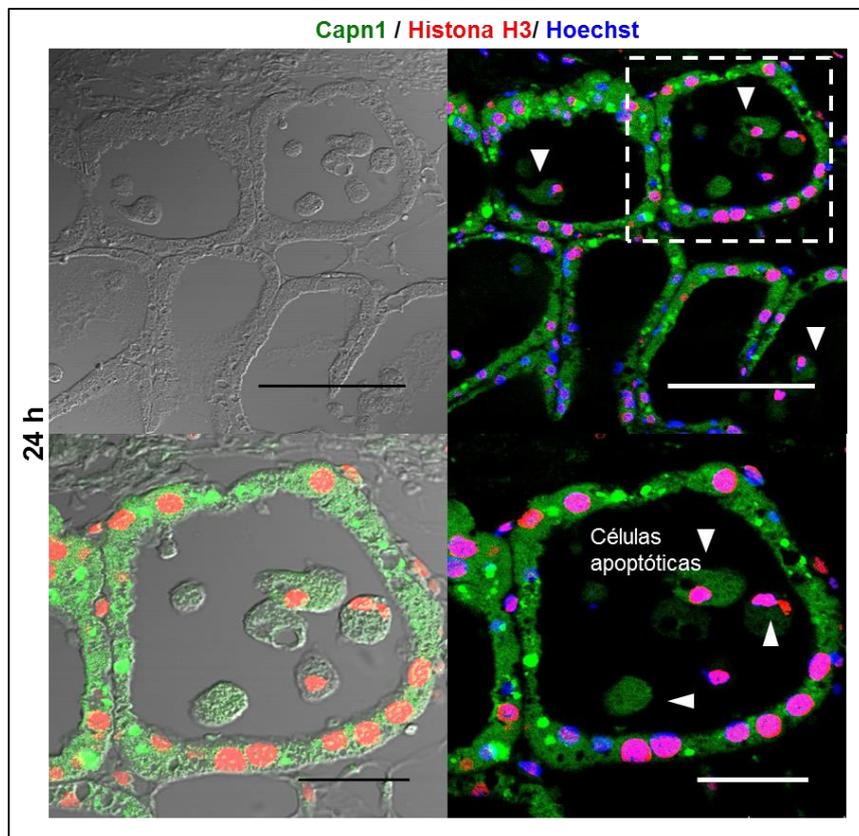


Figura 48: Localización de CAPN1 en células apoptóticas liberadas al lumen de los acini. Inmunofluorescencias contra CAPN1 e Histona H3 en secciones de tejido control lactante (0h) y de 24h de destete. Nótese la presencia de células apoptóticas en el interior del lumen de los acini. Escala: 75 y 20 μm en los paneles superiores e inferiores respectivamente.

2.3. CAPN1 MEDIA LA ESCISIÓN DEL EXTREMO N-TERMINAL DE LA HISTONA H3 *IN VIVO* E *IN VITRO*.

A la vista de la posible interacción entre CAPN1 e Histona H3 se decidió evaluar tanto los niveles de Histona H3, como las diferentes marcas epigenéticas de esta histona a lo largo del destete. Cuando se determinó por WB los niveles de Histona H3, usando un anticuerpo que reconoce el extremo amino- y carboxiterminal de esta histona, se encontró que a partir de las 48h de destete la Histona H3 sufría un procesamiento proteolítico, observándose en el WB una banda de menor peso molecular (Histona H3 truncada, H3^t), capaz de migrar más rápido en el gel. Dicha variante, es detectada únicamente por el anticuerpo contra el extremo carboxiterminal, y no por el anticuerpo generado contra el extremo amino. Este reconocimiento diferencial entre los dos anticuerpos de H3, señala una posible pérdida del extremo amino de la histona. En este sentido, ya había sido descrito en diferentes modelos *in vitro* una proteólisis similar del extremo amino de la Histona H3 por determinadas proteasas, entre ellas la catepsina L (Duncan *et al.* 2008; Mandal *et al.* 2012).

De hecho, cuando se analizan marcas epigenéticas de la histona ubicadas en diferentes posiciones (lisina 4, lisina 27, etc) con respecto al extremo amino, se confirma la idea de este procesamiento proteolítico del extremo amino. El anticuerpo contra la trimetilación en la lisina de la posición 4 no reconoce la H3^t, porque a esta altura el extremo amino ya ha sido escindido. Sin embargo, al usar un anticuerpo que reconoce la trimetilación en la lisina 27, ubicada en una posición posterior con respecto al sitio de corte, sí que se observa la H3^t (**figura 49A**). Estos resultados, junto con los que presentan una interacción de Histona H3 con CAPN1 (**figura 46B y 47**), apuntan a una posible proteólisis de Histona H3 por CAPN1.

La utilización de inhibidores específicos de CAPN1 sobre ratones destetados, en los que se observa la presencia de la forma truncada de la histona H3 (H3^t), demostró que esa rotura está provocada *in vivo* de forma específica por CAPN1. La inhibición *in vivo* mediante *siRNA Capn1*, redujo los niveles de CAPN1 y a su vez la proteólisis de la Histona H3. Por otro lado, con el uso de calpeptina, la cual inhibe la activación de CAPN1, observamos también una menor cantidad de H3^t (**figura**

49B y 49C). Como marcador de carga, se ha utilizado el anticuerpo de la Histona H3 que reconoce el extremo amino, ya perdido en la variante.

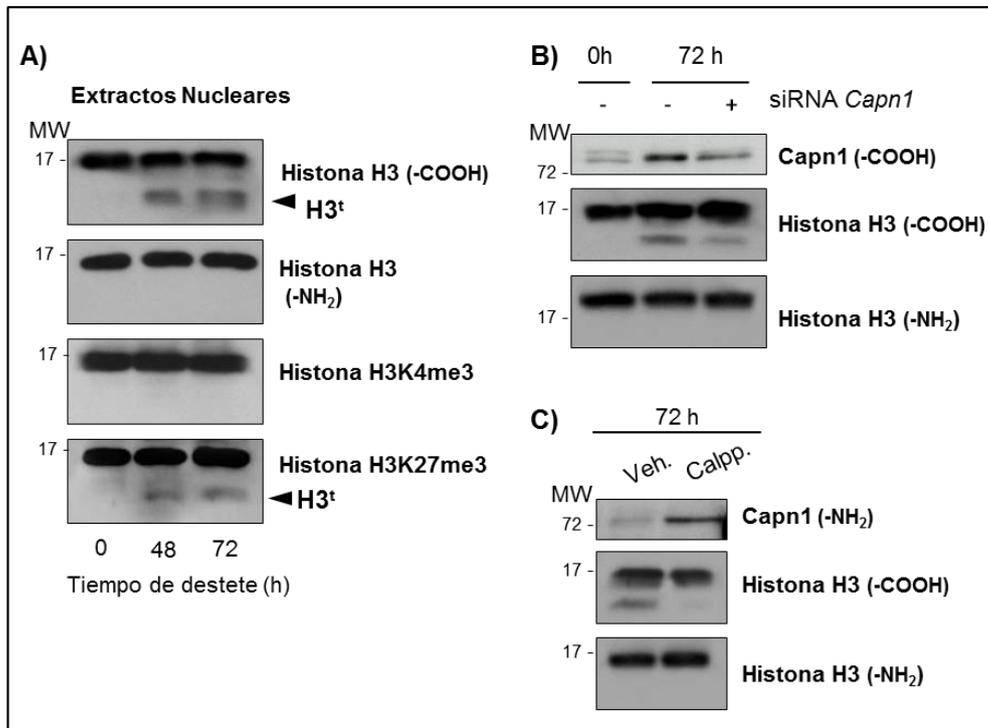


Figura 49: Niveles proteicos de Histona H3 y de varias modificaciones de la misma a lo largo del destete y en los experimentos de inhibición de calpaínas. A) Immunoblots contra diferentes epítotos y variantes postraduccionales de la Histona H3 en secciones de tejido control lactante (0h) y de 48 y 72h de destete. Cabe señalar la presencia de H3^t de menor peso molecular que aparece en torno a las 48h y que es reconocida solo por los anticuerpos contra el extremo carboxi y el H3K27me3. B) y C) Western blots resultantes de la inhibición *in vivo* tanto de la expresión (siRNA) y de la activación de CAPN1 (calpeptin), respectivamente. La igualdad de carga se confirma mediante el uso del anticuerpo de la Histona H3 que reconoce el extremo amino.

Para comprobar esta especificidad de rotura, y confirmar la proteólisis directa de la Histona H3 por la CAPN1, se realizó un experimento *in vitro* con ambas proteínas recombinantes. La electroforesis de estas muestras en un gel de poliacrilamida, revela que cuando las dos proteínas se incuban conjuntamente, parte de la Histona H3 sufre una degradación (figura 50A). Para comprobar que efectivamente esta H3^t (marcada con un asterisco) se corresponde al fragmento de la Histona H3 observado *in vivo*, se separó la banda del gel y se identificó mediante

proteómica. El resultado de dicho análisis identificó la banda escindida como Histona H3 (cobertura de 12% y Z-score de 33,4).

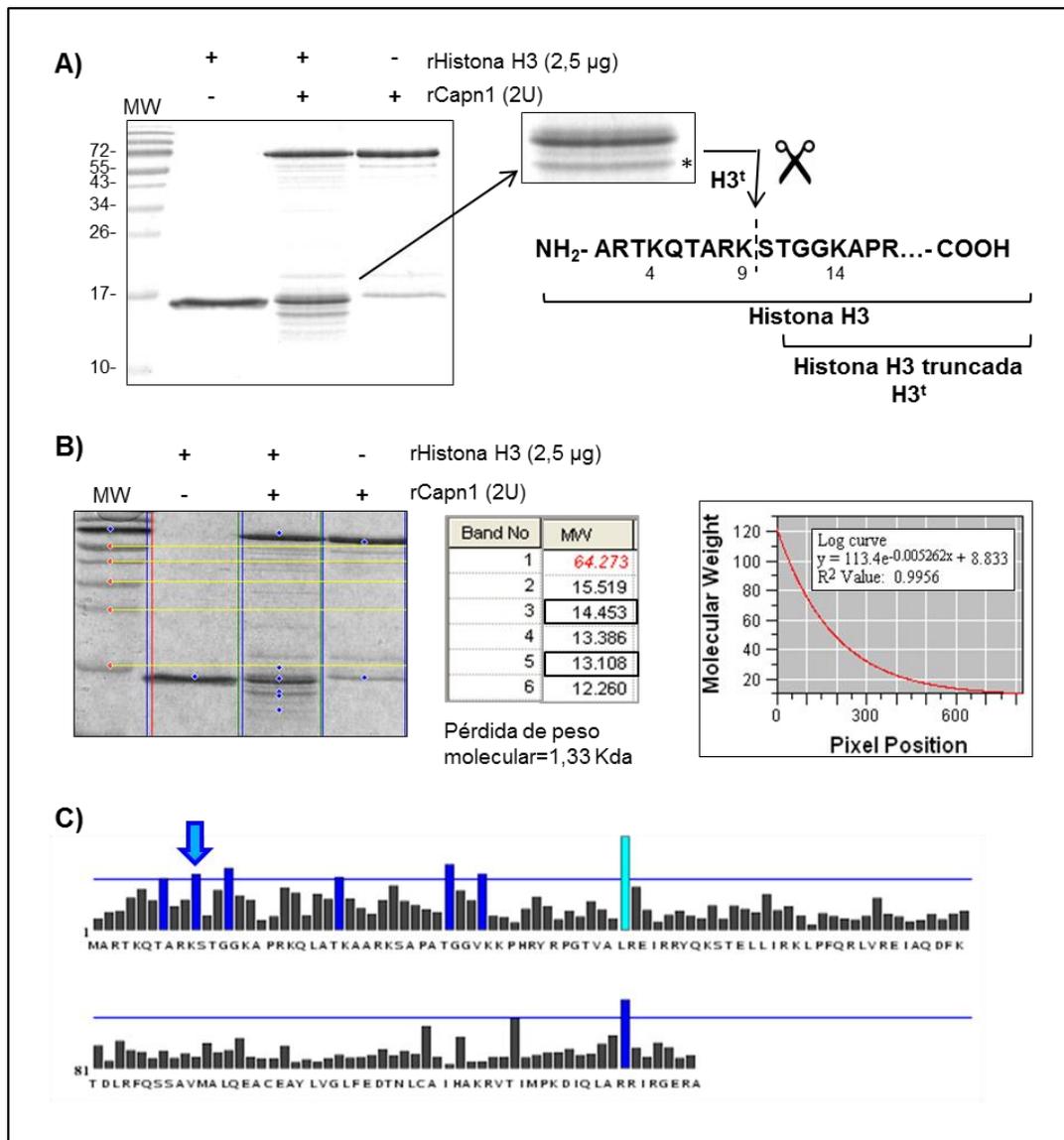


Figura 50: Experimento con CAPN1 e Histona H3 recombinante. Análisis del punto de corte mediante extrapolación del peso molecular y el uso de un método informático de predicción. A) Coomassie resultante de la incubación de CAPN1 e Histona H3 recombinante. Representación del posible sitio de corte calculado a partir de un análisis de los pesos moleculares. **B)** Análisis de los pesos moleculares de la Histona H3 truncada, a partir del coomassie presentado en la figura 50A. Utilizando el Software ImageQuant TL, se ajustó el patrón de pesos moleculares a una curva logarítmica, a partir de la cual se extrapolan los pesos moleculares de las bandas. La pérdida de 1,33 Kda de la proteína corresponde aproximadamente a los 10 primeros aminoácidos según

la aplicación *EnCor Biotechnology*. **C)** Probabilidad de corte para cada una de las posiciones de la Histona H3 por la CAPN1. Representación de la puntuación obtenida para cada una de las posiciones posibles de punto de corte para la Histona H3 (*M. Musculus*), según el método de predicción basado en los *Multiple Kernel Learning algorithms* (DuVerle et al. 2011). La posición marcada con flecha azul (puntuación de 0,14), coincide con la teórica calculada mediante nuestra aproximación de pesos moleculares. La barra en azul claro, muestra la posición con una puntuación más alta, pero no indica que sea la observada en nuestro contexto.

Con el fin de predecir el sitio de escisión más probable, se llevó a cabo un análisis de comparación de pesos moleculares, como viene descrito en material y métodos. El resultado de dicho estudio prevé que el posible sitio de escisión de la Histona H3 sea en la extremo N-terminal, alrededor de la lisina 9 y la serina en posición 10 (K9-S10), residuos que son altamente conservados entre especies (**figura 50B**). Utilizando el método de predicción basado en los *Multiple Kernel Learning algorithms* también se señala esta posición como una de las probables o susceptibles a ser proteolizada por calpaína (puntuación de 0,14) (**figura 50C**). Esta predicción podría explicar por qué el fragmento no se puede observar cuando se utiliza el anticuerpo que reconoce metilaciones en posición 4, y sí que se observa cuando se usa el anticuerpo que reconoce metilaciones en posición 27 (**figura 49A**). Este fragmento de la Histona H3 obtenido en los experimentos con proteínas recombinantes *in vitro*, es el mismo que el que se observa *in vivo* durante la involución de la glándula mamaria.

Además, se realizaron experimentos *in vitro* adicionales para confirmar esta proteólisis de la Histona H3 por CAPN1. Por un lado, partiendo de extractos nucleares aislados de ratones lactantes control (0h) o de 48h de destete, se añadió rH3. Tras la incubación, las muestras se sometieron a WB. Como puede verse en la **figura 51A**, en los extractos nucleares control, donde las calpaínas no están activas no se proteoliza la histona H3. Sin embargo, si se añade rH3 a las muestras de 48h de destete cuando las calpaínas ya están activas, se induce un incremento de la H3^f. La adición de calpeptina, el inhibidor específico de calpaínas, a los extractos a los que previamente se les había añadido rH3, previene el incremento en la

fragmentación de la Histona H3. Resultados similares se obtienen con extractos nucleares a partir de muestras de 72h de destete (**figura 51B**).

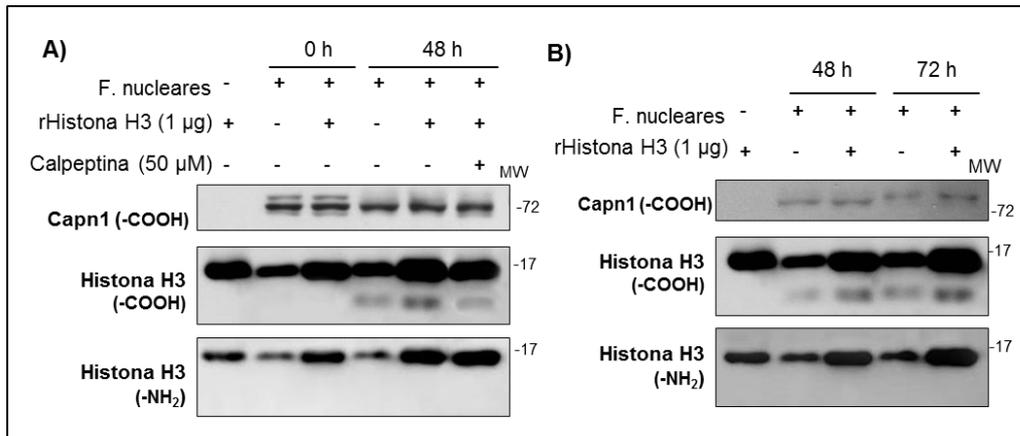


Figura 51: Escisión de la Histona H3 recombinante en extractos nucleares de 0 y 48h de destete. A) Inmunoblots de extractos nucleares contra CAPN1 e Histona H3 (diferentes epítotos) en ratones control (0h) y de 48h de destete. La adición de rH3 a los extractos de 48h aumenta la H3', mientras que la adición de calpeptina hace disminuir este aumento de la forma truncada a niveles basales. **B)** de destete. Inmunoblots de extractos nucleares contra CAPN1 e Histona H3 (diferentes epítotos) en ratones de 48 y de 72h de destete.

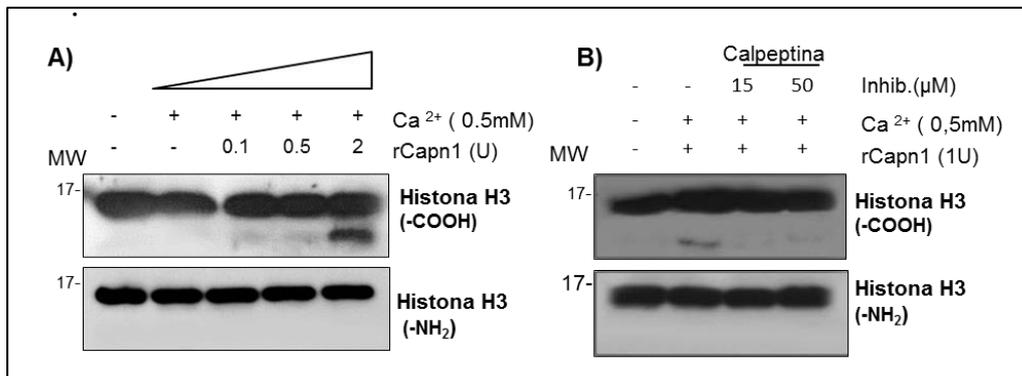


Figura 52: Escisión dosis dependiente y específica de la Histona H3 por r-CAPN1. A) Inmunoblots de extractos nucleares contra el extremo carboxi- y aminoterminal de la Histona H3 en ratones control (0h) tratados con dosis crecientes (0.1, 0.5 y 2 U) de rCAPN1 y Ca²⁺ (0.5 mM). **B)** Inhibición in vitro de la proteólisis de la Histona H3 por r-CAPN1. Western Blots de extractos nucleares contra el extremo carboxi- y aminoterminal de la Histona H3 en ratones control (0h) tratados con 1 U de rCAPN1, Ca²⁺ (0.5 mM) y/o calpeptin (15, 50 μM).

Del mismo modo, la adición de dosis crecientes de rCAPN1 a extractos nucleares de glándulas lactantes control, induce de forma proporcional la aparición de H3ⁱ (**figura 52A**). Como en todos los casos anteriores, la adición de calpeptina a estos extractos nucleares bloquea esta escisión (**figura 52B**). Todos estos experimentos realizados *in vitro* proporcionan pruebas concluyentes que confirman la especificidad de la rotura de la Histona H3 por CAPN1.

2.4. CAPN1 PODRÍA PARTICIPAR EN LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL DE LOS ADIPOCITOS.

Analizando los resultados, se puede llegar a relacionar la posible función y/o consecuencia biológica de esta escisión de la Histona H3 por la CAPN1 en adipocitos de ratones destetados. Dicha conexión se establece gracias al hecho de que el procesamiento proteolítico de la histona H3 por CAPN1 en células adipocíticas a las 48h de destete, aparece justo cuando comienza la fase de la repoblación de la glándula mamaria por los adipocitos.

En este sentido, durante la diferenciación de adipocitos algunos genes que deben ser expresados se repositionan desde la periferia nuclear hacia el interior nuclear, coincidiendo con el inicio de su transcripción (Musri *et al.* 2010). Se ha especulado que las modificaciones de histonas y la distribución nuclear, cooperan para modular la transcripción de genes adipogénicos (Geyer *et al.* 2011). Teniendo en cuenta estos estudios, pensamos que la escisión de la Histona H3 mediada por CAPN1, podría estar implicada en la activación de la expresión de genes necesarios para la diferenciación de los adipocitos.

En primer lugar, para comprobar si este efecto tenía un papel global sobre toda la estructura de la cromatina en los adipocitos, se estudió la posible colocalización de CAPN1 con diferentes marcas epigénéticas de la Histona H3 mediante ensayos de inmunofluorescencia. Por un lado, se estudió una de las marcas por excelencia en los procesos activadores de la transcripción, la trimetilación en la lisina 4 (H3K4me3). En este caso, se observó un patrón periférico muy intenso que coincidía con la señal de la CAPN1 en los adipocitos a 48h de destete (**figura 53A**). Por otro lado, se evaluó otra marca epigénética, típica de genes que presentan una

expresión facultativa, la trimetilación en la lisina 27 (H3K27me3). Cuando se observaron las imágenes obtenidas para el anticuerpo contra H3K27me3, se distingue una distribución más difusa por todo el compartimento nuclear, mostrándose la colocalización con CAPN1 solo en la periferia (**figura 53B**).

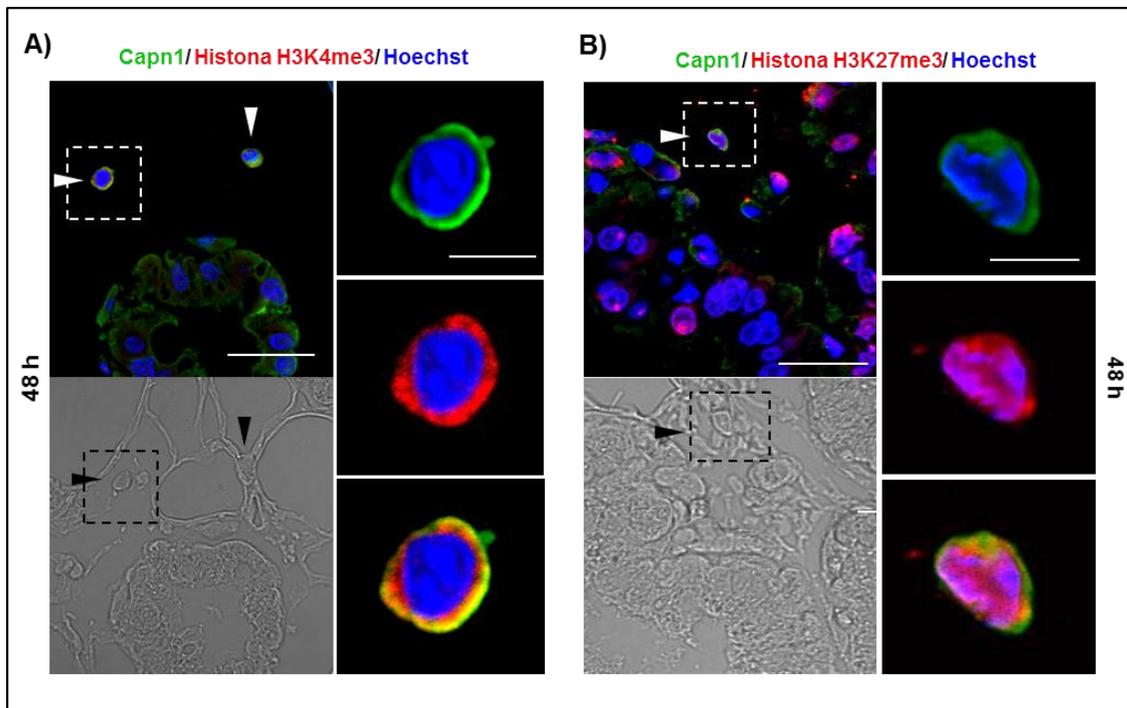


Figura 53: Localización de CAPN1 y diferentes marcas epigenéticas de la Histona H3 (H3K4me3 y H3K27me3). Inmunofluorescencias contra CAPN1 y la histona H3 con los siguiente patrón de metilación, H3K4me3 (A) y H3K27me3 (B) en secciones de tejido de 48h de destete. Escala: 40 y 10 μm en los paneles sin ampliación y con ampliación respectivamente.

Ya a un nivel más concreto, con el objetivo de determinar si CAPN1 estaba implicada en la expresión de genes adipogénicos se llevó a cabo una inmunoprecipitación de cromatina con CAPN1. Se detectó la presencia de esta proteasa en los promotores de varios genes adipogénicos, implicados en la diferenciación de los adipocitos (*CEBP α*) y en la adquisición del fenotipo del adipocito (*leptina*) a las 48h del destete. Sin embargo, CAPN1 no fue detectada en los promotores de genes implicados en otra clase de procesos, como la MBP (*Myelin Basic protein*) encargada de aumentar la conducción del impulso nervioso (**figura 54A y 54B**). Por otra parte, cuando se analizan los niveles de mRNA de estos genes adipogénicos, se observa un aumento de la expresión de estos durante el proceso de

diferenciación, en comparación con el pico de lactancia (**figura 54C**). Sugiriendo esta posible activación transcripcional mediada de forma directa o indirecta por CAPN1.

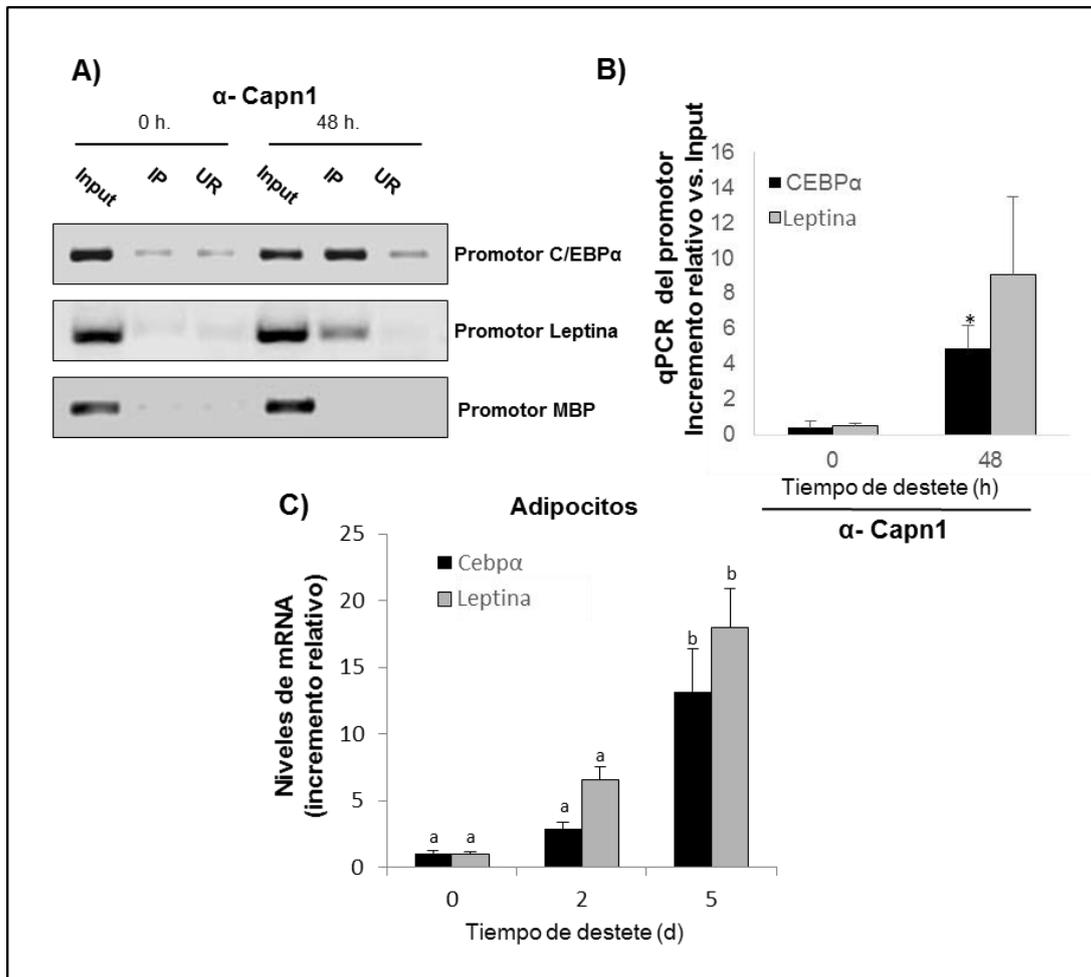


Figura 54: CAPN1 está presente en promotores de genes adipogénicos y nivel de expresión de los mismos durante el destete. **A)** PCR semicuantitativas resultantes del ChIP contra CAPN1 en ratones control y de 48h de destete. Se han analizado los promotores de dos genes adipogénicos, y un gen no relacionado: MBP, la proteína básica de mielina. **B)** PCR cuantitativa de los mismos promotores utilizando los mismos inmunoprecipitados. El análisis estadístico se llevó a cabo con el test *t*-Student, donde $*p < 0.05$. **C)** Niveles de expresión de CEBP α y leptina en muestras de adipocitos a diferentes tiempos de destete. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA, donde las diferentes letras indican diferencias significativas, $p < 0.05$; la letra “a” siempre indica el menor valor dentro del grupo.

Por tanto, todos estos experimentos apuntan a una posible relación de la CAPN1 en la diferenciación de los adipocitos, a través de la proteólisis de la Histona H3. Dicha proteólisis puede entenderse como una forma potencial de regulación de la estructura de la cromatina en los promotores de genes adipogénicos, ya que podría suponer la eliminación de marcas epigenéticas represivas sobre genes de diferenciación, o la prevención de nuevas marcas activadoras sobre genes implicados en la pluripotencia.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. LA GLÁNDULA MAMARIA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

La glándula mamaria es un tejido muy dinámico y altamente especializado. Su desarrollo tiene lugar principalmente después del nacimiento y su etapa más diferenciada solo se alcanza durante el embarazo y la lactancia (Watson *et al.* 2008). Gracias a los procesos de proliferación y diferenciación que tienen lugar durante el embarazo, el epitelio ductal y alveolar pasa a adquirir un fenotipo secretor. Cuando termina la lactancia, se produce la muerte celular programada de este epitelio, que junto con una remodelación tisular de la matriz y la proliferación y diferenciación de los adipocitos, devuelven la glándula a su arquitectura pregestacional. Este conjunto de procesos simultáneos, es lo que se conoce como regresión postlactancia o involución de la glándula mamaria (Stein *et al.* 2007). La muerte celular del epitelio secretor está regulada por numerosas vías de señalización como STAT3, NF- κ B, LIF, TGF β ; así como numerosas proteasas: caspasas, metaloproteasas, calpaínas etc. Nuestro grupo se propuso estudiar la vía de NF- κ B a través de la identificación de sus dianas génicas mediante la técnica de CHIP/chip, y observó que la expresión de las calpaínas estaba modulada por este factor de transcripción (Torres *et al.* 2011).

La acumulación de Ca²⁺ intracelular es una de las primeras consecuencias observadas a lo largo de la involución mamaria y se debe a varios factores. El primero y más importante es la acumulación de leche en el lumen de los acini por la falta de succión por parte de las crías (Reinhardt *et al.* 2004). Otro factor también importante, es la disminución de la expresión de *Pmca2*, una de las principales bombas que secretan Ca²⁺ del interior celular al lumen de los alveolos. Por este motivo, entre todos los genes modulados por NF- κ B a las 48 horas de destete, decidimos centrarnos en las calpaínas, ya que al tratarse de proteasas calcio-dependientes, su actividad estaría aumentada por este incremento del Ca²⁺ intracelular. De hecho, cuando se determinaron los niveles de actividad de las mismas en extractos proteicos totales de glándula mamaria, se observó un incremento significativo a partir de las 48 horas de involución (Arnandis *et al.* 2012).

Dado que la involución es un excelente modelo para el estudio de la muerte celular programada, la apoptosis, la autofagia y otros procesos involucrados en la retirada de las células epiteliales productoras de leche, se decidió investigar la posible implicación de las calpaínas en este proceso de MCP. Nuestro grupo ya describió un incremento de la activación de las catepsinas a lo largo de la involución (Zaragoza *et al.* 2009), lo que llevó a pensar, que los lisosomas podrían jugar un papel esencial en la muerte celular programada de las células epiteliales. En este sentido, recientemente Kreuzaler *et al.* demostraron que la liberación del contenido lisosomal constituye uno de los estímulos iniciadores de la cascada de muerte, confiriendo una morfología peculiar a las células liberadas al lumen de los acini (Kreuzaler *et al.* 2011). Por tanto, el primer de los objetivos fue descubrir si las calpaínas mediaban de algún modo esta desestabilización lisosomal. Para ello, se identificaron diferentes dianas lisosomales susceptibles de ser procesadas por calpaínas, potencialmente implicadas en la desestabilización de la membrana de este orgánulo.

1. 1. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL LISOSOMA

La vía de apoptosis clásica implica siempre una disminución del tamaño celular, agrupación de orgánulos, condensación de la cromatina en masas densas bien definidas y formación de cuerpos apoptóticos (Kanzler *et al.* 2000). Por otro lado, la necrosis se caracteriza por incremento del volumen celular, seguido de incapacidad de mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático al medio. En este sentido, en la involución de la glándula mamaria, se han observado rasgos de un tipo especial de MCP, puesto que las células que son liberadas de la pared alveolar a las pocas horas del destete presentan: dos núcleos hipercondensados (los cuales sugieren un fallo en la citocinesis más que una fragmentación del núcleo en dos partes idénticas), hinchazón (en contraste con la contracción de la membrana y la densificación del citoplasma) y ausencia de formación de vesículas, por tanto, ausencia de cuerpos apoptóticos. Dado que las características de este tipo especial de muerte, no viene definidas por ningún programa específico de muerte celular y constituyen una combinación de características morfológicas de la apoptosis y la necrosis, decidió definirse la involución como un programa de muerte necroptótica (Watson *et al.* 2009).

De ahí que en el contexto de la involución de la glándula mamaria, más allá de los factores típicos iniciadores de la cascada apoptótica clásica (ligandos de muerte, daño en el DNA o estrés en el retículo, por ejemplo), se pensara en otro tipo de estímulos como iniciadores de la muerte. Varios motivos hicieron pensar en una implicación de la permeabilización de la membrana lisosomal a lo largo de este proceso. El primero de estos, fue el hecho de que durante la lactancia se producía una disminución notable de las proteínas estructurales de la membrana lisosomal LAMP1 y 2, sugiriendo una posible sensibilización de los lisosomas a la acción de agentes permeabilizadores. Otro segundo factor a favor de esta idea, fue el hecho de que la expresión y actividad de las catepsinas como las catepsinas B, D y L estaba incrementada a lo largo del destete (Zaragozá *et al.* 2009; Kreuzaler *et al.* 2011). Entre los posibles inductores, a su vez, de esta PML hemos identificado a las calpaínas.

En fracciones enriquecidas en lisosomas, se ha detectado un aumento de la actividad calpaína, siendo significativa en torno a las 24 horas de involución (figura 22). La presencia de las dos proteasas con marcadores lisosomales (figura 23), y en extractos enriquecidos en lisosomas (figura 22B) confirman este resultado. Estos datos proporcionan evidencias que ayudan a corroborar el papel de los lisosomas como orgánulos iniciadores de la muerte celular, ya que la translocación de las calpaínas a los lisosomas, precede en el tiempo a la translocación y activación de las mismas en la mitocondria. Además esta observación confirmaría la idea de que, este tipo especial de apoptosis no transcurre a través de una apoptosis clásica ya que no se encuentran rasgos morfológicos característicos de ese tipo de muerte celular. En la figura 32D, se puede observar claramente como todas las células liberadas al lumen de los acini, ya desancladas de la matriz extracelular y de las células mioepiteliales, presentan caspasa-3 activa. Sin embargo, esta ausencia de activación de la caspasa-3 en las células que se mantienen intactas y ancladas en los acini, demuestra que la activación de la caspasa-3 no ha sido el factor clave necesario para desanclar a las células de la matriz, sino más bien un efecto tardío como consecuencia de la ejecución y amplificación del proceso de muerte celular.

Con respecto a los posibles sustratos presentes en la membrana lisosomal susceptibles al procesamiento por calpaínas, se consideró LAMP2a como un buen candidato, por tratarse de una proteína transmembrana que se piensa que podría

proteger a la membrana lisosomal del ataque de proteasas. LAMP2 es una proteína específica de la membrana lisosomal altamente glicosilada cuya función aún permanece por especificar. Se ha propuesto que, además de la función protectora, podría actuar como receptor para la degradación selectiva de proteínas citosólicas (Cuervo *et al.* 2000). Se conocen tres isoformas de LAMP2 (a, b y c), que se caracterizan por la diferente composición aminoacídica de los doce aminoácidos que componen la cola citosólica de la proteína. Cuando se utiliza un anticuerpo que reconoce el dominio transmembrana, común a las tres isoformas, se observa un incremento total de los niveles de LAMP2 durante la involución (figura 24). Sin embargo, si se utiliza un anticuerpo que reconoce específicamente la cola citosólica de la isoforma “a”, LAMP2a, se detecta una disminución de la misma (figura 24). Dicha región de LAMP2a es la que queda accesible a las calpaínas, y por tanto, puede ser degradada por las mismas. La proteólisis del extremo citosólico de esta proteína, junto con la escisión de otras dianas lisosomales (tabla 7), es suficiente, para inducir una desestabilización lisosomal, y consiguiente liberación del contenido del mismo al citosol (Cuervo *et al.* 2000) (figura 55).

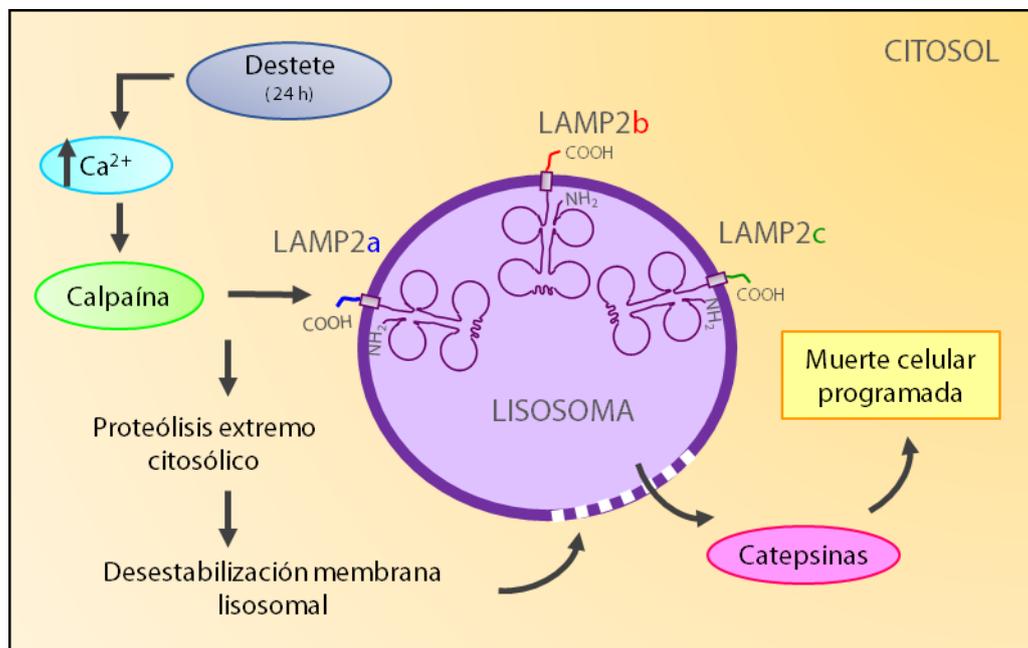


Figura 55: Papel de las calpaínas en la desestabilización lisosomal, a través de la degradación de LAMP2a.

Sin embargo, se ha publicado que la degradación de LAMP2 en líneas celulares transformadas, viene mediada por catepsinas, las cuales se expresan en

mayor cantidad y con mayor actividad proteolítica en este tipo de líneas oncogénicas (Fehrenbacher *et al.* 2008). En nuestro modelo, lo que se observa es una degradación de la cola citosólica de la isoforma “a” de LAMP2, LAMP2a, con lo que es lógico pensar que no pueden ser las catepsinas, que estarían recluidas en el lisosoma, las que accedan a esta parte citosólica de la proteína. Podrían degradar dicha parte *a posteriori*, cuando la membrana lisosomal ya ha perdido su integridad. Para descartar esta idea, los resultados obtenidos del uso de inhibidores específicos de catepsinas y calpaínas demuestran que, los inhibidores específicos de catepsinas no ejercen ninguna acción sobre la degradación de LAMP2a, evidenciando la ausencia de interacción catepsinas-LAMP2a. Sin embargo, el uso de inhibidores específicos de calpaínas sí que bloqueó completamente la degradación de LAMP2a (figura 26).

De hecho, el uso de concentraciones crecientes de calpaínas recombinantes sobre extractos lisosomales intactos correspondientes a ratones lactantes, indujo una degradación proporcional de LAMP2a (figura 25). Además si se analizan los sobrenadantes resultantes de este experimento con dosis crecientes de calpaína, se observa una liberación proporcional de catepsinas al medio de incubación (figura 27). Todos estos resultados publicados han sido *a posteriori* demostrados por otro grupo, el cual observa la pérdida de la integridad lisosomal en un modelo de muerte celular de fotorreceptores en un proceso de degeneración retiniana inducida por luz. Recurren al uso de un sensor fluorescente específico de lisosomas que cambia su longitud de onda de emisión, en función del pH lisosomal. Al inducir el estímulo de muerte celular, el sensor lisosomal cambia de color demostrando de esta forma la pérdida de la integridad de este orgánulo mediada por la degradación de LAMP2a (Villalpando-Rodríguez *et al.* 2013).

Con el fin de identificar nuevas dianas susceptibles al procesamiento por calpaínas en la membrana lisosomal, se utilizó la técnica 2D DIGE (figura 28) en lisosomas tratados con calpaína. En la tabla 7, se muestran las proteínas correspondientes a los 11 *spots* que presentaban una degradación diferencial. La mayoría son proteínas del compartimento endosoma- lisosoma, tales como la ligasa de ácidos grasos de cadena larga (LACS) o la β 2-glicoproteína1. La presencia de la subunidad b2 de la bomba de protones V-ATPasa (VATB2) resultó muy interesante, no solo por su función en la célula, ya que es la encargada del mantenimiento del pH

lisosomal, sino también porque la misma proteína se identificó en varios *spots*. De hecho, se ha publicado que la inhibición de V-ATPasa neutraliza el pH de los lisosomas, causando disfunción lisosomal e induciendo apoptosis en varias líneas celulares de cáncer (Nakashima *et al.* 2003; McHenry *et al.* 2010). De este modo, las calpaínas activas se translocarían a la membrana lisosomal, escindiendo proteínas ubicadas en el lado citosólico del lisosoma: tales como LAMP2a o la subunidad b2 de la V-ATPasa. En el 2010, Sahara *et al.* identificaron a la chaperona Hsp70.1 (Heat Shock Protein 70) como diana de las calpaínas causante de la permeabilización lisosomal, en neuronas del hipocampo que sufrían un proceso de muerte celular después de una lesión isquémica (Sahara *et al.* 2010). Sin embargo, diversas publicaciones en las que se estudia también la muerte celular mediada por la PML, en líneas de cáncer tratadas con ciprofloxacino o en la degeneración retiniana debida a la exposición lumínica, no observaron en ningún momento la degradación de esta chaperona. No obstante, dichos estudios sí que identificaron LAMP2a como diana susceptible a la degradación por calpaínas, al igual que ocurre en nuestro modelo de involución (Arnandis *et al.* 2012; Villalpando *et al.* 2013). Por tanto, parece ser que la desestabilización de la membrana lisosomal a través de la proteólisis de LAMP2a por las calpaínas sería un mecanismo común de muerte celular, por haber sido identificado en diferentes modelos y condiciones.

Varios experimentos *in vivo* constatan las observaciones anteriores. La inhibición *in vivo* de las calpaínas a lo largo del destete mediante inyección intraperitoneal ya sea de *siRNA Capn1* o de calpeptina; dio lugar al bloqueo por completo de la degradación de LAMP2a. Según los resultados de estos experimentos, parece ser que es CAPN1 la encargada de mediar *in vivo* la escisión de LAMP2a (figura 31 y 33). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que CAPN2 también ejerza un potencial papel a nivel lisosomal, de forma sinérgica o a través de dianas complementarias.

Como es lógico, el mantenimiento de la estructura funcional de LAMP2a y por tanto, de la integridad lisosomal, conduce a un retraso en la MCP. Este retraso se manifiesta, desde el punto de vista histológico, como una mayor presencia de estructuras túbulo-acinares y una mayor cantidad de células secretoras en las muestras tratadas con calpeptina en comparación con los controles tratados con

vehículo. Y al contrario, las muestras a las que se les inyectó el vehículo presentan las características típicas de un destete de tres días: la matriz ya está remodelada, se han colapsado la mayoría de estructuras lóbulo-alveolares y la glándula está prácticamente repoblada por adipocitos (figura 30). Otro resultado interesante que verifica este retraso en la involución debido a la inhibición de las calpaínas, es la disminución de los niveles de *TGF- β 1* y *Tenascin-C*, además de una menor fragmentación de la cromatina, característica de procesos apoptóticos (figura 31B y 32A, respectivamente).

Dichos experimentos aportan claras evidencias de que la muerte celular programada de las células epiteliales, estaría mediada a través de una permeabilización de la membrana lisosomal. En el caso de la involución, parece que la PML está inducida fundamentalmente por CAPN1. Dicho fenómeno además, se sucedería anterior a la activación de la caspasa-3, característica de la vía clásica de apoptosis. Esta interrelación entre la vía lisosomal y mitocondrial, ya había sido previamente descrita (Yamashima *et al.* 2000), y fundamentalmente se explica a través de una liberación del contenido lisosomal al citosol. Una vez liberado el contenido lisosomal, las proteasas de la familia de las catepsinas, como la catepsina B y la catepsina D, inducirían la proteólisis de diferentes proteínas con acción mitocondrial, entre ellas proteínas de la familia de bcl2 como bid, caspasas, y ya por último daño mitocondrial (Chwieralski *et al.* 2006). Toda esta cascada de señalización sería la responsable de los rasgos morfológicos observados en las células necroptóticas durante la involución, claramente diferentes de los rasgos de una apoptosis clásica.

Todos estos resultados demuestran que los lisosomas jugarían un papel crucial como uno de los primeros estímulos iniciadores de la cascada de muerte celular, que conducirá a la retirada del epitelio secretor. Gracias a experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, ya se demostró la importancia del incremento de la expresión de Catepsina D a medida que avanza el destete. Además, no solo se vio que se incrementa su expresión, sino que otra vía esencial de regulación del proceso involutivo, la vía del óxido nítrico, es capaz de incrementar la actividad de esta proteasa mediante nitración de la misma (Zaragozá *et al.* 2009). Otro ejemplo de interregulación entre vías, se presenta cuando en ratones *knockout* de NOS-2, se

observa un fenotipo en el que los niveles de NO están disminuidos existiendo a su vez un aumento de la fosforilación de STAT5, que conduce a un retraso en el inicio de la involución (Zaragozá et al. 2010). *In vitro* también se observan efectos de interrelación entre vías cuando por ejemplo, se aumentan los niveles de nitritos en el medio de células de cáncer de mama luminales (MCF-7). En dichos experimentos, se observa la activación de la vía de NF- κ B, ya que el inhibidor citoplásmico de este factor de transcripción, I κ B α , es degradado de forma proporcional a medida que se incrementa los niveles de NO (Bosch. A, 2013). Por tanto, todos estos resultados enfatizan el hecho de que los lisosomas serían mediadores centrales de la cascada de muerte, y que diversas vías como la vía del NO y del NF- κ B se interrelacionarían entre ellas para una regulación estrecha y fina de las distintas fases de la involución. Remarcar, como se explicará más adelante, que todas estas vías presentan gran trascendencia en los procesos tumorales, ya que en la mayoría de casos se encuentran alteradas.

1.2. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA MITOCONDRIA.

Se ha descrito que las calpaínas pueden influir en gran medida la alteración mitocondrial (Kar *et al.* 2010; Mizukoshi *et al.* 2010). Por un lado, las calpaínas pueden actuar de forma indirecta a través de la degradación/ activación de proteínas de la familia de bcl2 como bax o bid, facilitando la salida de factores proapoptóticos de la mitocondria (Raynaud *et al.* 2006). Además otro tipo de proteínas sobre las que ejercerían su papel proapoptótico indirecto serían, los canales iónicos o los transportadores de membrana como el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ o el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) (Kar *et al.* 2010; McCommis *et al.* 2012). Sin embargo, también se ha visto que puede actuar de forma directa sobre factores proapoptóticos, activándolos e induciendo la liberación de los mismos, entre ellos *Apoptosis Inducing Factor* (AIF) (Chen *et al.* 2001; Takano *et al.* 2005). El AIF truncado, y por tanto activo, es capaz de liberarse de la mitocondria e iniciar una apoptosis independiente de caspasas (Polster *et al.* 2005; Cao *et al.* 2007).

En la involución de la glándula mamaria, se ha observado que tras la activación de las calpaínas por Ca²⁺ (Arnandis *et al.* 2012), la CAPN1 sufre una

translocación mitocondrial sobre todo a partir de las 48h de destete, como puede verse reflejado en la medida de la actividad calpaína en fracciones mitocondriales en la figura 18. También confirman este resultado las figuras 19 y 20, donde se muestra localización de CAPN1 tanto con marcadores mitocondriales (figura 19) como en fracciones mitocondriales purificadas (figura 20). Nuestros datos demuestran que, parte de la CAPN1 ya se localiza en las mitocondrias durante la lactancia (figura 18 y 20), pero es a partir del inicio de la involución, cuando comienzan a incrementarse sus niveles. Esta translocación de calpaínas podría deberse a la presencia de un péptido señal de direccionamiento mitocondrial, como ya había sido previamente descrito (Badugu *et al.* 2008). Este incremento mitocondrial de CAPN1, induce la liberación proporcional de citocromo c (figura 20 y 21), corroborada además *in vitro* mediante la incubación de mitocondrias aisladas con r-CAPN1 en presencia de Ca^{2+} (figura 21).

Aunque la CAPN1 ya se encuentra en las mitocondrias de ratones hembra lactantes, ésta no ejerce su actividad hasta que los niveles de Ca^{2+} intracelular se elevan. De hecho, la pérdida del extremo amino de esta proteasa en torno a las 24-48 horas (figura 20), nos confirma su activación. El incremento en la translocación de CAPN1 a las mitocondrias que se produce a las 48h, sería el otro factor clave que conduce a la liberación significativa de citocromo c a las 48 horas de involución. Además, no se pueden descartar que otras proteínas ya liberadas del compartimento lisosomal, puedan activar a su vez a las calpaínas mitocondriales. Ya que, como se ha visto anteriormente, la desestabilización del compartimento lisosomal precede a la permeabilización mitocondrial. Por otro lado, también podría suceder que la calpaína ubicada en el citosol, esté a su vez actuando sobre alguna proteína con acción mitocondrial, la cual una vez activada, facilite la salida de factores proapoptóticos de la mitocondria.

Comentar que, de entre todos los miembros de la familia calpaína, solo se han identificado como mitocondriales, la CAPN1, la CAPN2 y la CAPN10. Además, se sabe que la presencia de éstas en las mitocondrias de diferentes tejidos, no es equiparable. Es decir, varios grupos han demostrado que las mitocondrias de riñón contienen solo CAPN10 y no calpaínas ubicuas (CAPN1 o CAPN2). Sin embargo otros grupos, partiendo de mitocondrias de músculo liso e hígado no hallaron

CAPN10, si bien las otras dos sí (Kar *et al.* 2010). En la glándula mamaria, podemos decir que la calpaína que presenta acción y localización mitocondrial, es la CAPN1. Por tanto, se puede concluir que en diferentes tejidos y bajo diferentes condiciones patológicas, la acción mitocondrial de la calpaína parece ser específica de tejido o incluso de condición patológica.

1.3. EL PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN EL NÚCLEO.

En diferentes tipos celulares se ha detectado la presencia de las calpaínas en el núcleo (Chou *et al.* 2010; Chang *et al.* 2011). Además de observar una translocación de las calpaínas al compartimento lisosomal y mitocondrial a las 24 y 48h respectivamente, también detectamos una translocación nuclear de las mismas, fundamentalmente a las 72h de destete (figura 39). Por este motivo, se planteó la pregunta biológica de cuál podría ser el papel de las calpaína en el compartimento nuclear. Siendo conscientes que la pérdida del transporte selectivo nuclear, es uno de los rasgos característicos de la MCP, decidimos estudiar los niveles de NUPs a lo largo del destete. Los resultados indican que a la par que las calpaínas se translocan al núcleo (figura 34, 35 y 37), se induce una degradación proporcional de NUPs periféricas, sin alterarse la estructura de las NUPs de la parte central del complejo del poro nuclear (figura 36). Estas observaciones van en concordancia con resultados observados en un modelo de muerte celular por neurodegeneración en el sistema nervioso, donde detectan una degradación de NUPs periféricas seguida de una redistribución de proteínas citosólicas al núcleo (Bano *et al.* 2010). Por otra parte, aunque CAPN1 y CAPN2 son capaces de escindir las NUPs periféricas *in vitro* (figura 39), nuestros experimentos de inhibición de CAPN1 *in vivo* (ya sea por la administración calpeptina o *siRNA Capn1*) mostraron que la acción de esta proteasa por sí sola, es suficiente para escindir las NUPs periféricas *in vivo* (figura 38).

Debido a su papel esencial en el control del transporte núcleo-citoplasma y viceversa, la degradación de diversas NUPs periféricas podría inducir una pérdida de la integridad de la membrana nuclear en las células epiteliales de los acini. Una forma de determinar la alteración progresiva de la pérdida del transporte selectivo, es midiendo la presencia de proteínas citoplasmáticas en el núcleo y viceversa. De hecho, en algunos modelos se ha observado que esta pérdida de la selectividad, puede

cursar con la acumulación intranuclear de α -tubulina citoplasmática (D'angelo *et al.* 2009). D'angelo y colaboradores estudiaron el destino y la tasa de recambio de las diferentes nucleoporinas y observaron una degradación de las NUPs periféricas con la edad. Dicha degradación conducía a una pérdida de la integridad del poro nuclear, y a la acumulación nuclear de α -tubulina citoplasmática. La aparición de filamentos de α -tubulina en el núcleo ya había sido descrita en mamíferos, y su presencia se había asociado con procesos de envejecimiento, así como con enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson, ambas ligadas a un daño oxidativo elevado. De ahí que, el estudio del deterioro de los poros nucleares y por tanto de la integridad nuclear con la edad, podría contribuir a elucidar los mecanismos que rigen las enfermedades asociadas al envejecimiento (D'angelo *et al.* 2009).

En nuestro modelo, observamos que a medida que progresa el destete, se detecta una disminución de la α -tubulina citoplasmática, al mismo tiempo que comienza a aparecer en el compartimento nuclear (figura 40). Estos cambios estructurales reflejan que la acción de las calpaínas sobre las NUPs periféricas, y en última instancia sobre la integridad del complejo del poro nuclear, inducen una pérdida de la selectividad del transporte nuclear, facilitando la acumulación de proteínas citosólicas en el núcleo, como factores proapoptóticos. La pérdida de las nucleoporinas parece ser un evento común en diversos tipos de muerte y en algunos tipos de respuesta al estrés (Bano *et al.* 2010). La alteración de las vías de transporte núcleo-citoplasma ha sido descrita mayoritariamente en células que cursan con una infección viral, ya que es un mecanismo adoptado por numerosos virus para acceder a la información genética de la célula. En nuestro caso, la alteración de los poros nucleares, con la consiguiente pérdida de la selectividad en el transporte nuclear podría conducir a una señal de retroalimentación positiva que amplifique la vía de muerte celular iniciada en los lisosomas, contribuyendo de este modo a una mayor rapidez en el desensamblaje y la muerte celular.

Hasta el momento, nuestras observaciones han revelado que, la activación de NF- κ B que se produce a las pocas horas de inicio de la involución, induce un aumento de la expresión de las calpaínas en las células epiteliales. Este aumento de

expresión junto con un aumento de actividad, conducen a un incremento de la acción específica de éstas sobre sus sustratos específicos. Se han identificado sustratos ubicados en los lisosomas, las mitocondrias y la membrana nuclear de las células epiteliales secretoras, la escisión de los cuales favorece la muerte celular programada de estas células (figura 56).

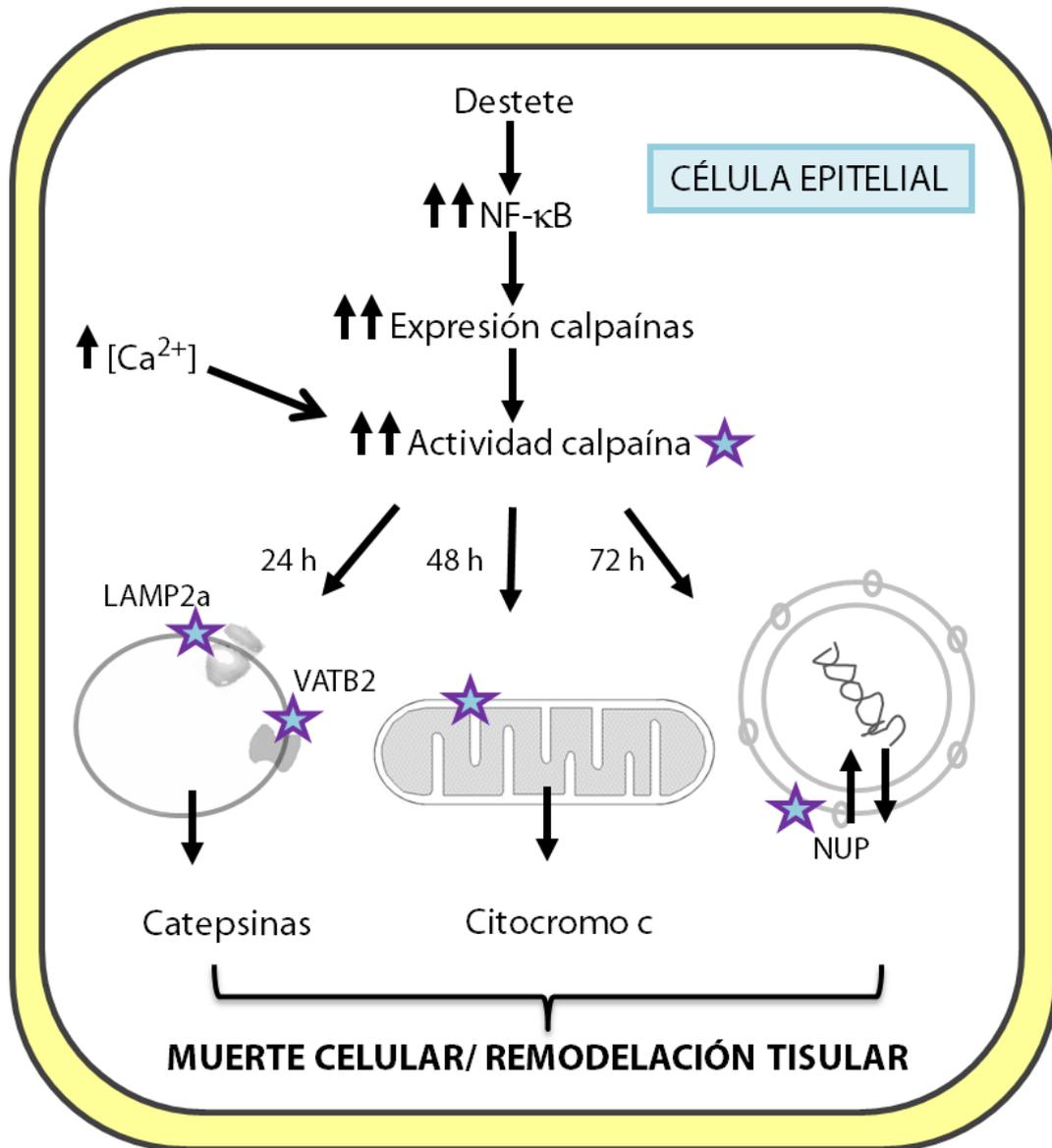


Figura 56: Representación esquemática de las funciones identificadas para las calpaínas en las células epiteliales.

2. PAPEL DE LAS CALPAÍNAS EN LA REMODELACIÓN POSTLACTANCIA.

Descrito ya el papel de las calpaínas durante la muerte celular programada de las células epiteliales, el estudio continuó para elucidar su posible función en células estromales. Esta idea surgió del hecho de que, al observar cuidadosamente las inmunofluorescencias de núcleos, las células ubicadas en la vecindad de los acini también presentaban una señal nuclear de CAPN1 (figura 42). La primera aproximación para elucidar el tipo celular sobre el que estaba actuando, nos dio evidencias de que se trataba de adipocitos, ya que por inmunofluorescencia se vio que eran positivas para perilipina, un marcador de este tipo celular (figura 43). Además se midieron niveles de expresión de CAPN1, para comprobar la procedencia de la misma en los adipocitos. Se observó un incremento de la expresión de esta proteasa en los extractos de adipocitos, a medida que avanza el destete (figura 45A). En estas células, CAPN1 presenta una función diferente a la identificada en células epiteliales, ya que la escisión de NUPs periféricas no es detectada en extractos adipocíticos (figura 45B). De hecho, a las 48h de destete la CAPN1 no parece limitarse solo al compartimento nuclear soluble, formado por proteínas asociadas a la membrana nuclear, sino que también aparece en la fracción enriquecida en cromatina (figura 46A).

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que diversas proteasas son capaces de degradar las histonas, en particular regiones más superficiales, y por tanto ubicadas en zonas más expuestas del nucleosoma (Duncan *et al.* 2008; Mandal *et al.* 2012). Teniendo en cuenta esto y la presencia de CAPN1 en los extractos de cromatina purificada, pensamos en una posible función de la CAPN1 sobre las histonas. En este sentido, cuando se estudió en células adipocíticas la interacción CAPN1-Histona H3, tanto por inmunoprecipitación (figura 46B) como por inmunofluorescencia (figura 47), se detectó que ambas proteínas interactuaban entre sí a las 48h de destete. Para verificar esta hipótesis se realizaron experimentos *in vivo* e *in vitro* (figura 49B, 49C, 50-52), los cuales mostraron que CAPN1 puede escindir directamente Histona H3 (figura 50). En cuanto a la especificidad de la degradación de la Histona H3 por parte de CAPN1 frente a la CAPN2, podemos concluir que CAPN2 no parecen participar en este proceso a lo largo de la involución. Varios motivos apoyan esta idea: la CAPN2 no está presente en la fracción enriquecida en

cromatina (figura 46A); el silenciamiento exclusivo de CAPN1 al igual que el bloqueo de su activación mediante calpeptina, es capaz de inducir una disminución proporcional en el procesamiento de la Histona H3 a las 72h (figura 49B y 49C). Por tanto, parece que sea la CAPN1 la responsable del procesamiento proteolítico de la Histona H3.

Es interesante destacar que estos resultados demuestran por primera vez una proteólisis selectiva de la Histona H3 por CAPN1. Por otra parte, aunque sí que ha sido descrita la escisión de esta histona por otras cisteín-proteasas en células en cultivo (Duncan *et al.* 2008), nuestros resultados serían pioneros, en tanto y cuanto, muestran una escisión *in vivo* de la Histona H3 en mamíferos. Otro tipo de proteólisis de las histonas han sido descritas en aves, como mecanismo de modificación postraduccional irreversible, sin embargo estos estudios no han llegado a identificar a la proteasa responsable de esta escisión (Mandal *et al.* 2012). Además se puede afirmar a través de nuestros experimentos que, CAPN1 es capaz de proteolizar el extremo aminoterminal de la Histona H3.

Por lo que concierne, a los experimentos realizados para elucidar la posible función biológica de esta escisión de la Histona H3 por la CAPN1 en adipocitos de ratones destetados, se ha intentado indagar en las modificaciones postraduccionales de la Histona H3. Se sabe, que existen al menos ocho tipos de modificaciones postraduccionales en las histonas. Las más conocidas son acetilación, metilación y fosforilación, pero además también se ha detectado ubiquitinación, sumoilación, etc. Esta gran variedad de modificaciones, y la combinación entre ellas, proporciona un enorme potencial de respuestas funcionales (Musri *et al.* 2009). Las modificaciones en histonas son dinámicas y cambian rápidamente en respuesta a estímulos celulares. Hasta el momento existe una gran bibliografía en torno a este tipo de modificaciones, sin embargo poco se sabe acerca de la proteólisis de las histonas (Mandal *et al.* 2012).

Por un lado, la consecuencia biológica más directa deducible de la proteólisis de la Histona H3 a nivel epigenético, es la eliminación rápida de marcas postraduccionales que se encuentran en ese extremo, con el fin de cambiar la firma epigenética de determinados genes involucrados en el proceso de diferenciación de adipocitos. Esta misma hipótesis, ya fue barajada para explicar el efecto de la

catepsina L en la proteólisis de la Histona H3 durante la diferenciación de células madre embrionarias en cultivo (Duncan *et al.* 2008). Esto podría suponer, bien la eliminación de marcas epigenéticas represivas sobre los genes de diferenciación, o bien la prevención de nuevas marcas activadoras sobre genes implicados en la pluripotencia, dando lugar a un patrón preciso de expresión génica, durante la diferenciación de los adipocitos.

Por otro lado, se ha barajado otra posible explicación mecanística. Se sabe que, a excepción de la metilación, las modificaciones de las histonas resultan en un cambio en la carga neta de los nucleosomas, lo que afecta a las interacciones DNA-histona, y por tanto a la mayor o menor apertura de la cromatina. Por tanto, la pérdida del extremo amino de la Histona H3, cargado positivamente, por la gran cantidad de residuos básicos que posee, podría favorecer la apertura de la cromatina y el inicio de la transcripción. Este efecto acontecería sobre genes implicados en la diferenciación de los adipocitos (*CEBP α*) y en la adquisición del fenotipo del adipocito (*leptina*) a las 48h del destete (figura 54A).

Aparte de estos posibles mecanismos de regulación, no descartamos la posibilidad de que la CAPN1 facilite la rotura de proteínas y/o factores de transcripción con acción inhibidora o activadora de la transcripción, como ha sido previamente descrito (Patel *et al.* 1999; Yajima *et al.* 2006).

Además, también se ha indagado frente a la cuestión de si existe alguna marca epigenética que pueda guiar o conducir a la calpaína a actuar solo sobre determinadas histonas posicionadas en determinados genes. Dicho de otro modo, la CAPN1 actuaría específicamente sobre histonas con una modificación característica, discriminando aquellas que no presenten esta modificación. En esta línea, se ha publicado que las histonas ubicadas en promotores de genes que juegan funciones clave en procesos de desarrollo y diferenciación, presentan la señal bivalente H3K4me3 y H3K27me3 (Verrier *et al.* 2011). Además se ha descrito, que las histonas posicionadas en genes con la marca dual permanecen en el borde intranuclear en las células inmaduras y se reorganiza de forma drástica hacia el nucleoplasma central en células que se diferencian (Musri *et al.* 2006; Szczerbal *et al.* 2009). En base a nuestros resultados y a la literatura anterior, podríamos decir que la CAPN1 se localiza en la

periferia nuclear (figura 53) donde podría proteolizar la Histona H3, ubicada en los promotores de genes adipogénicos (figura 54A) que presenten esta señal bivalente (figura 53).

Los mecanismos que podrían estar implicados en esta posible regulación transcripcional por parte de la calpaínas son especulativos, pero muy esperanzadores y abren nuevas perspectivas. Exponen el hecho de que una proteasa citosólica (la CAPN1), es capaz de translocarse al núcleo, y regular de forma específica mediante el procesamiento proteolítico de la Histona H3, la estructura de la cromatina, lo que podría tener consecuencias a nivel transcripcional.

Como se ha comentado, el estudio de los mecanismos epigenéticos constituye un factor clave para el establecimiento de patrones correctos de expresión génica, y su alteración puede dar lugar al desarrollo de diversas patologías, entre ellas el cáncer. En este sentido, si se ha observado que la calpaína es capaz de proteolizar la Histona H3, afectando de algún modo al empaquetamiento de la cromatina, esta podría presentar un papel en la regulación de transcripción de genes con potencial oncogénico. De hecho, como se ha descrito en los antecedentes, la elevación de la actividad calpaína se correlaciona con un factor pronóstico negativo, en cuanto a que es capaz de inducir una mayor migración y adhesión de las células cancerosas. Continuar con el estudio de estas proteasas, y en su posible inhibición para frenar patologías como el cáncer, sería de gran interés, gracias al vasto campo que se abre con la idea de las calpaínas como reguladoras epigenéticas.

Por último, comentar que es comprensible y aceptable que la calpaína presente este papel dual en el núcleo ya que durante la involución coexisten espacial y temporalmente diversos tipos celulares, con distintos orígenes embrionarios, por tanto, con regulación y funciones propias. También se ha explicado que la actividad calpaína es tipo y señal dependiente. De ahí que, en el epitelio secretor que deriva del ectodermo la calpaína favorece la apoptosis de estas células, mientras que en los adipocitos que derivan del mesodermo, ésta pueda actuar promoviendo la diferenciación y proliferación de los adipocitos. Es lógico pensar que al derivar de una hoja embrionaria diferente, en ambos tipos celulares encontremos que la actividad calpaína actúe en un sentido u en otro (figura 57).

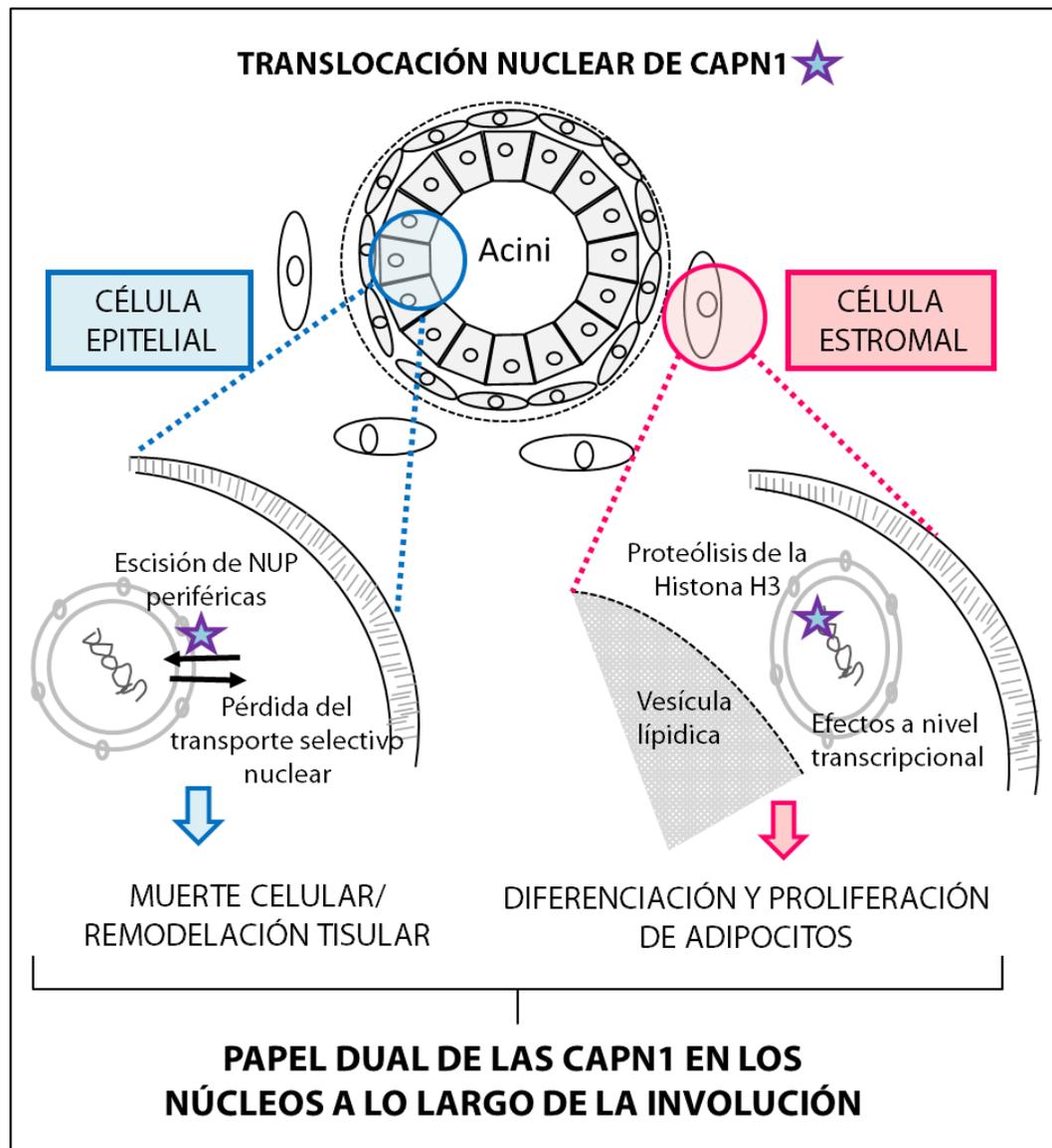


Figura 57: Representación del papel diferencial que presenta la CAPN1 en los núcleos de células epiteliales y estromales a lo largo del destete.

3. IMPLICACIONES BIOMÉDICAS.

El embarazo siempre se ha asociado desde un punto de vista epidemiológico con una reducción del riesgo de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida de la mujer (Rosner *et al.* 1994). Este efecto protector se puede incrementar de forma significativa en madres con múltiples embarazos, el primero de los cuales ha sido a una edad temprana. De hecho, estas tienen la mitad de probabilidades de padecer la enfermedad si se las compara con mujeres con un solo embarazo y a una edad tardía (más de 35 años) (Rosner *et al.* 1994; Bosch, 2012; Viña, 2012).

Sin embargo, en los primeros 5 años tras la gestación, la probabilidad de padecer un cáncer de mama aumenta, incrementándose este riesgo transitorio como se ha comentado, si el primer embarazo se produce a partir de los 35 años (Lyons et al 2011; Viña J. 2012). Ya a nivel de laboratorio, los resultados obtenidos sugieren que el incremento del riesgo de cáncer de mama tras el embarazo, se debe al microambiente proinflamatorio, que se desarrolla en la glándula mamaria durante la involución (Hughes *et al.* 2012). Dicho microambiente viene condicionado tanto por la infiltración de células del sistema inmune (como macrófagos) (O' Brien *et al.* 2012), como por la propia composición de la matriz extracelular. Esta última a su vez, es capaz de alterar las adhesiones focales, las uniones adherentes entre células, la polaridad tisular e incluso el crecimiento celular; determinando de este modo la capacidad invasiva de las células (Schedin *et al.* 2007). Además, vías de gran relevancia durante el proceso de la involución, como NF- κ B, STAT3, catepsinas y calpaínas, se encuentran alteradas en gran cantidad de tumores (Li *et al.* 1997; Brantley *et al.* 2000; Moorehead *et al.* 2001; Baxter *et al.* 2007; Zaragoza *et al.* 2009; Torres *et al.* 2011). En este sentido, la involución de la glándula mamaria puede servir como un excelente modelo experimental, con el que profundizar para obtener un mejor conocimiento molecular de las vías implicadas en la etiología del cáncer de mama asociado a la gestación.

Por otro lado, la involución de la glándula mamaria también puede servir como modelo fisiológico para estudiar las dianas de las calpaínas en el contexto mamario. Como se ha comentado anteriormente, una actividad calpaína elevada siempre ha estado relacionada directamente con la migración celular o invasividad, (Roumes *et al.* 2010; Storr *et al.* 2011). De hecho, un estudio realizado en líneas de carcinoma de mama de ratón, en la que éstas se inyectaban en el tejido mamario (*xenografts*), determinó que el silenciamiento de la CAPN2 se correlacionaba con una reducción en la tasa de proliferación y migración *in vitro*, junto con un menor crecimiento tumoral. Mediante análisis bioquímicos se observó que la CAPN2 ejercía dicha acción a través de la vía PI3K-Akt-FoxO-p27 (Ho *et al.* 2012). Otro reciente estudio, esta vez llevado a cabo en pacientes, determinó que un incremento de la actividad de la CAPN2 desemboca en un peor pronóstico y menor supervivencia específica de pacientes con tumores de mama triple negativos (Storr *et*

al. 2012). De hecho, pacientes que presentaban niveles bajos de expresión de CAPN2 en tumores basales o triple negativos, presentan una supervivencia similar a la observada en pacientes con tumores luminales u hormona-dependientes. Conocer en profundidad el mecanismo de acción, las dianas proteolíticas, y en general, el funcionamiento de las calpaínas en el contexto de la glándula mamaria, puede contribuir aunque sea en pequeña medida, a avanzar en la complicada lucha contra el cáncer de mama.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente proyecto de tesis se ha contribuido a elucidar el papel de las calpaínas en la muerte celular programada y la remodelación tisular de la glándula mamaria tras el ciclo embarazo/lactancia.

1. La translocación lisosomal, mitocondrial y nuclear de las calpaínas está involucrada en la desestabilización progresiva de estos orgánulos durante la muerte celular programada de las células epiteliales secretoras. La liberación del contenido lisosomal al citosol constituye el primer paso en la ejecución de esta muerte celular programada.

2. Al translocarse al lisosoma, las calpaínas participan en la degradación de proteínas asociadas a la membrana lisosomal como LAMP2a y VATB2, identificadas por primera vez como dianas lisosomales de estas proteasas. La translocación mitocondrial de las calpaínas induce una desestabilización de la membrana mitocondrial, con la consiguiente liberación de citocromo c al citosol. En el núcleo de células epiteliales, las calpaínas degradan nucleoporinas ubicadas en posiciones periféricas del complejo del poro nuclear.

3. La CAPN1 presente en núcleos de adipocitos, ejerce una función diferente a la observada en células epiteliales. En adipocitos, CAPN1 participa en el proceso de diferenciación de los mismos, favoreciendo la activación de genes adipogénicos.

4. La Histona H3 ha sido identificada por primera vez como diana nuclear de CAPN1 en adipocitos. El procesamiento proteolítico tiene lugar sobre el extremo aminoterminal, alrededor de la lisina en posición 9 y la serina en posición 10. La ruptura de este dominio de la Histona H3 estaría implicada en la remodelación de la cromatina durante la diferenciación de los adipocitos.

Como conclusión global, cabe destacar que la CAPN1 presenta un papel dual en función del tipo celular. A lo largo de la involución de la glándula mamaria, la CAPN1 está involucrada en la muerte del epitelio secretor, además de presentar un papel en la adipogénesis, necesaria para la remodelación tisular postlactancia.

SUMMARY

SUMMARY

INTRODUCTION

Mammary gland is defined as a highly dynamic and complex tissue with a fundamental function: to provide the newborn with copious amounts of milk, the unique body fluid that confers nutrition and immunological protection (McClellan *et al.* 2008). Considering the complex biochemical mechanisms of milk production and secretion, lactation seems to have evolved gradually from the innate immune system, becoming a highly specialized skin gland that initially, like other skin glands, was part of the protective epithelial body barriers. Corroborating this hypothesis, milk is rich in enzymes such as xanthine oxidoreductase, lysozyme and other molecules with antimicrobial and protective effects (figure 1) (Vorbach *et al.* 2006).

Mammary gland is a compound tubulo-alveolar gland embedded within an irregular connective tissue that undergoes a series of changes from conception to senescence (Stingl *et al.* 2005). It consists of a series of lobes (15-25), each of which is drained by a collecting duct that ends in the nipple. The collecting duct has several branches which in turn subdivide into small segments of terminal ducts and a cluster of globular structures (acini, the actual secretory units). These functional structures are surrounded by a varying amount of fat and collagenous tissue (Dimri *et al.* 2005). Histologically, there are two tissue compartments: a stratified epithelium, derived from embryonic ectoderm, which consists of ducts and alveoli that contain milk producing cells; and the mesodermally-derived stroma, also known as mammary fat pad which main components are adipocytes, although it also contains fibroblasts, macrophages, cells from the hematopoietic system, extracellular matrix, blood vessels and neurons (Hennighausen & Robinson. 2005) (figure 2).

As already mentioned, mammary gland is a highly dynamic tissue. Indeed, three developmental stages can be clearly differentiated: embryonic, pubertal, and gestational/lactation (Macías *et al.* 2012). Mammary development is similar in most mammals, although the number of mammary glands varies (Hovey *et al.* 2004). During embryogenesis, the first feature observable is the appearance of two ridges of

multilayered ectoderm that arise from the embryonic skin (called mammary lines or milk lines). By migration of ectodermal cells along the mammary line, they form the placodes (Propper *et al.* 2013). Then the buds elongate to form mammary sprouts that branch generating a rudimentary structure with approximately 5 ductules that are embedded within a subdermal fat pad (Veltmaat *et al.* 2003). It is important to highlight that the major changes in mammary gland development and differentiation are reached only during the postnatal stage, in particular during pregnancy and lactation. In this sense, it is during puberty when growth continues, since serum levels of estrogen start to rise, resulting in bifurcation of the ducts to generate branches (Watson *et al.* 2008). Once again, development is arrested unless pregnancy ensues, whereupon the gland has to undergo further development and morphological changes to prepare for lactation. The hallmarks of this phase of development are the formation of tertiary branches which terminate in alveolar buds, and the rapid proliferation and differentiation of the luminal epithelium, in order to achieve the secretory phenotype. The cells of this lineage can synthesize and secrete copious amounts of milk (Lee *et al.* 2012).

Finally, following lactation, removal of superfluous alveolar cells that are no longer needed is accomplished by cell death. This post-lactational regression of the mammary gland, also called involution, is one of the main physiological cell death events in the adult mammalian organism. It is a complex process characterized by extensive death of the secretory epithelium coupled with remodeling of the extracellular matrix and adipogenesis to regenerate the fat pad. Importantly, involution can be halted by returning the pups to the mother to re-initiate lactation. This reversible phase of involution lasts for approximately 48h, at which the process becomes irreversible with loss of the alveolar structures and remodeling of the stroma accompanied by re-differentiation of the adipocytes (Watson *et al.* 2008).

Over the last years, several signaling pathways have been described to regulate the whole process of involution. Among them, the STAT family, NF- κ B, NO, PI3K/AKT and different proteases such as metalloproteinases, cathepsins, caspases, calpains, etc (Li *et al.* 1997; Brantley *et al.* 2000; Moorehead *et al.* 2001; Baxter *et al.* 2007; Zaragozá *et al.* 2009). Most of these pathways have been identified as persistently activated during neoplastic transformation, a circumstance that adds

an increased interest for health purposes. Indeed, if we focus our attention on STAT3 and NF- κ B, two central transcription factors that control mammary gland involution, we can observe that they not only modulate cell death and proliferation, but are also involved in tumour development and progression. The mechanism by which they accomplished this function is the induction of an inflammatory environment in some way similar to that one observed in the involuting mammary gland of mice (Lyons *et al.* 2009; Torres *et al.* 2011). Thus, physiologic gland regression after pregnancy can be an excellent experimental model to study the molecular clues of this cancer-related pathways.

In this sense, a deeper study of NF- κ B reveals that is both expressed and active through different stages of mammary gland development. Its activity is high during pregnancy, when it regulates epithelial proliferation and branching (Baxter *et al.* 2007) but is found to be inactive during lactation (Clarkson *et al.* 2000). However, during involution, NF- κ B increases significantly its activity around 48h (Clarkson *et al.* 2000; Zaragoza *et al.* 2010). In order to gain a profound knowledge of NF- κ B target genes, our group perform a ChIP/chip experiment, by which we identified 269 NF- κ B target genes in 48h weaned mouse mammary gland (Torres *et al.* 2011). Among them, calpain-1 and calpain-2 were identified. The transactivation form of NF- κ B (p65)/p300 was found to bind *Capn1* and *Capn2* promoters with the subsequent induction of gene expression after 48h weaning (Arnandis *et al.* 2012). This evidence coupled with an increased intracellular Ca⁺² levels within the gland, fits with increased activity.

Calpains are a family of intracellular calcium-dependent cysteine proteases. The ubiquitously expressed calpain-1 and -2 are the best characterized isoforms. Both enzymes are heterodimers, consisting of a small regulatory subunit (30 kDa), encoded by *Capn4*, and a large catalytic subunit (80 kDa) encoded by the *Capn1* or *Capn2* genes (Chakraborti *et al.* 2012). These two main isoforms, calpain-1 (μ -calpain, CAPN1) and calpain-2 (m-calpain, CAPN2) differ in the calcium concentrations required for their activation *in vitro* (μ M or mM, respectively) (Campbell *et al.* 2012). Both proteases co-exist with the endogenous specific inhibitor, calpastatin; however, upon calcium increase calpains translocate to

membranes where they become activated. More than 100 proteins have been shown to be calpain-targets “in vitro”. Regardless of this wide spectrum of substrates, calpain-mediated protein cleavage is rather specific. It is also important to highlight that calpains cleave most of their substrates at a limited number of sites (Liu *et al.* 2008). Therefore, under physiological conditions, calpains most probably regulate protein biological functions rather than protein degradation *per se*. Calpains are involved in several physiological functions, such as cytoskeletal/plasma membrane attachments, cell motility, signal transduction pathways, apoptosis, differentiation, cell cycle and gene expression regulation, etc. Therefore, the deregulation of their activity has been implicated in various diseases or pathological conditions (Dargelos *et al.* 2008).

AIMS

Previous studies in our laboratory have shown that NF- κ B is a key factor regulating mouse mammary gland involution. Our group identified 269 NF- κ B target genes by ChIP-on-chip in 48h weaned mouse mammary gland (Torres *et al.* 2011). Among them, calpain-1 and calpain-2 were identified. As we had evidence of a rise in the intracellular Ca⁺² levels within the gland during weaning (Reinhardt *et al.* 2004), it was likely that calpains become activated during this post-lactational regression. Hence, we detected that both the expression and the activity of these proteases, were increased during weaning (Arnandis *et al.* 2012). The aim of this work was to elucidate the biological implications of calpain-mediated cleavage of new substrates in mammary gland involution after the cycle pregnancy/lactation.

1. Although calpains are considered cytosolic proteases, some studies have found that they can also localized in the mitochondrial fraction (García *et al.* 2005). Classically, calpains have been implicated in neurodegeneration processes in the central nervous system, where they promote the apoptotic intrinsic pathway through the cleavage of mitochondrial proteins such as Bcl-2 and Bid (Raynaud *et al.* 2006; Cao *et al.* 2007). Based on this evidence, we want to further explore the possible role that calpains play in the mitochondrial compartment, during the programmed cell death initiated along mammary gland involution.

2. On the other hand, calpains have also been involved in neuronal cell death via lysosomal destabilization (Bever *et al.* 2008). The ‘calpain–cathepsin hypothesis’ formulated in 1998 postulates that the post-ischemic calpain-1 activation compromises integrity of the lysosomal membrane, thereby leading to cathepsin spillage through the cleavage of Hsp70.1 (a major protein of the Hsp70 family that protects the lysosomal membrane integrity) (Yamashima *et al.* 1998; Sahara *et al.* 2010). This, added to the previous works that identified an upregulation and subsequent release of cathepsins from lysosomes during programmed cell death (Zaragoza *et al.* 2009; Kreuzaler *et al.* 2011), gave rise to question which role did calpains play in the lysosomal pathway during involution. Therefore, the second aim was to identify potential calpain-targets localized at the lysosomal membrane.

3. It has been published that in different cell types, upon transient elevation of intracellular Ca^{2+} , calpains can undergo specific subcellular relocation from the cytosol to the nucleus, where they can proteolyze transcription factors and nuclear proteins (Tremper Wells *et al.* 2005; Bano *et al.* 2010). A recent study has shown that during excitotoxic neuronal degeneration, calpains redistribute across the nuclear envelope and mediate the degradation of Nuclear Pore Complexes (NPC) components (Bano *et al.* 2010). Hence, in our experimental model of programmed cell death, calpains could translocate to the nuclear membrane playing a role in the modulation of NPC. More specifically, our third objective is to establish the role of calpains in the nuclear compartment and to identify potential targets within the NPC during the involution process.

4. Mammary gland remodeling, a crucial step during the postlactational regression, is characterized by extracellular matrix and stromal restructuring coupled with adipocyte proliferation/differentiation. This remodelling takes place during the irreversible stage of involution, 48 hours after weaning (Werb *et al.* 1996; Li *et al.* 1997). Taking into account, that there are some studies describing the role of this proteases during the differentiation of different cell lineages such as myoblast, osteoblast or chondrocytes (Yajima *et al.* 2002), we are going to elucidate if calpains play any role during the adipocyte differentiation process.

RESULTS AND DISCUSSION

Results presented herein demonstrate that calpain system seems to be involved not only in mitochondrial cell death but also in lysosomal destabilization and nuclear dysfunction. On the other hand, CAPN1 also seems to be implied in the differentiation process of adipocytes during repopulation of the gland to achieve its pre-pregnant state.

1. ROLE OF CALPAINS IN MITOCHONDRIA DESTABILIZATION OF EPITHELIAL CELLS.

As it was commented earlier, different studies have demonstrated that calpain-1 also appears within the mitochondria (Raynaud *et al.* 2006; Cao *et al.* 2007). Therefore, one could hypothesize that calpain activation could mediate in mitochondrial programmed cell death during mammary gland involution. Western blots analysis of ubiquitous calpains in mitochondria and cytosolic extracts from lactating mammary glands were performed. As can be seen in figure 18, CAPN1 is present not only in cytosol but also in mitochondria whereas CAPN2 is only detectable in cytosolic extracts.

Besides, calpain activity was measured in mitochondrial extracts from control lactating and weaned mammary glands (figure 19), showing a calpain activation pattern similar to that observed in total extracts (Arnandis *et al.* 2012). Although CAPN2 is not detectable in mitochondria from control mice, it could translocate upon activation and therefore be responsible together with CAPN1 for the changes observed. To elucidate this fact, immunofluorescence analysis of control and 48h weaned tissue was performed with antibodies against CAPN1, CAPN2 and cytochrome c oxidase IV (CcOx IV), used as a mitochondrial marker (figure 20). Co-immunostaining of both CAPN1 and CcOx IV during weaning confirmed the presence of this protease within mitochondria (arrowheads) in control and weaned mice. However, no co-localization was detected for CAPN2 and CcOx IV, neither in control lactating, nor in weaned mice. In agreement with this, western blot analysis showed that CAPN1 was present in mitochondrial fractions in both control and weaned mice (figure 21) whilst CAPN2 did not translocate to mitochondria

upon activation (data not shown), supporting the idea that calpain-1 is the major player on mitochondria destabilization. Indeed, concomitant with the increased activity, there is a loss of the CAPN1 amino-terminal domain and cytochrome c release from mitochondrial fractions to the cytosolic compartment (figure 21).

To assess the role of CAPN1 on this signalling pathway, intact mitochondria from control lactating mice were isolated and incubated with purified human calpain-1. Figure 21 shows that addition of CAPN1 triggers cytochrome c release from mitochondria in a concentration-dependent manner. It is important to point out that incubation of isolated mitochondria merely with calcium also induces a slight cytochrome c-release, probably due to the intrinsic calpain-1 already detected on these organelles.

2. ROLE OF CALPAINS IN LYSOSOMAL PERMEABILIZATION DURING THE INITIATION OF PROGRAMMED CELL DEATH.

An additional finding was that calpains were also active within lysosomes as involution progresses, in particular their activity starts to be significant around 24 hours after weaning. Surprisingly, calpain activity on lysosomal enriched fractions increased during involution earlier than in mitochondria (figures 22 and 23). These results provide new evidence for lysosomal-mediated cell death that takes place even earlier than the mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation. With regard to the possible substrates for calpain-cleavage, LAMP2 was considered a good candidate, because it seems to protect the integrity of the lysosomal membrane. LAMP2 is a lysosomal associated membrane protein highly glycosylated which function remains to be perfectly elucidated (Cuervo *et al.* 2000). It has been proposed to protect the lysosomal membrane from attack by lysosomal proteases, besides it is a receptor for selective degradation of cytosolic proteins (Fehrenbacher *et al.* 2008). Lamp2 mRNA and protein levels are known to increase during involution (Kreuzaler *et al.* 2011); however, when using an antibody against the cytosolic tail of LAMP2a, degradation of this protein occurs after litter removal (figure 24). Furthermore, the data presented in this project demonstrated that LAMP2a turnover in the mammary tissue is calpain-mediated (figure 25). Lysosomes incubated with either CAPN1 or 2 in the presence of calcium and several calpain inhibitors showed

reduced rates of LAMP2a degradation, while the cathepsin B inhibitor, Ca-074, had no effect on LAMP2a cleavage (figure 26). This truncated LAMP2a might have a direct effect on the permeability of the lysosomal membrane (Cuervo *et al.* 2000) that has been shown to increase leakiness during involution (Kreuzaler *et al.* 2000). A recent publication corroborates these results (Villalpando-Rodriguez *et al.* 2013).

To gain a deeper knowledge in calpain function on lysosomes and identify new substrates we used two-dimensional DIGE in control intact lysosomes after calpain treatment. Treated and untreated samples were combined and analyzed by 2D-DIGE and mass spectrometry; 11 spots were excised (figure 28B) and analyzed by mass spectrometry as potential calpain substrates (table 7). By using a recently published calpain-cleavage prediction method based on Multiple Kernel Learning algorithms (DuVerle *et al.* 2011), we could predict the cleavage sites of all the proteins identified, with a high score range (table 7). The presence of the subunit b2 of vacuolar H⁺ ATPase (VATB2) resulted remarkably interesting, not only for its cellular function, but also because the same protein was identified in different spots. Several papers in the literature emphasize the importance of this proton pump in lysosomes. In fact, it has been published that inhibition of the v-ATPase neutralizes the pH of lysosomes, causes lysosomal dysfunction and induces apoptosis in several cancer cell lines (Nakashima *et al.* 2003; McHenry *et al.* 2010). It was also demonstrated that during weaning this v-ATPase subunit disappeared from the lysosomal fraction (figure 29), giving support to the idea that lysosomes from involuting mammary gland are more likely destabilized.

These results shed further light on the lysosomal-mediated cell death that occurs during involution. Activated calpains would translocate to the lysosomal membrane, cleaving substrate proteins located on the cytosolic side of the lysosome such as the cytosolic tail of LAMP2a or the subunit b2 of the v-ATPase. As a result of this selective proteolysis, lysosomal membrane would be destabilized inducing membrane permeabilization which would finally lead to cathepsins release (figure 55).

Finally, *in vivo* experiments with the calpain inhibitor calpeptin, showed a prominent role for calpains in mammary gland involution, since there is a substantial

delay of this process in calpeptin-treated mice, as can be observed in the hematoxylin-eosin sections (figure 30). Surprisingly, calpeptin treatment prevented autolysis of CAPN-1, but not -2; however LAMP2a degradation was abolished with the administration of this inhibitor (figure 31). In accordance with these results, silencing calpain-1 with *siRNA* during weaning also blocked LAMP2a cleavage (figure 33). These data suggest that the lysosomal destabilization observed in weaned glands occurs mainly through CAPN1 activation. However, we do not rule out a synergistic role for CAPN2 in other lysosomal targets or compartments during mammary gland involution. Therefore, inhibiting calpains during involution could result in the disturbance of several signaling pathways and, as a consequence apoptosis and tissue remodeling is delayed, as demonstrated by a decreased in nuclear fragmentation (figure 32) and a decreased in the mRNA levels of *Tenascin C* and *TGF- β* (figure 31B), respectively.

3. ROLE OF CALPAINS IN NUCLEAR DYSFUNCTION OF EPITHELIAL CELLS.

Once demonstrated that calpains play an important role in destabilization of both lysosomal and mitochondrial membranes, the next aim was to elucidate the role of these proteases within the nuclear compartment. We show that calpains translocate to the nuclear membrane as weaning progresses (figures 34 and 35), where they cleave different peripheral NUPs: Nup 62, Nup 98, Nup 153, etc (figure 36). Furthermore, *in vivo* experiments blocking CAPN1 (either by calpeptin administration or by *Capn1 siRNA*) showed that this protease *per se* can cleave different NUP (figure 38). However, *in vitro* approximations show that both calpains are able to cleave peripheral NUPs from the NPC, in a specific manner (figure 39).

Due to their essential role in controlling cytoplasmic-nuclear transport, cytosolic degradation of several NUPs by calpains would potentially induce a loss of nuclear membrane integrity in the epithelial cells of acini. In this sense, the loss of the selectivity transport across the nuclear membrane is demonstrated by the accumulation of cytoplasmic proteins within the nucleus, such as α -tubulin or aldolase (figure 40). These structural changes of the nuclear envelope and NPC

ultimately, would trigger the re-distribution of pro-apoptotic factors and the subsequent amplification of the death-signals.

4. ROLE OF CALPAINS IN ADIPOCYTE DIFFERENTIATION.

In mammary epithelium calpains promote nuclear membrane leakiness, mediated by the degradation of peripheral proteins from the nuclear pore complex. This, in turn, leads to a loss of the selectivity transport across the nuclear membrane, and accounts for the accumulation of cytoplasmic proteins within the nucleus, triggering epithelial cell death.

On the other hand, calpains were also present in the nuclei of non-epithelial cells. So at this point, we asked which kind of stromal cells could be and we try to elucidate the functional consequences of this nuclear calpain traslocation. These cells are likely to be adipocytes, as it can be concluded by the fact that these stromal cells showing nuclear CAPN1 localization, are also positive for perilipin, an adipocyte marker (figure 43). Calpains have already been described to localize in the nuclear compartment of adipocytes, being involved in differentiation and adipogenesis in *in vitro* models (Yajima *et al.* 2006). During mammary gland involution, programmed cell death of the secretory epithelium takes place, concomitant with the repopulation of the mammary fat pad by adipocytes. Indeed, this re-colonization of the mammary gland with differentiated adipocytes is observed at 48-72h after weaning (figure 44). The quantification of perilipin staining showed that adipocyte differentiation was significant from 48h weaning onwards (figure 51). In order to elucidate the cellular origin of CAPN1 present in the nuclei of adipocytes, we measured CAPN1 mRNA levels at different times during involution. As weaning progressed, the expression levels of CAPN1 increased in a time-dependent manner (figure 45A), suggesting that the cellular origin of this enzyme were adipocytes. However, this protease was not degrading NUPs as in epithelial cells undergoing cell death. Peripheral NUPs remained intact in adipocyte-enriched fractions at 72h weaned-mammary tissue (figure 45C).

In these adipose cells, CAPN1 seems to have different targets, since it is not restricted to the nuclear periphery, as can be seen in figure 43. Therefore, we studied

the possible role of CAPN1 in chromatin organization. Fractions of chromatin-enriched and soluble nuclear components were obtained by a nuclear sub-fractionation method (Wysocka *et al.* 2001) in control or 48h-weaned glands. To verify appropriate fractionation, both fractions were probed by western-blot analysis for the NUPs Mab414 and Nup62, and Histone H3 (as chromatin-enriched fraction marker). As shown in figure 46A, most of NUPs were in the nuclear soluble fraction, whereas Histone H3 was mostly in the chromatin-containing fraction. Although the majority of CAPN1 was recovered in the soluble fraction, a significant increase of this protein was also observed in the chromatin-enriched fraction after 48h of weaning (figure 46A, upper panels). CAPN2, confined to the nuclear soluble fraction, was increased during weaning, when NUPs were degraded. The absence of CAPN2 from the chromatin-enriched fraction confirmed the specificity of CAPN1 binding to chromatin.

The coimmunoprecipitated complex CAPN1/H3 observed at 48h weaning corroborates the results observed with the nuclear subfractionation (figure 46B). To further confirm that this interaction was restricted to adipocytes, the internalization of CAPN1 within the nucleus was assessed by immunofluorescence staining. As can be observed in figure 47, no colocalization was observed in control lactating mice between CAPN1 (confined mainly to the cytosolic fraction) and Histone H3. However, 48h-weaned tissue present a different situation; nuclei of adipocytes surrounding the epithelial structures were positive for both CAPN1 and H3. It is important to highlight that this colocalization was not observed in epithelial cells committed to cell death that were shed into the lumen of the alveoli (figure 48). These results strongly suggest that CAPN1 and H3 relationship is not related to cell death in mammary gland involution, but rather to another cellular process occurring mainly in adipocytes.

In order to understand the effect of this interaction, we performed experiments using different Histone H3 antibodies. Immunoblots of nuclear extracts were probed against these antibodies (including H3 C-terminal and N-terminal or H3K4me3 and H3K27me3). As can be observed in figure 49, a faster migrating band (H3 truncated, H3^t) was detected in samples corresponding to 48h weaning onwards. Notably, this lower band was only observed when using a Histone H3 general

antibody against the C-terminus or an H3K27me3 antibody; in contrast it was not recognized by H3K4me3 and the NH₂-H3 antibodies. Taken together, these results suggested that an amino-terminal fragment of Histone H3 was missing during mammary gland involution. To ensure that the H3^t observed physiologically was the product of calpain activity, nuclear extracts from calpeptin-treated or *calpain1*-knockdown (treated locally with siRNA) mice were obtained. Immunoblots against the battery of H3 antibodies were performed on these nuclear extracts at 72h weaning, and demonstrated that, upon CAPN1 inhibition (either pharmacologically or by *siRNA* silencing), the Histone H3 fragment was clearly diminished (figures 49B and 49C).

Therefore, we show here for the first time that Histone H3 is a new target of CAPN1. Moreover, although Histone H3 cleavage mediated by other cysteine proteases has been described in cultured cells (Duncan et al 2008), to our knowledge this is the first indication of an *in vivo* endogenous cleavage of H3 in mammals. Our *in vivo* and *in vitro* experiments revealed that CAPN1 cleaves the amino-terminal tail of Histone H3. Besides, the *in vitro* experiments showed that CAPN1 can cleave H3 in a direct fashion (figures 50-52). Regarding the specificity of CAPN1 mediated H3-cleavage versus CAPN2, we can conclude that the latter cysteine proteases are not involved in this process for several reasons: CAPN2, as mentioned above, is not present at the chromatin enriched fraction (figure 46). Moreover, silencing CAPN1 with siRNA increased the intact/cleaved-H3 ratio at 72h weaning (figure 49B); the same using calpeptin (figure 49C). Nevertheless, we cannot exclude a role for other cysteine proteases throughout the time course of mammary gland involution.

We established that CAPN1 proteolyzes Histone H3, but the precise cleavage site is unknown. In order to identify the cleaved product, an *in vitro* protease reaction was performed. A fragmented histone was observed when rH3 and rCAPN1 were incubated (figure 50). Furthermore, the band from the cleaved-product (labeled with an asterisk) was excised from the gel, analyzed by mass spectrometry and identified as Histone H3 (12% coverage and score of 33, 4). Based on a molecular weight comparison between bands corresponding to intact and cleaved-H3, CAPN1 cleavage site on Histone H3 was predicted to be on the N-terminal tail approximately at K9-S10 (figure 50), residues that are highly conserved among species. The CAPN-

cleavage prediction method, based on Multiple Kernel Learning algorithms (DuVerle *et al.* 2011), also predicts the same cleavage site (score 0.14) on Histone H3. This prediction would explain why the fragment could not be observed when using H3 antibodies against the cleaved-portion.

Further *in vitro* experiments were performed to confirm this cleavage. Isolated nuclei from control lactating or 48h weaned mammary glands were exposed to rCAPN1 or rH3. As can be seen in figure 51, H3^t appeared in the nuclei of 48h-weaned glands, where calpains were already activated, and it was slightly increased after the addition of rH3; similar results were obtained with nuclear extracts from 72h-weaned samples (figure 51B). However, the addition of calpeptin reduced the levels of H3^t. Similarly, increased concentration of rCAPN1 incubation with nuclear extracts from control lactating glands produced a proportional H3^t (figure 52A), while the same experiment with calpeptin prevented this cleavage (figure 52B). These results provide solid evidence that CAPN1 is responsible for Histone H3 cleavage during mammary gland involution.

CAPN1 is a regulator of adipocyte differentiation in *in vitro* models and embryonic development (Yajima *et al.* 2006). Although the functional consequences of CAPN1-mediated cleavage of Histone H3 remain elusive, it is tempting to speculate that removal of epigenetic marks might serve to change the epigenetic signature of selected genes upon adipocyte differentiation. The same hypothesis was already managed to explain the effect of Cathepsin L on H3 proteolysis in cultured embryonic stem cells (Duncan *et al.* 2008). Alternatively, Histone H3 proteolysis could be understood as a potential mode of transcriptional regulation by the creation of new H3 amino-terminal tails to establish a new epigenetic program. Removal of repressive epigenetic marks on differentiation genes, or prevention of new activating marks on pluripotency genes, would render the precise pattern of gene expression during adipocyte differentiation.

In addition, epigenetic marks on Histone H3 could recruit CAPN1 to selected genes leading to cleaved-H3. It has been published that the promoters of genes playing key functions in development and differentiation processes present the bivalent signal H3K4me3 and H3K27me3 (Verrier *et al.* 2011). The nuclear

localization of these “bivalent” genes was found along the nuclear border in immature cells and dramatically rearranged towards the central nucleoplasm in differentiated cells (Musri et al 2006; Szczerbal *et al.* 2009). Based on our results and these previous works, CAPN1 localized at the nuclear periphery could proteolyze Histone H3 at the promoters of adipogenic genes with this bivalent signal (figure 53). However, we cannot exclude an alternative or additional role for CAPN1 on transcription factors bound to gene promoters (Patel *et al.* 1999; Yajima *et al.* 2006).

BIOMEDICAL IMPLICATIONS

In the present study we have reviewed the major role that calpains play in the involution of the mammary gland after the pregnancy/lactation cycle. Compelling evidence shows that these proteases play a role in overlapping processes during involution. On the one hand, CAPN’s targets within the lysosomal, mitochondrial and nuclear membranes, induce membrane leakiness and favors cell death. Meanwhile, CAPN1 is most probably involved in the modulation of pre-adipocytes differentiation to mature adipocytes through chromatin remodeling. In this sense, both the pro-apoptotic and pro-survival signals have to be well modulated in order to not send equivocal messages that could favour an oncogenic event or its progression.

As it was explained in the introduction section, the key pathways that control mammary gland involution are well-known cancer-related pathway (STAT family, NF- κ B, NO, PI3K/AKT and different proteases such as calpains, metalloproteinases, cathepsins, caspases, etc) (Li *et al.* 1997; Brantley *et al.* 2000; Moorehead *et al.* 2001; Baxter *et al.* 2007; Zaragozá *et al.* 2009). As regards, this project shed further light into calpains function in order to gain a better understanding of the mechanisms that regulate this process, since deregulation of their activity could lead to cell transformation and breast cancer development (Storr *et al.* 2012). Indeed, there is a direct correlation between expression of the large catalytic subunit of CAPN2 and the clinical outcome of patients with triple-negative and basal-like disease. Those patients with basal-like or triple-negative disease with low level of CAPN2 expression had similar breast cancer-specific survival to non-

basal- or receptor- (estrogen, progesterone or human epidermal growth factor receptor 2) positive disease.

On the other hand, from an epidemiological point of view, pregnancy is associated with a reduction in woman's lifetime risk of developing breast cancer (Schedin *et al.* 2007; Viña 2012). Actually, reproductive factors were linked with breast cancer's incidence. For instance, women with multiple births with an early age at first birth have significant lower incidence (approximately 50%) when compared with women with a single birth at a late age (Rosner *et al.* 1994). However, recent studies in breast cancer incidence have demonstrated a transient increase of this pathology in the years immediately following pregnancy (Lyons *et al.* 2011; Viña 2012). One of the hypotheses to explain the increased risk in breast cancer associated with pregnancy postulates that, mammary gland involution implies the activation of certain mechanisms that resemble protumorigenic, wound-healing and pro-inflammatory micro-environment (Schedin *et al.* 2007). As a consequence, post-lactational mammary gland regression can be an excellent experimental model to study not only the molecular clues of pregnancy- associated breast cancer, but also cell death and tissue remodeling mechanisms.

CONCLUSIONS

In the present study, we have contributed to elucidate the role of calpains during programmed cell death and tissue remodeling of the mammary gland after the pregnancy/lactation cycle.

1. Lysosomal, mitochondrial, and nuclear calpain translocation is involved in the subsequent organelle membrane destabilization, leading to epithelial cell death. Lysosomal leaking is the first step involved in the epithelial programmed cell death.

2. Calpains translocate to lysosomal membranes, where they proteolyze lysosome-associated membrane proteins. 2D-DIGE analysis has allowed us to identify for the first time, VATB2 and LAMP2a as calpain targets within the lysosomal membrane. Mitochondrial calpain translocation is involved in the destabilization of mitochondrial membrane, triggering cytochrome c release. Calpains are also able to translocate to nuclear membrane of epithelial cells, degrading nucleoporins localized in peripheral positions of the nuclear pore complex.

3. CAPN1 has also been found in adipocytes within stromal tissue. This protease is involved in the differentiation process of adipocytes during mammary gland postlactational remodeling, playing a different role than the one observed in epithelial cells.

4. Histone H3, was first identified as a nuclear target of CAPN1 in adipocytes. The proteolysis occurs in the aminoterminal domain of the protein, around lysine in position 9 and serine in position 10. The removal of this aminoterminal domain would induce chromatin remodeling during adipogenesis.

Results presented herein reveal that calpains, which are activated during weaning, have a dual role in mammary gland involution. In epithelial structures they promote destabilization of lysosomal, mitochondrial and nuclear membranes, triggering cell death. Meanwhile in mammary fat pad, CAPN1 is involved in adipocyte differentiation in order to achieve the pre-pregnant state of the gland.

BIBLIOGRAFÍA

ABE, K. and TAKEICHI, M., 2007. NMDA-receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression. *Neuron*, **53**(3), pp. 387-397.

ABELL, K., BILANCIO, A., CLARKSON, R.W., TIFFEN, P.G., ALTAPARMAKOV, A.I., BURDON, T.G., ASANO, T., VANHAESEBROECK, B. and WATSON, C.J., 2005. Stat3-induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. *Nature cell biology*, **7**(4), pp. 392-398.

ALEXANDROVA, M., 1986. Glucocorticoid receptor of rat mammary gland during pregnancy and lactation. *Endocrinologia experimentalis*, **20**(2-3), pp. 293-300.

ANANTAMONGKOL, U., AO, M., SARATHY NEE VENKATASUBRAMANIAN, J., DEVI, Y.S., KRISHNAMRA, N. and RAO, M.C., 2012. Prolactin and dexamethasone regulate second messenger-stimulated cl(-) secretion in mammary epithelia. *Journal of signal transduction*, **2012**, pp. 192142.

ANKARCRONA, M., DYPBUKT, J.M., BONFOCO, E., ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S., LIPTON, S.A. and NICOTERA, P., 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, **15**(4), pp. 961-973.

ARNANDIS, T., FERRER-VICENS, I., GARCIA-TREVIJANO, E.R., MIRALLES, V.J., GARCIA, C., TORRES, L., VIÑA, J.R. and ZARAGOZA, R., 2012. Calpains mediate epithelial-cell death during mammary gland involution: mitochondria and lysosomal destabilization. *Cell death and differentiation*, **19**(9), pp. 1536-1548.

AVERNA, M., DE TULLIO, R., CAPINI, P., SALAMINO, F., PONTREMOLI, S. and MELLONI, E., 2003. Changes in calpastatin localization and expression during calpain activation: a new mechanism for the regulation of intracellular Ca²⁺-dependent proteolysis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **60**(12), pp. 2669-2678.

BADUGU, R., GARCIA, M., BONDADA, V., JOSHI, A. and GEDDES, J.W., 2008. N terminus of calpain 1 is a mitochondrial targeting sequence. *The Journal of biological chemistry*, **283**(6), pp. 3409-3417.

BANO, D., DINSDALE, D., CABRERA-SOCORRO, A., MAIDA, S., LAMBACHER, N., MCCOLL, B., FERRANDO-MAY, E., HENGARTNER, M.O. and NICOTERA, P., 2010. Alteration of the nuclear pore complex in Ca²⁺ mediated cell death. *Cell death and differentiation*, **17**(1), pp. 119-133.

BATTAGLIA, F., TRINCHESE, F., LIU, S., WALTER, S., NIXON, R.A. and ARANCIO, O., 2003. Calpain inhibitors, a treatment for Alzheimer's disease: position paper. *Journal of molecular neuroscience: MN*, **20**(3), pp. 357-362.

BAXTER, F.O., NEOH, K. and TEVENDALE, M.C., 2007. The beginning of the end: death signaling in early involution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **12**(1), pp. 3-13.

BENAUD, C., DICKSON, R.B. and THOMPSON, E.W., 1998. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast cancer research and treatment*, **50**(2), pp. 97-116.

- BEN-JONATHAN, N., HUGO, E.R., BRANDEBOURG, T.D. and LAPENSEE, C.R., 2006. Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **17**(3), pp. 110-116.
- BERG, C.P., ENGELS, I.H., ROTHBART, A., LAUBER, K., RENZ, A., SCHLOSSER, S.F., SCHULZE-OSTHOFF, K. and WESSELBORG, S., 2001. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell death and differentiation*, **8**(12), pp. 1197-1206.
- BERTIPAGLIA, I. and CARAFOLI, E., 2007. Calpains and human disease. *Sub-cellular biochemistry*, **45**, pp. 29-53.
- BERTUCCI, P.Y., QUAGLINO, A., POZZI, A.G., KORDON, E.C. and PECCI, A., 2010. Glucocorticoid-induced impairment of mammary gland involution is associated with STAT5 and STAT3 signaling modulation. *Endocrinology*, **151**(12), pp. 5730-5740.
- BEVERS, M.B. and NEUMAR, R.W., 2008. Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **28**(4), pp. 655-673.
- BEYENBACH, K.W. and WIECZOREK, H., 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of experimental biology*, **209**(Pt 4), pp. 577-589.
- BICKEL, P.E., TANSEY, J.T. and WELTE, M.A., 2009. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochimica et biophysica acta*, **1791**(6), pp. 419-440.
- BIZAT, N., HERMEL, J.M., BOYER, F., JACQUARD, C., CREMINON, C., OUARY, S., ESCARTIN, C., HANTRAYE, P., KAJEWSKI, S. and BROUILLET, E., 2003. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**(12), pp. 5020-5030.
- BOSCH, A. 2013 Role of the NF- κ B pathway and nitric oxide in mammary gland involution after weaning. Implications in breast cancer. *Tesis defendida en la Universidad de Valencia*.
- BONDAREVA, L.A. and NEMOVA, N.N., 2008. Molecular evolution of intracellular Ca²⁺-dependent proteases. *Bioorganicheskaia khimiia*, **34**(3), pp. 295-302.
- BONFOCO, E., CECCATELLI, S., MANZO, L. and NICOTERA, P., 1995. Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Experimental cell research*, **218**(1), pp. 189-200.
- BOOTH, B.W. and SMITH, G.H., 2007. Roles of transforming growth factor-alpha in mammary development and disease. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, **25**(4), pp. 227-235.
- BORRAS, C., GAMBINI, J., LOPEZ-GRUESO, R., PALLARDO, F.V. and VIÑA, J., 2010. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, **1802**(1), pp. 205-211.
- BRANTLEY, D.M., YULL, F.E., MURAOKA, R.S., HICKS, D.J., COOK, C.M. and KERR, L.D., 2000. Dynamic expression and activity of NF-kappaB during post-natal mammary gland morphogenesis. *Mechanisms of development*, **97**(1-2), pp. 149-155.

- BRIGUET, A., ERB, M., COURDIÉ-FRUH, I., BARZAGHI, P., SANTOS, G., HERZNER, H., LESCOP, C., SIENDT, H., HENNEBOEHLE, M., WEYERMANN, P., MAGYAR, J.P., DUBACH-POWELL, J., METZ, G. and MEIER, T., 2008. Effect of calpain and proteasome inhibition on Ca²⁺-dependent proteolysis and muscle histopathology in the mdx mouse. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **22**(12), pp. 4190-4200.
- BROKER, L.E., KRUYT, F.A. and GIACCONE, G., 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **11**(9), pp. 3155-3162.
- BRUNE, B., VON KNETHEN, A. and SANDAU, K.B., 1999. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell death and differentiation*, **6**(10), pp. 969-975.
- BURACZYNSKA, M., WACINSKI, P., STEC, A. and KUCZMASZEWSKA, A., 2013. Calpain-10 gene polymorphisms in type 2 diabetes and its micro- and macrovascular complications. *Journal of diabetes and its complications*, **27**(1), pp. 54-58.
- CAFFAREL, M.M., ZARAGOZA, R., PENSA, S., LI, J., GREEN, A.R. and WATSON, C.J., 2012. Constitutive activation of JAK2 in mammary epithelium elevates Stat5 signalling, promotes alveologenesis and resistance to cell death, and contributes to tumourigenesis. *Cell death and differentiation*, **19**(3), pp. 511-522.
- CAMPBELL, R.L. and DAVIES, P.L., 2012. Structure-function relationships in calpains. *The Biochemical journal*, **447**(3), pp. 335-351.
- CAO, G., XING, J., XIAO, X., LIOU, A.K., GAO, Y., YIN, X.M., CLARK, R.S., GRAHAM, S.H. and CHEN, J., 2007. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**(35), pp. 9278-9293.
- CASEY, T.M. and PLAUT, K., 2007. The role of glucocorticoids in secretory activation and milk secretion, a historical perspective. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **12**(4), pp. 293-304.
- CASTINO, R., DELPAL, S., BOUGUYON, E., DEMOZ, M., ISIDORO, C. and OLLIVIER-BOUSQUET, M., 2008. Prolactin promotes the secretion of active cathepsin D at the basal side of rat mammary acini. *Endocrinology*, **149**(8), pp. 4095-4105.
- CHAE, J., MINAMI, N., JIN, Y., NAKAGAWA, M., MURAYAMA, K., IGARASHI, F. and NONAKA, I., 2001. Calpain 3 gene mutations: genetic and clinico-pathologic findings in limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders: NMD*, **11**(6-7), pp. 547-555.
- CHAKRABORTI, S., ALAM, M.N., PAIK, D., SHAIKH, S. and CHAKRABORTI, T., 2012. Implications of calpains in health and diseases. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, **49**(5), pp. 316-328.
- CHANG, H., ZHANG, L., XU, P.T., LI, Q., SHENG, J.J., WANG, Y.Y., CHEN, Y., ZHANG, L.N. and YU, Z.B., 2011. Nuclear translocation of calpain-2 regulates propensity toward apoptosis in cardiomyocytes of tail-suspended rats. *Journal of cellular biochemistry*, **112**(2), pp. 571-580.

- CHAPMAN, R.S., LOURENCO, P., TONNER, E., FLINT, D., SELBERT, S., TAKEDA, K., AKIRA, S., CLARKE, A.R. and WATSON, C.J., 2000. The role of Stat3 in apoptosis and mammary gland involution. Conditional deletion of Stat3. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **480**, pp. 129-138.
- CHAPMAN, R.S., LOURENCO, P.C., TONNER, E., FLINT, D.J., SELBERT, S., TAKEDA, K., AKIRA, S., CLARKE, A.R. and WATSON, C.J., 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes & development*, **13**(19), pp. 2604-2616.
- CHEN, M., HE, H., ZHAN, S., KRAJEWSKI, S., REED, J.C. and GOTTLIEB, R.A., 2001. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion. *The Journal of biological chemistry*, **276**(33), pp. 30724-30728.
- CHOU, J.S., IMPENS, F., GEVAERT, K. and DAVIES, P.L., 2011. m-Calpain activation in vitro does not require autolysis or subunit dissociation. *Biochimica et biophysica acta*, **1814**(7), pp. 864-872.
- CHOU, S.M., HUANG, T.H., CHEN, H.C. and LI, T.K., 2011. Calcium-induced cleavage of DNA topoisomerase I involves the cytoplasmic-nuclear shuttling of calpain 2. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **68**(16), pp. 2769-2784.
- CHU, E.Y., HENS, J., ANDL, T., KAIRO, A., YAMAGUCHI, T.P., BRISKEN, C., GLICK, A., WYSOLMERSKI, J.J. and MILLAR, S.E., 2004. Canonical WNT signaling promotes mammary placode development and is essential for initiation of mammary gland morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, **131**(19), pp. 4819-4829.
- CHWIERALSKI, C.E., WELTE, T. and BUHLING, F., 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, **11**(2), pp. 143-149.
- CIRMAN, T., ORESIC, K., MAZOVEC, G.D., TURK, V., REED, J.C., MYERS, R.M., SALVESEN, G.S. and TURK, B., 2004. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *The Journal of biological chemistry*, **279**(5), pp. 3578-3587.
- CLARKSON, R.W., HEELEY, J.L., CHAPMAN, R., AILLET, F., HAY, R.T., WYLLIE, A. and WATSON, C.J., 2000. NF-kappaB inhibits apoptosis in murine mammary epithelia. *The Journal of biological chemistry*, **275**(17), pp. 12737-12742.
- CLARKSON, R.W. and WATSON, C.J., 1999. NF-kappaB and apoptosis in mammary epithelial cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **4**(2), pp. 165-175.
- CONG, M., GOLL, D.E. and ANTIN, P.B., 1998. cAMP responsiveness of the bovine calpastatin gene promoter. *Biochimica et biophysica acta*, **1443**(1-2), pp. 186-192.
- CONNELLY, L., BARHAM, W., PIGG, R., SAINT-JEAN, L., SHERRILL, T., CHENG, D.S., CHODOSH, L.A., BLACKWELL, T.S. and YULL, F.E., 2010. Activation of nuclear factor kappa B in mammary epithelium promotes milk loss during mammary development and infection. *Journal of cellular physiology*, **222**(1), pp. 73-81.
- COTTIN, P., POUSSARD, S., DARGELOS, E., BALCERZAK, D., ARAGON, B., BRUSTIS, J.J. and DUCASTAING, A., 2000. Calpains and myogenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **144**, pp. 173-180.

- CROALL, D.E. and ERSFELD, K., 2007. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome biology*, **8**(6), pp. 218.
- CUERVO, A.M. and DICE, J.F., 2000. Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **1**(7), pp. 570-583.
- D'ANGELO, M.A., RAICES, M., PANOWSKI, S.H. and HETZER, M.W., 2009. Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells. *Cell*, **136**(2), pp. 284-295.
- DARGELOS, E., POUSSARD, S., BRULE, C., DAURY, L. and COTTIN, P., 2008. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie*, **90**(2), pp. 359-368.
- DAVIS, K.L., MARTIN, E., TURKO, I.V. and MURAD, F., 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **41**, pp. 203-236.
- DEDIEU, S., POUSSARD, S., MAZERES, G., GRISE, F., DARGELOS, E., COTTIN, P. and BRUSTIS, J.J., 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Experimental cell research*, **292**(1), pp. 187-200.
- DELMAS, C., ARAGOU, N., POUSSARD, S., COTTIN, P., DARBON, J.M. and MANENTI, S., 2003. MAP kinase-dependent degradation of p27Kip1 by calpains in choroidal melanoma cells. Requirement of p27Kip1 nuclear export. *The Journal of biological chemistry*, **278**(14), pp. 12443-12451.
- DEMARCHI, F. and SCHNEIDER, C., 2007. The calpain system as a modulator of stress/damage response. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **6**(2), pp. 136-138.
- DIETZE, E.C., BOWIE, M.L., MROZEK, K., CALDWELL, L.E., NEAL, C., MARJORAM, R.J., TROCH, M.M., BEAN, G.R., YOKOYAMA, K.K., IBARRA, C.A. and SEEWALDT, V.L., 2005. CREB-binding protein regulates apoptosis and growth of HMECs grown in reconstituted ECM via laminin-5. *Journal of cell science*, **118**(Pt 21), pp. 5005-5022.
- DIMRI, G., BAND, H. and BAND, V., 2005. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast cancer research: BCR*, **7**(4), pp. 171-179.
- DOURDIN, N., BRUSTIS, J.J., BALCERZAK, D., ELAMRANI, N., POUSSARD, S., COTTIN, P. and DUCASTAING, A., 1997. Myoblast fusion requires fibronectin degradation by exteriorized m-calpain. *Experimental cell research*, **235**(2), pp. 385-394.
- DROGA-MAZOVEC, G., BOJIC, L., PETELIN, A., IVANOVA, S., ROMIH, R., REPNIK, U., SALVESEN, G.S., STOKA, V., TURK, V. and TURK, B., 2008. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *The Journal of biological chemistry*, **283**(27), pp. 19140-19150.
- DUFTY, B.M., WARNER, L.R., HOU, S.T., JIANG, S.X., GOMEZ-ISLA, T., LEENHOUTS, K.M., OXFORD, J.T., FEANY, M.B., MASLIAH, E. and ROHN, T.T., 2007. Calpain-cleavage of alpha-synuclein: connecting proteolytic processing to disease-linked aggregation. *The American journal of pathology*, **170**(5), pp. 1725-1738.

- DUNCAN, E.M., MURATORE-SCHROEDER, T.L., COOK, R.G., GARCIA, B.A., SHABANOWITZ, J., HUNT, D.F. and ALLIS, C.D., 2008. Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell*, **135**(2), pp. 284-294.
- DUPONT, J., RENO, J.P., SHANI, M., HENNIGHAUSEN, L. and LEROITH, D., 2002. PTEN overexpression suppresses proliferation and differentiation and enhances apoptosis of the mouse mammary epithelium. *The Journal of clinical investigation*, **110**(6), pp. 815-825.
- DUTT, P., ARTHUR, J.S., CROALL, D.E. and ELCE, J.S., 1998. m-Calpain subunits remain associated in the presence of calcium. *FEBS letters*, **436**(3), pp. 367-371.
- DUTT, P., CROALL, D.E., ARTHUR, J.S., VEYRA, T.D., WILLIAMS, K., ELCE, J.S. and GREER, P.A., 2006. m-Calpain is required for preimplantation embryonic development in mice. *BMC developmental biology*, **6**, pp. 3.
- DUTT, P., SPRIGGS, C.N., DAVIES, P.L., JIA, Z. and ELCE, J.S., 2002. Origins of the difference in Ca²⁺ requirement for activation of mu- and m-calpain. *The Biochemical journal*, **367**(Pt 1), pp. 263-269.
- DUVERLE, D.A. and MAMITSUKA, H., 2012. A review of statistical methods for prediction of proteolytic cleavage. *Briefings in bioinformatics*, **13**(3), pp. 337-349.
- DUVERLE, D.A., ONO, Y., SORIMACHI, H. and MAMITSUKA, H., 2011. Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning. *PloS one*, **6**(5), pp. e19035.
- FANIN, M., NASCIMBENI, A.C., FULIZIO, L., TREVISAN, C.P., MEZGARIC-PETRUSA, M. and ANGELINI, C., 2003. Loss of calpain-3 autocatalytic activity in LGMD2A patients with normal protein expression. *The American journal of pathology*, **163**(5), pp. 1929-1936.
- FEHRENBACHER, N., BASTHOLM, L., KIRKEGAARD-SORENSEN, T., RAFN, B., BOTTZAUW, T., NIELSEN, C., WEBER, E., SHIRASAWA, S., KALLUNKI, T. and JAATTELA, M., 2008. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer research*, **68**(16), pp. 6623-6633.
- FERNANDEZ-MONTALVAN, A., ASSFALG-MACHLEIDT, I., PFEILER, D., FRITZ, H., JOCHUM, M. and MACHLEIDT, W., 2006. Mu-calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca²⁺-activated conformation. *Biological chemistry*, **387**(5), pp. 617-627.
- FIANDALO, M.V. and KYPRIANOU, N., 2012. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Experimental oncology*, **34**(3), pp. 165-175.
- FLINT, D.J., 1982. Regulation of insulin receptors by prolactin in lactating rat mammary gland. *The Journal of endocrinology*, **93**(2), pp. 279-285.
- FRANCO, S.J. and HUTTENLOCHER, A., 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of cell science*, **118**(Pt 17), pp. 3829-3838.

- FURTH, P.A., BAR-PELED, U. and LI, M., 1997. Apoptosis and mammary gland involution: reviewing the process. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, **2**(1), pp. 19-24.
- GAFNI, J., CONG, X., CHEN, S.F., GIBSON, B.W. and ELLERBY, L.M., 2009. Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *The Journal of biological chemistry*, **284**(37), pp. 25441-25449.
- GALLEGO, M.I., BINART, N., ROBINSON, G.W., OKAGAKI, R., COSCHIGANO, K.T., PERRY, J., KOPCHICK, J.J., OKA, T., KELLY, P.A. and HENNIGHAUSEN, L., 2001. Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. *Developmental biology*, **229**(1), pp. 163-175.
- GARCIA, M., BONDADA, V. and GEDDES, J.W., 2005. Mitochondrial localization of mu-calpain. *Biochemical and biophysical research communications*, **338**(2), pp. 1241-1247.
- GARCIA-DORADO, D., RUIZ-MEANA, M., INSERTE, J., RODRIGUEZ-SINOVAS, A. and PIPER, H.M., 2012. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovascular research*, **94**(2), pp. 168-180.
- GARG, S., TIMM, T., MANDELKOW, E.M., MANDELKOW, E. and WANG, Y., 2011. Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment. *Neurobiology of aging*, **32**(1), pp. 1-14.
- GARNHAM, C.P., HANNA, R.A., CHOU, J.S., LOW, K.E., GOURLAY, K., CAMPBELL, R.L., BECKMANN, J.S. and DAVIES, P.L., 2009. Limb-girdle muscular dystrophy type 2A can result from accelerated autoproteolytic inactivation of calpain 3. *Biochemistry*, **48**(15), pp. 3457-3467.
- GEYER, P.K., VITALINI, M.W. and WALLRATH, L.L., 2011. Nuclear organization: taking a position on gene expression. *Current opinion in cell biology*, **23**(3), pp. 354-359.
- GHAYUR, T., BANERJEE, S., HUGUNIN, M., BUTLER, D., HERZOG, L., CARTER, A., QUINTAL, L., SEKUT, L., TALANIAN, R., PASKIND, M., WONG, W., KAMEN, R., TRACEY, D. and ALLEN, H., 1997. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, **386**(6625), pp. 619-623.
- GIL-PARRADO, S., POPP, O., KNOCH, T.A., ZAHLER, S., BESTVATER, F., FELGENTRAGER, M., HOLLOSCHI, A., FERNANDEZ-MONTALVAN, A., AUERSWALD, E.A., FRITZ, H., FUENTES-PRIOR, P., MACHLEIDT, W. and SPIESS, E., 2003. Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. *The Journal of biological chemistry*, **278**(18), pp. 16336-16346.
- GLADING, A., BODNAR, R.J., REYNOLDS, I.J., SHIRAHA, H., SATISH, L., POTTER, D.A., BLAIR, H.C. and 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), pp. 2499-2512.
- GLADING, A., LAUFFENBURGER, D.A. and WELLS, A., 2002. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends in cell biology*, **12**(1), pp. 46-54.

- GOICHEVA, V., ZENG, W., KE, D., KLIMSTRA, D., REINHECKEL, T., PETERS, C., HANAHAN, D. and JOYCE, J.A., 2006. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes & development*, **20**(5), pp. 543-556.
- GOLL, D.E., THOMPSON, V.F., LI, H., WEI, W. and CONG, J., 2003. The calpain system. *Physiological Reviews*, **83**(3), pp. 731-801.
- GONZALEZ-SUAREZ, E., JACOB, A.P., JONES, J., MILLER, R., ROUDIER-MEYER, M.P., ERWERT, R., PINKAS, J., BRANSTETTER, D. and DOUGALL, W.C., 2010. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature*, **468**(7320), pp. 103-107.
- GREEN, K.A. and LUND, L.R., 2005. ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **27**(9), pp. 894-903.
- GUROFF, G., 1964. A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *The Journal of biological chemistry*, **239**, pp. 149-155.
- HANAYAMA, R. and NAGATA, S., 2005. Impaired involution of mammary glands in the absence of milk fat globule EGF factor 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(46), pp. 16886-16891.
- HANNA, R.A., GARCIA-DIAZ, B.E. and DAVIES, P.L., 2007. Calpastatin simultaneously binds four calpains with different kinetic constants. *FEBS letters*, **581**(16), pp. 2894-2898.
- HANWELL, A. and LINZELL, J.L., 1973. The effects of engorgement with milk and of suckling on mammary blood flow in the rat. *The Journal of physiology*, **233**(1), pp. 111-125.
- HARICHARAN, S. and LI, Y., 2013. STAT signaling in mammary gland differentiation, cell survival and tumorigenesis. *Molecular and cellular endocrinology*.
- HARRIMAN, J.F., LIU, X.L., ALEO, M.D., MACHACA, K. and SCHNELLMANN, R.G., 2002. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling and calpains mediate renal cell death. *Cell death and differentiation*, **9**(7), pp. 734-741.
- HASSIOTOU, F. and GEDDES, D., 2013. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical anatomy (New York, N. Y.)*, **26**(1), pp. 29-48.
- HATA, S. and SORIMACHI, H., 2007. New biology of calpain in relation with intracellular membrane systems. *Seikagaku. The Journal of Japanese Biochemical Society*, **79**(1), pp. 46-50.
- HAUPT, S., BERGER, M., GOLDBERG, Z. and HAUPT, Y., 2003. Apoptosis - the p53 network. *Journal of cell science*, **116**(Pt 20), pp. 4077-4085.
- HAWSAWI, Y., EL-GENDY, R., TWELVES, C., SPEIRS, V. and BEATTIE, J., 2013. Insulin-like growth factor - Oestradiol crosstalk and mammary gland tumourigenesis. *Biochimica et biophysica acta*, **1836**(2), pp. 345-353.
- HENNIGHAUSEN, L. and ROBINSON, G.W., 2005. Information networks in the mammary gland. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **6**(9), pp. 715-725.

- HO, W.C., PIKOR, L., GAO, Y., ELLIOTT, B.E. and GREER, P.A., 2012. Calpain 2 regulates Akt-FoxO-p27(Kip1) protein signaling pathway in mammary carcinoma. *The Journal of biological chemistry*, **287**(19), pp. 15458-15465.
- HOFFMANN, A., LEVCHENKO, A., SCOTT, M.L. and BALTIMORE, D., 2002. The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science (New York, N.Y.)*, **298**(5596), pp. 1241-1245.
- HONDA, S., MARUMOTO, T., HIROTA, T., NITTA, M., ARIMA, Y., OGAWA, M. and SAYA, H., 2004. Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the metaphase plate during mitosis. *The Journal of biological chemistry*, **279**(11), pp. 10615-10623.
- HOOD, J.L., BROOKS, W.H. and ROSZMAN, T.L., 2006. Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: an organelle transient. *BioEssay : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **28**(8), pp. 850-859.
- HOOD, J.L., BROOKS, W.H. and ROSZMAN, T.L., 2004. Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *The Journal of biological chemistry*, **279**(41), pp. 43126-43135.
- HOVEY, R.C. and TROTT, J.F., 2004. Morphogenesis of mammary gland development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **554**, pp. 219-228.
- HOWLETT, A.R. and BISSELL, M.J., 1993. The influence of tissue microenvironment (stroma and extracellular matrix) on the development and function of mammary epithelium. *Epithelial cell biology*, **2**(2), pp. 79-89.
- HUA, C.T., HOPWOOD, J.J., CARLSSON, S.R., HARRIS, R.J. and MEIKLE, P.J., 1998. Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders. *Clinical chemistry*, **44**(10), pp. 2094-2102.
- HUGHES, K., WICKENDEN, J.A., ALLEN, J.E. and WATSON, C.J., 2012. Conditional deletion of Stat3 in mammary epithelium impairs the acute phase response and modulates immune cell numbers during post-lactational regression. *The Journal of pathology*, **227**(1), pp. 106-117.
- HURTADO DEL POZO, C., CALVO, R.M., VESPERINAS-GARCIA, G., GOMEZ-AMBROSI, J., FRUHBECK, G., CORRIPIO-SANCHEZ, R., RUBIO, M.A. and OBREGON, M.J., 2010. IPO8 and FBXL10: new reference genes for gene expression studies in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, **18**(5), pp. 897-903.
- HUTCHINSON, J., JIN, J., CARDIFF, R.D., WOODGETT, J.R. and MULLER, W.J., 2001. Activation of Akt (protein kinase B) in mammary epithelium provides a critical cell survival signal required for tumor progression. *Molecular and cellular biology*, **21**(6), pp. 2203-2212.
- IAVNILOVITCH, E., GRONER, B. and BARASH, I., 2002. Overexpression and forced activation of stat5 in mammary gland of transgenic mice promotes cellular proliferation, enhances differentiation, and delays postlactational apoptosis. *Molecular cancer research: MCR*, **1**(1), pp. 32-47.

IIZUKA, T., SASAKI, M., OISHI, K., UEMURA, S. and KOIKE, M., 1998. The presence of nitric oxide synthase in the mammary glands of lactating rats. *Pediatric research*, **44**(2), pp. 197-200.

ISHIURA, S., MUROFUSHI, H., SUZUKI, K. and IMAHORI, K., 1978. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization. *Journal of Biochemistry*, **84**(1), pp. 225-230.

ISHIURA, S., SUGITA, H., SUZUKI, K. and IMAHORI, K., 1979. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. II. Substrate specificity. *Journal of Biochemistry*, **86**(2), pp. 579-581.

KANZLER, S. and GALLE, P.R., 2000. Apoptosis and the liver. *Seminars in cancer biology*, **10**(3), pp. 173-184.

KAR, P., SAMANTA, K., SHAIKH, S., CHOWDHURY, A., CHAKRABORTI, T. and CHAKRABORTI, S., 2010. Mitochondrial calpain system: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **495**(1), pp. 1-7.

KAUR, J., MENCL, S., SAHABOGLU, A., FARINELLI, P., VAN VEEN, T., ZRENNER, E., EKSTROM, P., PAQUET-DURAND, F. and ARANGO-GONZALEZ, B., 2011. Calpain and PARP activation during photoreceptor cell death in P23H and S334ter rhodopsin mutant rats. *PloS one*, **6**(7), pp. e22181.

KAWAKUBO, T., YASUKOCHI, A., TSUKUBA, T., KADOWAKI, T. and YAMAMOTO, K., 2008. Gene expression profiling of mammary glands of cathepsin E-deficient mice compared with wild-type littermates. *Biochimie*, **90**(2), pp. 396-404.

KAWASHIMA, S. and SAIDO, T.C., 1992. Physiological function of calpains. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, **37**(12), pp. 2144-2160.

KHALKHALI-ELLIS, Z., ABBOTT, D.E., BAILEY, C.M., GOOSSENS, W., MARGARYAN, N.V., GLUCK, S.L., REUVENI, M. and HENDRIX, M.J., 2008. IFN-gamma regulation of vacuolar pH, cathepsin D processing and autophagy in mammary epithelial cells. *Journal of cellular biochemistry*, **105**(1), pp. 208-218.

KHALKHALI-ELLIS, Z. and HENDRIX, M.J., 2007. Elucidating the function of secreted maspin: inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation. *Cancer research*, **67**(8), pp. 3535-3539.

KIDD, V.J., LAHTI, J.M. and TEITZ, T., 2000. Proteolytic regulation of apoptosis. *Seminars in cell & developmental biology*, **11**(3), pp. 191-201.

KIM, M.J., JO, D.G., HONG, G.S., KIM, B.J., LAI, M., CHO, D.H., KIM, K.W., BANDYOPADHYAY, A., HONG, Y.M., KIM, D.H., CHO, C., LIU, J.O., SNYDER, S.H. and JUNG, Y.K., 2002. Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(15), pp. 9870-9875.

KORDON, E.C. and SMITH, G.H., 1998. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development (Cambridge, England)*, **125**(10), pp. 1921-1930.

KOSENKO, E., POGHOSYAN, A. and KAMINSKY, Y., 2011. Subcellular compartmentalization of proteolytic enzymes in brain regions and the effects of chronic beta-amyloid treatment. *Brain research*, **1369**, pp. 184-193.

KRAMEROVA, I., KUDRYASHOVA, E., TIDBALL, J.G. and SPENCER, M.J., 2004. Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Human molecular genetics*, **13**(13), pp. 1373-1388.

KRAMEROVA, I., KUDRYASHOVA, E., VENKATRAMAN, G. and SPENCER, M.J., 2007. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Human molecular genetics*, **16**(8), pp. 1006.

KREUZALER, P.A., STANISZEWSKA, A.D., LI, W., OMIDVAR, N., KEDJOUAR, B., TURKSON, J., POLI, V., FLAVELL, R.A., CLARKSON, R.W. and WATSON, C.J., 2011. Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nature cell biology*, **13**(3), pp. 303-309.

KRITIKOU, E.A., SHARKEY, A., ABELL, K., CAME, P.J., ANDERSON, E., CLARKSON, R.W. and WATSON, C.J., 2003. A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development (Cambridge, England)*, **130**(15), pp. 3459-3468.

KROEMER, G. and JAATTELA, M., 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nature reviews.Cancer*, **5**(11), pp. 886-897.

KULKARNI, S., SAIDO, T.C., SUZUKI, K. and FOX, J.E., 1999. Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members. *The Journal of biological chemistry*, **274**(30), pp. 21265-21275.

LAEMMLI, U.K., BEGUIN, F. and GUJER-KELLENBERGER, G., 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *Journal of Molecular Biology*, **47**(1), pp. 69-85.

LEBART, M.C. and BENYAMIN, Y., 2006. Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *The FEBS journal*, **273**(15), pp. 3415-3426.

LEE, H.J., GALLEGU-ORTEGA, D., LEDGER, A., SCHRAMEK, D., JOSHI, P., SZWARC, M.M., CHO, C., LYDON, J.P., KHOKHA, R., PENNINGER, J.M. and ORMANDY, C.J., 2013. Progesterone drives mammary secretory differentiation via RankL-mediated induction of Elf5 in luminal progenitor cells. *Development (Cambridge, England)*, **140**(7), pp. 1397-1401.

LEE, H.J. and ORMANDY, C.J., 2012. Interplay between progesterone and prolactin in mammary development and implications for breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, **357**(1-2), pp. 101-107.

LEIST, M. and JAATTELA, M., 2001. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell death and differentiation*, **8**(4), pp. 324-326.

LELOUP, L. and WELLS, A., 2011. Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert opinion on therapeutic targets*, **15**(3), pp. 309-323.

- LI, H., THOMPSON, V.F. and GOLL, D.E., 2004. Effects of autolysis on properties of mu- and m-calpain. *Biochimica et biophysica acta*, **1691**(2-3), pp. 91-103.
- LI, J.J. and XIE, D., 2007. Cleavage of focal adhesion kinase (FAK) is essential in adipocyte differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*, **357**(3), pp. 648-654.
- LI, M., LIU, X., ROBINSON, G., BAR-PELED, U., WAGNER, K.U., YOUNG, W.S., HENNIGHAUSEN, L. and FURTH, P.A., 1997. Mammary-derived signals activate programmed cell death during the first stage of mammary gland involution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**(7), pp. 3425-3430.
- LI, S.Z., ZHANG, H.H., ZHANG, J.N., ZHANG, Z.Y., ZHANG, X.F., ZHANG, X.D. and DU, R.L., 2013. ALLN hinders HCT116 tumor growth through Bax-dependent apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*.
- LIU, F., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., ODA, Y., TOMIZAWA, K. and GONG, C.X., 2005. Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *The Journal of biological chemistry*, **280**(45), pp. 37755-37762.
- LIU, J., LIU, M.C. and WANG, K.K., 2008. Physiological and pathological actions of calpains in glutamatergic neurons. *Science signaling*, **1**(23), pp. tr3.
- LIU, X. and SCHNELLMANN, R.G., 2003. Calpain mediates progressive plasma membrane permeability and proteolysis of cytoskeleton-associated paxillin, talin, and vinculin during renal cell death. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **304**(1), pp. 63-70.
- LOCKSHIN, R.A. and ZAKERI, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **36**(12), pp. 2405-2419.
- LOIZZI, R.F., 1985. Progesterone withdrawal stimulates mammary gland tubulin polymerization in pregnant rats. *Endocrinology*, **116**(6), pp. 2543-2547.
- LOPATNIUK, P. and WITKOWSKI, J.M., 2011. Conventional calpains and programmed cell death. *Acta Biochimica Polonica*, **58**(3), pp. 287-296.
- LUBAHN, D.B., MOYER, J.S., GOLDING, T.S., COUSE, J.F., KORACH, K.S. and SMITHIES, O., 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**(23), pp. 11162-11166.
- LUND, L.R., ROMER, J., THOMASSET, N., SOLBERG, H., PYKE, C., BISSELL, M.J., DANO, K. and WERB, Z., 1996. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development (Cambridge, England)*, **122**(1), pp. 181-193.
- LUZIO, J.P., PRYOR, P.R. and BRIGHT, N.A., 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **8**(8), pp. 622-632.
- LYONS, T.R., O'BRIEN, J., BORGES, V.F., CONKLIN, M.W., KEELY, P.J., ELICEIRI, K.W., MARUSYK, A., TAN, A.C. and SCHEDIN, P., 2011. Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma in situ through collagen and COX-2. *Nature medicine*, **17**(9), pp. 1109-1115.

- MACIAS, H. and HINCK, L., 2012. Mammary Gland Development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, **1**(4), pp. 533-557.
- MAGHSOUDI, N., ZAKERI, Z. and LOCKSHIN, R.A., 2012. Programmed cell death and apoptosis--where it came from and where it is going: from Elie Metchnikoff to the control of caspases. *Experimental oncology*, **34**(3), pp. 146-152.
- MAILLEUX, A.A., SPENCER-DENE, B., DILLON, C., NDIAYE, D., SAVONABARON, C., ITOH, N., KATO, S., DICKSON, C., THIERY, J.P. and BELLUSCI, S., 2002. Role of FGF10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, **129**(1), pp. 53-60.
- MAKI, M., MAEMOTO, Y., OSAKO, Y. and SHIBATA, H., 2012. Evolutionary and physical linkage between calpains and penta-EF-hand Ca²⁺-binding proteins. *The FEBS journal*, **279**(8), pp. 1414-1421.
- MANDAL, P., AZAD, G.K. and TOMAR, R.S., 2012. Identification of a novel histone H3 specific protease activity in nuclei of chicken liver. *Biochemical and biophysical research communications*, **421**(2), pp. 261-267.
- MARGARYAN, N.V., KIRSCHMANN, D.A., LIPAVSKY, A., BAILEY, C.M., HENDRIX, M.J. and KHALKHALI-ELLIS, Z., 2010. New insights into cathepsin D in mammary tissue development and remodeling. *Cancer biology & therapy*, **10**(5), pp. 457-466.
- MARTI, A., RITTER, P.M., JAGER, R., LAZAR, H., BALTZER, A., SCHENKEL, J., DECLERCQ, W., VANDENABEELE, P. and JAGGI, R., 2001. Mouse mammary gland involution is associated with cytochrome c release and caspase activation. *Mechanisms of development*, **104**(1-2), pp. 89-98.
- MCCLELLAN, H.L., MILLER, S.J. and HARTMANN, P.E., 2008. Evolution of lactation: nutrition v. protection with special reference to five mammalian species. *Nutrition research reviews*, **21**(2), pp. 97-116.
- MCCOMMIS, K.S. and BAINES, C.P., 2012. The role of VDAC in cell death: friend or foe? *Biochimica et biophysica acta*, **1818**(6), pp. 1444-1450.
- MCHENRY, P., WANG, W.L., DEVITT, E., KLUESNER, N., DAVISSON, V.J., MCKEE, E., SCHWEITZER, D., HELQUIST, P. and TENNISWOOD, M., 2010. Iejimalides A and B inhibit lysosomal vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) activity and induce S-phase arrest and apoptosis in MCF-7 cells. *Journal of cellular biochemistry*, **109**(4), pp. 634-642.
- MELLONI, E., AVERNA, M., STIFANESE, R., DE TULLIO, R., DEFRANCHI, E., SALAMINO, F. and PONTREMOLI, S., 2006. Association of calpastatin with inactive calpain: a novel mechanism to control the activation of the protease? *The Journal of biological chemistry*, **281**(34), pp. 24945-24954.
- MENDOZA-LORENZO, P., SALAZAR, A.M., CORTES-ARENAS, E., SAUCEDO, R., TAJA-CHAYEB, L., FLORES-DORANTES, M.T., PANICO, P., SORDO, M. and OSTROSKY-WEGMAN, P., 2013. The reduction of Calpain-10 expression is associated with risk polymorphisms in obese children. *Gene*, **516**(1), pp. 126-131.

MIZUKOSHI, S., NAKAZAWA, M., SATO, K., OZAKI, T., METOKI, T. and ISHIGURO, S., 2010. Activation of mitochondrial calpain and release of apoptosis-inducing factor from mitochondria in RCS rat retinal degeneration. *Experimental eye research*, **91**(3), pp. 353-361.

MIZUSHIMA, N. and LEVINE, B., 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature cell biology*, **12**(9), pp. 823-830.

MOHAMMAD, M.A. and HAYMOND, M.W., 2013. Regulation of lipid synthesis genes and milk fat production in human mammary epithelial cells during secretory activation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **305**(6), pp. E700-16.

MOLDOVEANU, T., HOSFIELD, C.M., LIM, D., ELCE, J.S., JIA, Z. and DAVIES, P.L., 2002. A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain. *Cell*, **108**(5), pp. 649-660.

MOLINARI, M., ANAGLI, J. and CARAFOLI, E., 1994. Ca²⁺-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *The Journal of biological chemistry*, **269**(45), pp. 27992-27995.

MOLINARI, M. and CARAFOLI, E., 1997. Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes. *The Journal of membrane biology*, **156**(1), pp. 1-8.

MOMENI, H.R., 2011. Role of calpain in apoptosis. *Cell journal*, **13**(2), pp. 65-72.

MONKS, J., SMITH-STEINHART, C., KRUK, E.R., FADOK, V.A. and HENSON, P.M., 2008. Epithelial cells remove apoptotic epithelial cells during post-lactation involution of the mouse mammary gland. *Biology of reproduction*, **78**(4), pp. 586-594.

MOOREHEAD, R.A., FATA, J.E., JOHNSON, M.B. and KHOKHA, R., 2001. Inhibition of mammary epithelial apoptosis and sustained phosphorylation of Akt/PKB in MMTV-IGF-II transgenic mice. *Cell death and differentiation*, **8**(1), pp. 16-29.

MURAKAMI, Y., IKEDA, Y., YOSHIDA, N., NOTOMI, S., HISATOMI, T., OKA, S., DE LUCA, G., YONEMITSU, Y., BIGNAMI, M., NAKABEPPU, Y. and ISHIBASHI, T., 2012. MutT homolog-1 attenuates oxidative DNA damage and delays photoreceptor cell death in inherited retinal degeneration. *The American journal of pathology*, **181**(4), pp. 1378-1386.

MUSRI, M.M., GOMIS, R. and PARRIZAS, M., 2010. A chromatin perspective of adipogenesis. *Organogenesis*, **6**(1), pp. 15-23.

MUSRI, M.M. and PARRIZAS, M., 2012. Epigenetic regulation of adipogenesis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, **15**(4), pp. 342-349.

NAKAMURA, Y., FUKIAGE, C., SHIH, M., MA, H., DAVID, L.L., AZUMA, M. and SHEARER, T.R., 2000. Contribution of calpain Lp82-induced proteolysis to experimental cataractogenesis in mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, **41**(6), pp. 1460-1466.

NAKASHIMA, S., HIRAKU, Y., TADA-OIKAWA, S., HISHITA, T., GABAZZA, E.C., TAMAKI, S., IMOTO, I., ADACHI, Y. and KAWANISHI, S., 2003. Vacuolar H⁺-ATPase inhibitor induces apoptosis via lysosomal dysfunction in the human gastric cancer cell line MKN-1. *Journal of Biochemistry*, **134**(3), pp. 359-364.

- NEMOVA, N.N., LYSENKO, L.A. and KANTSEROVA, N.P., 2010. Proteinases of the calpain family: structure and functions. *Ontogenez*, **41**(5), pp. 381-389.
- NEUBERGER, T., CHAKRABARTI, A.K., RUSSELL, T., DEVRIES, G.H., HOGAN, E.L. and BANIK, N.L., 1997. Immunolocalization of cytoplasmic and myelin calpain in transfected Schwann cells: I. Effect of treatment with growth factors. *Journal of neuroscience research*, **47**(5), pp. 521-530.
- NEUHOF, C., GOTTE, O., TRUMBECKAITE, S., ATTENBERGER, M., KUZKAYA, N., GELLERICH, F., MOLLER, A., LUBISCH, W., SPETH, M., TILLMANN, H. and NEUHOF, H., 2003. A novel water-soluble and cell-permeable calpain inhibitor protects myocardial and mitochondrial function in postischemic reperfusion. *Biological chemistry*, **384**(12), pp. 1597-1603.
- NEUMAR, R.W., MENG, F.H., MILLS, A.M., XU, Y.A., ZHANG, C., WELSH, F.A. and SIMAN, R., 2001. Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia. *Experimental neurology*, **170**(1), pp. 27-35.
- NEVILLE, M.C., MCFADDEN, T.B. and FORSYTH, I., 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **7**(1), pp. 49-66.
- NEVILLE, M.C., WEBB, P., RAMANATHAN, P., MANNINNO, M.P., PECORINI, C., MONKS, J., ANDERSON, S.M. and MACLEAN, P.S., 2013. The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*.
- NGUYEN, A.V. and POLLARD, J.W., 2000. Transforming growth factor beta3 induces cell death during the first stage of mammary gland involution. *Development (Cambridge, England)*, **127**(14), pp. 3107-3118.
- O'BRIEN, J., MARTINSON, H., DURAND-ROUGELY, C. and SCHEDIN, P., 2012. Macrophages are crucial for epithelial cell death and adipocyte repopulation during mammary gland involution. *Development (Cambridge, England)*, **139**(2), pp. 269-275.
- O'BRIEN, J., HANSEN, K., BARKAN, D., GREEN, J., SCHEDIN, P., O'BRIEN, J., HANSEN, K., BARKAN, D., GREEN, J. and SCHEDIN, P., 2011. Non-steroidal anti-inflammatory drugs target the pro-tumorigenic extracellular matrix of the postpartum mammary gland. *The International journal of developmental biology*, **55**(7-9), pp. 745-755.
- OHNO, S., EMORI, Y., IMAJOH, S., KAWASAKI, H., KISARAGI, M. and SUZUKI, K., 1984. Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature*, **312**(5994), pp. 566-570.
- OLLER DO NASCIMENTO, C.M., ILIC, V. and WILLIAMSON, D.H., 1989. Re-examination of the putative roles of insulin and prolactin in the regulation of lipid deposition and lipogenesis in vivo in mammary gland and white and brown adipose tissue of lactating rats and litter-removed rats. *The Biochemical journal*, **258**(1), pp. 273-278.
- ONO, Y. and SORIMACHI, H., 2012. Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochimica et biophysica acta*, **1824**(1), pp. 224-236.

ORMANDY, C.J., CAMUS, A., BARRA, J., DAMOTTE, D., LUCAS, B., BUTEAU, H., EDERY, M., BROUSSE, N., BABINET, C., BINART, N. and KELLY, P.A., 1997. Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes & development*, **11**(2), pp. 167-178.

OTSUKA, Y. and GOLL, D.E., 1987. Purification of the Ca²⁺-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca²⁺-dependent proteinase. *The Journal of biological chemistry*, **262**(12), pp. 5839-5851.

OUYANG, L., SHI, Z., ZHAO, S., WANG, F.T., ZHOU, T.T., LIU, B. and BAO, J.K., 2012. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, **45**(6), pp. 487-498.

OZAKI, T., TOMITA, H., TAMAI, M. and ISHIGURO, S., 2007. Characteristics of mitochondrial calpains. *Journal of Biochemistry*, **142**(3), pp. 365-376.

OZAKI, T., YAMASHITA, T. and ISHIGURO, S., 2009. Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*, **1793**(12), pp. 1848-1859.

PAL, B., BOURAS, T., SHI, W., VAILLANT, F., SHERIDAN, J.M., FU, N., BRESLIN, K., JIANG, K., RITCHIE, M.E., YOUNG, M., LINDEMAN, G.J., SMYTH, G.K. and VISVADER, J.E., 2013. Global changes in the mammary epigenome are induced by hormonal cues and coordinated by Ezh2. *Cell reports*, **3**(2), pp. 411-426.

PAL, G.P., ELCE, J.S. and JIA, Z., 2001. Dissociation and aggregation of calpain in the presence of calcium. *The Journal of biological chemistry*, **276**(50), pp. 47233-47238.

PALERMO, C. and JOYCE, J.A., 2008. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, **29**(1), pp. 22-28.

PANIGRAHI, A.K., ZHANG, N., MAO, Q. and PATI, D., 2011. Calpain-1 cleaves Rad21 to promote sister chromatid separation. *Molecular and cellular biology*, **31**(21), pp. 4335-4347.

PARIAT, M., SALVAT, C., BEBIEN, M., BROCKLY, F., ALTIERI, E., CARILLO, S., JARIEL-ENCONTRE, I. and PIECHACZYK, M., 2000. The sensitivity of c-Jun and c-Fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers. *The Biochemical journal*, **345 Pt 1**, pp. 129-138.

PARR, T., JEWELL, K.K., SENSKY, P.L., BRAMELD, J.M., BARDSLEY, R.G. and BUTTERY, P.J., 2004. Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **427**(1), pp. 8-15.

PARR, T., SENSKY, P.L., BARDSLEY, R.G. and BUTTERY, P.J., 2001. Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **395**(1), pp. 1-13.

PATEL, Y.M. and LANE, M.D., 1999. Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(4), pp. 1279-1284.

- PELLICCIARI, R., CAMAIONI, E. and COSTANTINO, G., 2004. 3. Life or death decisions: the cast of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) as a therapeutic target for brain ischaemia. *Progress in medicinal chemistry*, **42**, pp. 125-169.
- PENSA, S., WATSON, C.J. and POLI, V., 2009. Stat3 and the inflammation/acute phase response in involution and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **14**(2), pp. 121-129.
- PHILP, J.A., BURDON, T.G. and WATSON, C.J., 1996. Differential activation of STATs 3 and 5 during mammary gland development. *FEBS letters*, **396**(1), pp. 77-80.
- PIETSCH, M., CHUA, K.C. and ABELL, A.D., 2010. Calpains: attractive targets for the development of synthetic inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry*, **10**(3), pp. 270-293.
- POLSTER, B.M., BASANEZ, G., ETXEBARRIA, A., HARDWICK, J.M. and NICHOLLS, D.G., 2005. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, **280**(8), pp. 6447-6454.
- PROPPER, A.Y., HOWARD, B.A. and VELTMAAT, J.M., 2013. Prenatal morphogenesis of mammary glands in mouse and rabbit. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **18**(2), pp. 93-104.
- QUAGLINO, A., SALIERNO, M., PELLEGGROTTI, J., RUBINSTEIN, N. and KORDON, E.C., 2009. Mechanical strain induces involution-associated events in mammary epithelial cells. *BMC cell biology*, **10**, pp. 55-2121-10-55.
- QUISTORFF, B. and POULSEN, H., 1980. Evaluation of a freeze-clamping technique designed for two- and three-dimensional metabolic studies of rat liver in vivo. Quenching efficiency and effect of clamping on tissue morphology. *Analytical Biochemistry*, **108**(2), pp. 249-256.
- RADISKY, D.C. and HARTMANN, L.C., 2009. Mammary involution and breast cancer risk: transgenic models and clinical studies. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **14**(2), pp. 181-191.
- RADISKY, E.S., 2010. Cathepsin D: Regulation in mammary gland remodeling, misregulation in breast cancer. *Cancer biology & therapy*, **10**(5), pp. 467-470.
- RAJAKUMAR, D., ALEXANDER, M. and OOMMEN, A., 2013. Oxidative Stress, NF-kappaB and the Ubiquitin Proteasomal Pathway in the Pathology of Calpainopathy. *Neurochemical research*.
- RAUNER, G., LEVIAV, A., MAVOR, E. and BARASH, I., 2013. Development of Foreign Mammary Epithelial Morphology in the Stroma of Immunodeficient Mice. *PloS one*, **8**(6), pp. e68637.
- RAYNAUD, F. and MARCILHAC, A., 2006. Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *The FEBS journal*, **273**(15), pp. 3437-3443.
- REINHARDT, T.A., LIPPOLIS, J.D., SHULL, G.E. and HORST, R.L., 2004. Null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 impairs calcium transport into milk. *The Journal of biological chemistry*, **279**(41), pp. 42369-42373.

RENZ, A., BERDEL, W.E., KREUTER, M., BELKA, C., SCHULZE-OSTHOFF, K. and LOS, M., 2001. Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death in vivo. *Blood*, **98**(5), pp. 1542-1548.

RESEMANN, H.K., WATSON, C.J. and LLOYD-LEWIS, B., 2013. The Stat3 paradox: A killer and an oncogene. *Molecular and cellular endocrinology*.

RICHERT, M.M., SCHWERTFEGER, K.L., RYDER, J.W. and ANDERSON, S.M., 2000. An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **5**(2), pp. 227-241.

ROBINSON, A.M. and WILLIAMSON, D.H., 1977. Control of glucose metabolism in isolated acini of the lactating mammary gland of the rat. The ability of glycerol to mimic some of the effects of insulin. *The Biochemical journal*, **168**(3), pp. 465-474.

RODBELL, M., 1964. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *The Journal of biological chemistry*, **239**, pp. 375-380.

ROSNER, B., COLDITZ, G.A. and WILLETT, W.C., 1994. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study. *American Journal of Epidemiology*, **139**(8), pp. 819-835.

ROUMES, H., LELOUP, L., DARGELOS, E., BRUSTIS, J.J., DAURY, L. and COTTIN, P., 2010. Calpains: markers of tumor aggressiveness? *Experimental cell research*, **316**(9), pp. 1587-1599.

RUAN, W. and KLEINBERG, D.L., 1999. Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology*, **140**(11), pp. 5075-5081.

SAHARA, S. and YAMASHIMA, T., 2010. Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death. *Biochemical and biophysical research communications*, **393**(4), pp. 806-811.

SAIDO, T.C., SHIBATA, M., TAKENAWA, T., MUROFUSHI, H. and SUZUKI, K., 1992. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *The Journal of biological chemistry*, **267**(34), pp. 24585-24590.

SAKAKURA, T., SUZUKI, Y. and SHIURBA, R., 2013. Mammary stroma in development and carcinogenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **18**(2), pp. 189-197.

SAMANTARAY, S., KNARYAN, V.H., SHIELDS, D.C. and BANIK, N.L., 2013. Critical Role of Calpain in Spinal Cord Degeneration in Parkinson's Disease. *Journal of neurochemistry*.

SAMANTARAY, S., RAY, S.K. and BANIK, N.L., 2008. Calpain as a potential therapeutic target in Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, **7**(3), pp. 305-312.

SCHEDIN, P., 2006. Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nature reviews.Cancer*, **6**(4), pp. 281-291.

SCHEDIN, P., O'BRIEN, J., RUDOLPH, M., STEIN, T. and BORGES, V., 2007. Microenvironment of the involuting mammary gland mediates mammary cancer progression. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **12**(1), pp. 71-82.

SCHIEFER, I.T., TAPADAR, S., LITOSH, V., SIKLOS, M., SCISM, R., WIJEWICKRAMA, G.T., CHANDRASENA, E.P., SINHA, V., TAVASSOLI, E., BRUNSTEINER, M., FA', M., ARANCIO, O., PETUKHOV, P. and THATCHER, G.R., 2013. Design, Synthesis, and Optimization of Novel Epoxide Incorporating Peptidomimetics as Selective Calpain Inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*.

SCHMIDT, H., 1998. Supernumerary nipples: prevalence, size, sex and side predilection -- a prospective clinical study. *European journal of pediatrics*, **157**(10), pp. 821-823.

SCHWERTFEGER, K.L., RICHERT, M.M. and ANDERSON, S.M., 2001. Mammary gland involution is delayed by activated Akt in transgenic mice. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, **15**(6), pp. 867-881.

SHACKA, J.J., ROTH, K.A. and ZHANG, J., 2008. The autophagy-lysosomal degradation pathway: role in neurodegenerative disease and therapy. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, **13**, pp. 718-736.

SHACKLETON, M., VAILLANT, F., SIMPSON, K.J., STINGL, J., SMYTH, G.K., ASSELIN-LABAT, M.L., WU, L., LINDEMAN, G.J. and VISVADER, J.E., 2006. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*, **439**(7072), pp. 84-88.

SHARMA, A.K. and ROHRER, B., 2004. Calcium-induced calpain mediates apoptosis via caspase-3 in a mouse photoreceptor cell line. *The Journal of biological chemistry*, **279**(34), pp. 35564-35572.

SHIBA, E., KAMBAYASHI, J.I., SAKON, M., KAWASAKI, T., KOBAYASHI, T., KOYAMA, H., YAYOI, E., TAKATSUKA, Y. and TAKAI, S.I., 1996. Ca²⁺-Dependent Neutral Protease (Calpain) Activity in Breast Cancer Tissue and Estrogen Receptor Status. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, **3**(1), pp. 13-17.

SMALLEY, M.J., KENDRICK, H., SHERIDAN, J.M., REGAN, J.L., PRATER, M.D., LINDEMAN, G.J., WATSON, C.J., VISVADER, J.E. and STINGL, J., 2012. Isolation of mouse mammary epithelial subpopulations: a comparison of leading methods. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **17**(2), pp. 91-97.

SMITH, D.J., NG, H., KLUCK, R.M. and NAGLEY, P., 2008. The mitochondrial gateway to cell death. *IUBMB life*, **60**(6), pp. 383-389.

SMITH, M.A., COVINGTON, M.D. and SCHNELLMANN, R.G., 2012. Loss of calpain 10 causes mitochondrial dysfunction during chronic hyperglycemia. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **523**(2), pp. 161-168.

SMITH, M.A. and SCHNELLMANN, R.G., 2012. Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular research*, **96**(1), pp. 32-37.

SONG, Y., NIU, T., MANSON, J.E., KWIATKOWSKI, D.J. and LIU, S., 2004. Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of

population and family-based association studies. *American Journal of Human Genetics*, **74**(2), pp. 208-222.

SORIMACHI, H., HATA, S. and ONO, Y., 2011. Impact of genetic insights into calpain biology. *Journal of Biochemistry*, **150**(1), pp. 23-37.

SOUTHWELL, A.L., BUGG, C.W., KALTENBACH, L.S., DUNN, D., BUTLAND, S., WEISS, A., PAGANETTI, P., LO, D.C. and PATTERSON, P.H., 2011. Perturbation with intrabodies reveals that calpain cleavage is required for degradation of huntingtin exon 1. *PloS one*, **6**(1), pp. e16676.

SPENCER, M.J. and MELLGREN, R.L., 2002. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Human molecular genetics*, **11**(21), pp. 2645-2655.

STABACH, P.R., CIANCI, C.D., GLANTZ, S.B., ZHANG, Z. and MORROW, J.S., 1997. Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry*, **36**(1), pp. 57-65.

STEIN, T., SALOMONIS, N. and GUSTERSON, B.A., 2007. Mammary gland involution as a multi-step process. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **12**(1), pp. 25-35.

STERNLICHT, M.D., 2006. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast cancer research: BCR*, **8**(1), pp. 201.

STINGL, J., RAOUF, A., EMERMAN, J.T. and EAVES, C.J., 2005. Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **10**(1), pp. 49-59.

STOECKIUS, M., ERAT, A., FUJIKAWA, T., HIROMURA, M., KOULOVA, A., OTTERBEIN, L., BIANCHI, C., TOBIASCH, E., DAGON, Y., SELLEKE, F.W. and USHEVA, A., 2012. Essential roles of Raf/extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway, YY1, and Ca²⁺ influx in growth arrest of human vascular smooth muscle cells by bilirubin. *The Journal of biological chemistry*, **287**(19), pp. 15418-15426.

STORR, S.J., CARRAGHER, N.O., FRAME, M.C., PARR, T. and MARTIN, S.G., 2011. The calpain system and cancer. *Nature reviews. Cancer*, **11**(5), pp. 364-374.

STORR, S.J., LEE, K.W., WOOLSTON, C.M., SAFUAN, S., GREEN, A.R., MACMILLAN, R.D., BENHASOUNA, A., PARR, T., ELLIS, I.O. and MARTIN, S.G., 2012. Calpain system protein expression in basal-like and triple-negative invasive breast cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, **23**(9), pp. 2289-2296.

STRANGE, R., METCALFE, T., THACKRAY, L. and DANG, M., 2001. Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microscopy research and technique*, **52**(2), pp. 171-181.

SU, Y., CUI, Z., LI, Z. and BLOCK, E.R., 2006. Calpain-2 regulation of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **20**(9), pp. 1443-1451.

- SUTHERLAND, K.D., LINDEMAN, G.J. and VISVADER, J.E., 2007. The molecular culprits underlying precocious mammary gland involution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **12**(1), pp. 15-23.
- SUZUKI, K., ISHIURA, S., TSUJI, S., KATAMOTO, T., SUGITA, H. and IMAHORI, K., 1979. Calcium activated neutral protease from human skeletal muscle. *FEBS letters*, **104**(2), pp. 355-358.
- SUZUKI, K., SAIDO, T.C. and HIRAI, S., 1992. Modulation of cellular signals by calpain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **674**, pp. 218-227.
- SZCZERBAL, I., FOSTER, H.A. and BRIDGER, J.M., 2009. The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system. *Chromosoma*, **118**(5), pp. 647-663.
- TAKANO, J., TOMIOKA, M., TSUBUKI, S., HIGUCHI, M., IWATA, N., ITOHARA, S., MAKI, M. and SAIDO, T.C., 2005. Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: evidence from calpastatin mutant mice. *The Journal of biological chemistry*, **280**(16), pp. 16175-16184.
- TAKANO, J., WATANABE, M., HITOMI, K. and MAKI, M., 2000. Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues. *Journal of Biochemistry*, **128**(1), pp. 83-92.
- TANAKA, K., 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, **85**(1), pp. 12-36.
- TEGLUND, S., MCKAY, C., SCHUETZ, E., VAN DEURSEN, J.M., STRAVOPODIS, D., WANG, D., BROWN, M., BODNER, S., GROSVELD, G. and IHLE, J.N., 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, **93**(5), pp. 841-850.
- TODD, B., MOORE, D., DEIVANAYAGAM, C.C., LIN, G.D., CHATTOPADHYAY, D., MAKI, M., WANG, K.K. and NARAYANA, S.V., 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), pp. 131-146.
- TONNER, E., BARBER, M.C., TRAVERS, M.T., LOGAN, A. and FLINT, D.J., 1997. Hormonal control of insulin-like growth factor-binding protein-5 production in the involuting mammary gland of the rat. *Endocrinology*, **138**(12), pp. 5101-5107.
- TORRES, L., SERNA, E., BOSCH, A., ZARAGOZA, R., GARCIA, C., MIRALLES, V.J., SANDOVAL, J., VIÑA, J.R. and GARCIA-TREVIJANO, E.R., 2011. NF- κ B as node for signal amplification during weaning. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, **28**(5), pp. 833-846.
- TREMPER-WELLS, B. and VALLANO, M.L., 2005. Nuclear calpain regulates Ca²⁺-dependent signaling via proteolysis of nuclear Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV in cultured neurons. *The Journal of biological chemistry*, **280**(3), pp. 2165-2175.

TRUMBECKAITE, S., NEUHOF, C., ZIERZ, S. and GELLERICH, F.N., 2003. Calpain inhibitor (BSF 409425) diminishes ischemia/reperfusion-induced damage of rabbit heart mitochondria. *Biochemical pharmacology*, **65**(5), pp. 911-916.

VAFZAIDEH, V., KLEMMT, P., BRENDDEL, C., WEBER, K., DOEBELE, C., BRITT, K., GREZ, M., FEHSE, B., DESRIVIERES, S. and GRONER, B., 2010. Mammary epithelial reconstitution with gene-modified stem cells assigns roles to Stat5 in luminal alveolar cell fate decisions, differentiation, involution, and mammary tumor formation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **28**(5), pp. 928-938.

VAFZAIDEH, V., KLEMMT, P.A. and GRONER, B., 2012. Stat5 assumes distinct functions in mammary gland development and mammary tumor formation. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, **17**, pp. 1232-1250.

VAN KEYMEULEN, A., ROCHA, A.S., OUSSET, M., BECK, B., BOUVENCOURT, G., ROCK, J., SHARMA, N., DEKONINCK, S. and BLANPAIN, C., 2011. Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*, **479**(7372), pp. 189-193.

VANDEN BERGHE, T., VAN LOO, G., SAELENS, X., VAN GURP, M., BROUCKAERT, G., KALAI, M., DECLERCQ, W. and VANDENABEELE, P., 2004. Differential signaling to apoptotic and necrotic cell death by Fas-associated death domain protein FADD. *The Journal of biological chemistry*, **279**(9), pp. 7925-7933.

VELTMAAT, J.M., MAILLEUX, A.A., THIERY, J.P. and BELLUSCI, S., 2003. Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation; research in biological diversity*, **71**(1), pp. 1-17.

VERRIER, L., VANDROMME, M. and TROUCHE, D., 2011. Histone demethylases in chromatin cross-talks. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, **103**(8), pp. 381-401.

VILLALPANDO RODRIGUEZ, G.E. and TORRIGLIA, A., 2013. Calpain 1 induce lysosomal permeabilization by cleavage of lysosomal associated membrane protein 2. *Biochimica et biophysica acta*, **1833**(10), pp. 2244-2253.

VIÑA, J.R., PUERTES, I.R. and VIÑA, J., 1981. Effect of premature weaning on amino acid uptake by the mammary gland of lactating rats. *The Biochemical journal*, **200**(3), pp. 705-708.

VIÑA, J.R. and WILLIAMSON, D.H., 1981. Utilization of L-alanine and L-glutamine by lactating mammary gland of the rat. A role for L-alanine as a lipogenic precursor. *The Biochemical journal*, **196**(3), pp. 757-762.

VIÑA, J.R. 2012. La glándula mamaria como modelo en investigación biomédica. *Discurso Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana*, pp 9-39

VIRGO, B.B. and BELLWARD, G.D., 1974. Serum progesterone levels in the pregnant and postpartum laboratory mouse. *Endocrinology*, **95**(5), pp. 1486-1490.

VISVADER, J.E. and LINDEMAN, G.J., 2011. The unmasking of novel unipotent stem cells in the mammary gland. *The EMBO journal*, **30**(24), pp. 4858-4859.

- VONDERHAAR, B.K. and GRECO, A.E., 1982. Effect of thyroid status on development of spontaneous mammary tumors in primiparous C3H mice. *Cancer research*, **42**(11), pp. 4553-4561.
- VORBACH, C., CAPECCHI, M.R. and PENNINGER, J.M., 2006. Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, **28**(6), pp. 606-616.
- VOSLER, P.S., BRENNAN, C.S. and CHEN, J., 2008. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Molecular neurobiology*, **38**(1), pp. 78-100.
- WAGNER, K.U. and SCHMIDT, J.W., 2011. The two faces of Janus kinases and their respective STATs in mammary gland development and cancer. *Journal of carcinogenesis*, **10**, pp. 32-3163.90677. Epub 2011 Dec 8.
- WALKER, S.R., NELSON, E.A., YEH, J.E., PINELLO, L., YUAN, G.C. and FRANK, D.A., 2013. STAT5 outcompetes STAT3 to regulate the expression of the oncogenic transcriptional modulator BCL6. *Molecular and cellular biology*.
- WALKER, S.R., XIANG, M. and FRANK, D.A., 2013. Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, .
- WANG, T.S., CHOU, H.F., LIU, W.M. and CHOO, K.B., 1999. Semiautomated typing of human papillomaviruses by restriction fragment length polymorphism analysis of fluorescence-labeled PCR fragments. *Journal of medical virology*, **59**(4), pp. 536-540.
- WATSON, C.J., 2001. Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **6**(1), pp. 115-127.
- WATSON, C.J., 2006. Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast cancer research: BCR*, **8**(2), pp. 203.
- WATSON, C.J., 2006. Post-lactational mammary gland regression: molecular basis and implications for breast cancer. *Expert reviews in molecular medicine*, **8**(32), pp. 1-15.
- WATSON, C.J. and KREUZALER, P.A., 2011. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *The International journal of developmental biology*, **55**(7-9), pp. 757-762.
- WATSON, C.J. and KREUZALER, P.A., 2009. The role of cathepsins in involution and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **14**(2), pp. 171-179.
- WATSON, C.J. and NEOH, K., 2008. The Stat family of transcription factors have diverse roles in mammary gland development. *Seminars in cell & developmental biology*, **19**(4), pp. 401-406.
- WATT, F. and MOLLOY, P.L., 1993. Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. *Nucleic acids research*, **21**(22), pp. 5092-5100.
- WEBB, D.J., ZHANG, H. and HORWITZ, A.F., 2005. Cell migration: an overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **294**, pp. 3-11.

WENDT, A., THOMPSON, V.F. and GOLL, D.E., 2004. Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biological chemistry*, **385**(6), pp. 465-472.

WERB, Z., ASHKENAS, J., MACAULEY, A. and WIESEN, J.F., 1996. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Brazilian journal of medical and biological research Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ...[et al.]*, **29**(9), pp. 1087-1097.

WISEMAN, B.S., STERNLICHT, M.D., LUND, L.R., ALEXANDER, C.M., MOTT, J., BISSELL, M.J., SOLOWAY, P., ITOHARA, S. and WERB, Z., 2003. Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *The Journal of cell biology*, **162**(6), pp. 1123-1133.

WOESSNER, J.F.,JR, 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **5**(8), pp. 2145-2154.

WU, H.Y., TOMIZAWA, K. and MATSUI, H., 2007. Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. *Acta Medica Okayama*, **61**(3), pp. 123-137.

WYSOCKA, J., REILLY, P.T. and HERR, W., 2001. Loss of HCF-1-chromatin association precedes temperature-induced growth arrest of tsBN67 cells. *Molecular and cellular biology*, **21**(11), pp. 3820-3829.

YAJIMA, Y. and KAWASHIMA, S., 2002. Calpain function in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Biological chemistry*, **383**(5), pp. 757-764.

YAJIMA, Y., SATO, M., SORIMACHI, H., INOMATA, M., MAKI, M. and KAWASHIMA, S., 2006. Calpain system regulates the differentiation of adult primitive mesenchymal ST-13 adipocytes. *Endocrinology*, **147**(10), pp. 4811-4819.

YAMASHIMA, T., 2000. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Progress in neurobiology*, **62**(3), pp. 273-295.

YAMASHIMA, T., KOHDA, Y., TSUCHIYA, K., UENO, T., YAMASHITA, J., YOSHIOKA, T. and KOMINAMI, E., 1998. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *The European journal of neuroscience*, **10**(5), pp. 1723-1733.

YAMASHIMA, T. and OIKAWA, S., 2009. The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Progress in neurobiology*, **89**(4), pp. 343-358.

YOUN, J.Y., WANG, T. and CAI, H., 2009. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circulation research*, **104**(1), pp. 50-59.

ZARAGOZA, R., GARCIA-TREVIJANO, E.R., MIRALLES, V.J., MATA, M., GARCIA, C., CARMENA, R., BARBER, T., PALLARDO, F.V., TORRES, L. and VIÑA, J.R., 2005. Role of GSH in the modulation of NOS-2 expression in the weaned mammary gland. *Biochemical Society transactions*, **33**(Pt 6), pp. 1397-1398.

ZARAGOZA, R., MIRALLES, V.J., RUS, A.D., GARCIA, C., CARMENA, R., GARCIA-TREVIJANO, E.R., BARBER, T., PALLARDO, F.V., TORRES, L. and VIÑA, J.R., 2005. Weaning induces NOS-2 expression through NF-kappaB modulation in the lactating mammary gland: importance of GSH. *The Biochemical journal*, **391**(Pt 3), pp. 581-588.

ZARAGOZA, R., GIMENO, A., MIRALLES, V.J., GARCIA-TREVIJANO, E.R., CARMENA, R., GARCIA, C., MATA, M., PUERTES, I.R., TORRES, L. and VIÑA, J.R., 2007. Retinoids induce MMP-9 expression through RARalpha during mammary gland remodeling. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, **292**(4), pp. E1140-8.

ZARAGOZA, R., TORRES, L., GARCIA, C., EROLES, P., CORRALES, F., BOSCH, A., LLUCH, A., GARCIA-TREVIJANO, E.R. and VIÑA, J.R., 2009. Nitration of cathepsin D enhances its proteolytic activity during mammary gland remodelling after lactation. *The Biochemical journal*, **419**(2), pp. 279-288.

ZARAGOZA, R., BOSCH, A., GARCIA, C., SANDOVAL, J., SERNA, E., TORRES, L., GARCIA-TREVIJANO, E.R. and VIÑA, J.R., 2010. Nitric oxide triggers mammary gland involution after weaning: remodelling is delayed but not impaired in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *The Biochemical journal*, **428**(3), pp. 451-462.

ZATZ, M. and STARLING, A., 2005. Calpains and disease. *The New England journal of medicine*, **352**(23), pp. 2413-2423.

ZHANG, F., WANG, Q., YE, L., FENG, Y. and ZHANG, X., 2010. Hepatitis B virus X protein upregulates expression of calpain small subunit 1 via nuclear factor-kappaB/p65 in hepatoma cells. *Journal of medical virology*, **82**(6), pp. 920-928.

ZHANG, X., HOANG, E. and NOTHNICK, W.B., 2009. Estrogen-induced uterine abnormalities in TIMP-1 deficient mice are associated with elevated plasmin activity and reduced expression of the novel uterine plasmin protease inhibitor serpinb7. *Molecular reproduction and development*, **76**(2), pp. 160-172.

ZHANG, Y., MATKOVICH, S.J., DUAN, X., DIWAN, A., KANG, M.Y. and DORN, G.W., 2ND, 2011. Receptor-independent protein kinase C alpha (PKCalpha) signaling by calpain-generated free catalytic domains induces HDAC5 nuclear export and regulates cardiac transcription. *The Journal of biological chemistry*, **286**(30), pp. 26943-26951.

ZHAO, Y., CUI, G., ZHANG, N., LIU, Z., SUN, W. and PENG, Q., 2012. Lipopolysaccharide induces endothelial cell apoptosis via activation of Na(+)/H(+) exchanger 1 and calpain-dependent degradation of Bcl-2. *Biochemical and biophysical research communications*, **427**(1), pp. 125-132.

ZHU, H., BHATTACHARYYA, B.J., LIN, H. and GOMEZ, C.M., 2011. Skeletal muscle IP3R1 receptors amplify physiological and pathological synaptic calcium signals. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **31**(43), pp. 15269-1528

