



**“EFECTO DE FGF21 SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA GLUT4 EN LA
MEMBRANA PLASMÁTICA DE MIOTUBOS L6-GLUT4MYC”**

JAVIER ANTONIO RUSSELL GUZMÁN

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN FISIOLÓGÍA**

Director de Tesis:

Prof. Dr. Ariel Contreras-Ferrat; Dra. Paola Llanos

2017

Escuela de Postgrado



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

JAVIER ANTONIO RUSSELL GUZMÁN

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de noviembre de 2017.

Prof. Dr. Ariel Contreras Ferrat
Director de Tesis
Universidad Finis Terrae

Prof. Dra. Paola Llanos Vidal
Directora de Tesis
Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Sonja Buvinic

Prof. Dr. Mario Chiong

Prof. Dr. Rodrigo Troncoso

Prof. Dra. Alejandra Espinosa
Presidenta Comisión



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

Dedicatoria

Quisiera dedicar sinceramente este trabajo a mi familia, amigos, polola y personas más cercanas.

Agradecimientos

Quisiera agradecer sinceramente a todas las personas que han colaborado directa o indirectamente en el desarrollo del presente proyecto de Tesis.

En primer lugar, a todos los profesionales, académicos, investigadores y estudiantes que formaron parte del Laboratorio de Fisiología Muscular del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile durante mi proceso de formación, especialmente al Dr. Enrique Jaimovich por la oportunidad de poder trabajar y aprender en su laboratorio. A Yildy Utreras, Alexis Díaz, Cristian Campos, Giovanni Rosales, Pablo Sánchez, María Fernanda Álvarez, Manuel Calderón, Erick Vergara y tantos más por su constante ayuda y asesoría.

Así mismo, quisiera agradecer al Laboratorio de Ciencias del Ejercicio y el Movimiento de la Universidad Finis Terrae por permitirme realizar integralmente los experimentos necesarios para el desarrollo de mi trabajo de Tesis. Gracias al Dr. Hermann Zbinden, Dr. Luis Peñailillo, Dra. Denisse Valladares, Francisco Díaz, Isabel Rada, Karen Mackay, Rosemary Arenas, Luis González, Roberto González, Nicolás Collao, Loreto Melo y Catalina Rosales por su valiosa ayuda.

Mención especial para mis tutores, el Dr. Ariel Contreras y la Dra. Paola Llanos. Infinitas gracias por la confianza otorgada, por sus críticas y por ser capaz de guiarme tan rigurosamente durante todo el proceso. He aprendido mucho de ustedes y espero poder aplicar sus valiosas enseñanzas durante mi futura carrera como investigador.

Agradecimientos también para los integrantes de la comisión evaluadora: Dra. Sonja Buvinic, Dr. Mario Chiong, Dr. Rodrigo Troncoso y presidenta de la comisión Dra. Alejandra Espinosa. A mi tutora académica Dra. Julia Guerrero y a la asistente de gestión de postgrado Daniela Viñals. Muchas gracias por su valiosa contribución en el proceso de evaluación y desarrollo de Tesis.

Gracias a todos los académicos de la Facultad de Medicina, Instituto de Ciencias Biomédicas y Centro de Estudios Moleculares de la Célula con los que tuve la fortuna de compartir en clases: Dr. Marcelo Cano, Dr. Sergio Villanueva, Dr. Rodolfo Miralles, Dr. Andrés Couve, Dra. Cecilia Hidalgo, Dr. Sergio Lavandero, Dr. Andrew Quest, Dr. Diego Varela, Dra. Lisette Leyton, Dr. Claus Behn, Dr. Luis Michea, Dr. Ramón Rodrigo, Dr. Julio Cesar Cárdenas, Dr. Ricardo Bull, entre otros.

Finalmente, quisiera agradecer especialmente a mi familia, amigos y polola por todo el soporte emocional durante estos años de estudio. Sin dudas, no hubiese sido posible cumplir la meta sin ustedes.



Índice:

Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción.....	10
A. Captación de glucosa en el músculo esquelético.	10
i) Captación de glucosa mediada por GLUT4 dependiente de insulina.	10
ii) Captación de glucosa vía GLUT4 independiente de insulina.	14
B. FGF21 y su rol en la regulación del metabolismo.....	17
2. Hipótesis.	21
3. Objetivos.	22
4. Materiales y Métodos.	23
5. Resultados	30
6. Discusión.	41
7. Conclusión.....	47
Referencias	48
ANEXOS	58



Resumen

INTRODUCCIÓN. La regulación homeostática de los niveles de glucosa en plasma depende de la interacción de distintos órganos de nuestro cuerpo, entre los cuales destaca el músculo esquelético. La captación de glucosa en el músculo es un proceso de difusión facilitada mediado principalmente por la acción del transportador de glucosa de tipo 4 (GLUT4) en respuesta a estímulos como insulina o la contracción muscular. Recientemente se ha descrito el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (por sus siglas en inglés, FGF21) como una citoquina secretada en respuesta a múltiples estímulos de estrés, capaz de regular el metabolismo. Si bien se han reportado diversos efectos de FGF21 a nivel hepático y en el tejido adiposo, se desconoce cuál podría ser su función sobre el músculo esquelético. Estudios en líneas celulares y en fibras de músculo esquelético han sugerido un posible papel de FGF21 en el proceso de captación de glucosa mediada por GLUT4. Sin embargo, los mecanismos que estarían involucrados en este proceso no se conocen con exactitud. **HIPÓTESIS:** “Un estímulo agudo de FGF21 induce exposición de GLUT4 a la superficie celular por un mecanismo que involucra la activación de Akt y el remodelado de actina cortical en miotubos L6-GLUT4myc”. **MATERIALES Y MÉTODOS.** Con el objetivo de evaluar el efecto de FGF21 sobre la exposición de GLUT4 en la superficie de células musculares se empleó la línea celular L6 transformada (L6-GLUT4myc), pudiendo estimar mediante un ensayo de detección óptica los niveles de GLUT4myc en la membrana plasmática. A su vez, para determinar el efecto de FGF21 en la remodelación del citoesqueleto de actina se empleó una sonda fluorescente denominada rodamina/faloidina, que permite identificar la formación de actina filamentosa. Finalmente, con el fin de determinar el papel de Akt en la exposición de GLUT4 en la membrana inducida por un estímulo agudo de FGF21 se utilizó la técnica de Western blot. **RESULTADOS.** FGF21 no indujo cambios significativos en la exposición de GLUT4 en superficie, remodelado de actina cortical ni fosforilación de Akt en serina 473 en miotubos L6-GLUT4myc. Así mismo, se observó una baja abundancia relativa en los niveles proteicos del receptor FGFR1 en miotubos L6-GLUT4myc. **CONCLUSIÓN.** La línea celular de miotubos L6-GLUT4myc no responde a estímulos agudos de FGF21, sugiriendo que no constituye el mejor modelo de estudio para fenómenos de captación de glucosa inducidos por FGF21 en células musculares.

Palabras clave:

Factor de crecimiento de fibroblastos 21; GLUT4; L6-GLUT4myc; miotubos; músculo esquelético; remodelado de actina.



Abstract

INTRODUCTION. Glucose homeostasis is finely regulated by the interaction of various organs, including skeletal muscle. Glucose uptake in skeletal muscle is a facilitated diffusion process primarily mediated by the action of the glucose transporter type 4 (GLUT4) in response to stimuli such as insulin or muscle contraction. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) has recently been described as a cytokine secreted in response to various stress stimuli, capable of regulating metabolism. Although several effects of FGF21 have been reported in the liver and adipose tissue, its function on skeletal muscle is unknown. Studies in skeletal muscle cell lines and fibers have suggested a possible role of FGF21 in a glucose uptake-GLUT4 mediated process. However, the mechanisms involved in this process are not accurately known. **HYPOTHESIS:** *"An acute stimulus of FGF21 induces GLUT4 exposure on the cell surface, through a mechanism that involve Akt activation and cortical actin cytoskeleton remodeling in L6-GLUT4myc myotubes"*. **MATERIALS AND METHODS.** In order to assess the effect of FGF21 on GLUT4 exposure on muscle cells surface, the transformed L6 cell line (L6-GLUT4myc) was used, and GLUT4myc levels in the plasma membrane were estimated by an optical detection assay. In addition, a fluorescent probe called rhodamine / phalloidin was used to determine the effect of FGF21 on the actin cytoskeleton remodeling, allowing the identification of filamentous actin formation in the cytoplasm towards cortical. Finally, Western blot technique was used in order to determine the role of Akt in the GLUT4 membrane exposure induced by an acute FGF21 stimulus. **RESULTS.** FGF21 did not induce changes in GLUT4 surface exposure, cortical actin remodeling nor Akt serine 473 phosphorylation in L6-GLUT4myc myotubes. Additionally, a low relative FGFR1 receptor protein level was observed in L6-GLUT4myc myotubes. **CONCLUSION.** L6-GLUT4myc myotube cell line does not respond to acute FGF21 stimuli, suggesting that it is not the best experimental model for FGF21-induced glucose uptake in muscle cells.

Keywords:

Fibroblast growth factor 21; GLUT4; L6-GLUT4myc; myotubes; skeletal muscle, actin remodeling.



1. Introducción

A. Captación de glucosa en el músculo esquelético.

El músculo esquelético se caracteriza por ser uno de los tejidos más dinámicos y plásticos del cuerpo humano, además de abarcar aproximadamente un 40% de la masa corporal total (1). Entre sus múltiples funciones el músculo esquelético juega un papel clave en la regulación de la glicemia, siendo responsable de un ~80% de la captación total de glucosa en condiciones postprandiales (2). La captación de glucosa por parte de la célula muscular es un proceso de difusión facilitada a través de la acción de proteínas de 12 dominios de transmembrana conocidas como transportadores de glucosa (GLUT). Las principales isoformas involucradas en la captación de glucosa a nivel muscular son GLUT1 y GLUT4 (3–5). Mientras GLUT1 se encuentra localizado constitutivamente en la membrana plasmática, encargándose de facilitar la captación de glucosa en condiciones basales o de reposo (6), GLUT4 se recluta dinámicamente a la superficie celular en respuesta a diversos estímulos neuro-humorales y/o cambios en el estado energético intracelular (6,7). En otras palabras, la abundancia de GLUT4 en la membrana plasmática estará principalmente determinada por un cambio en la tasa de endocitosis y exocitosis de vesículas que almacenan GLUT4 (GSV) (8).

En términos generales existen dos mecanismos descritos para la captación de glucosa mediada por GLUT4 en la célula muscular: i) dependiente de insulina; e ii) independiente a insulina (**Figura 1**).

i) **Captación de glucosa mediada por GLUT4 dependiente de insulina.**

La insulina es hormona de naturaleza peptídica secretada por las células β pancreáticas en respuesta a un aumento en los niveles plasmáticos de glucosa (9). El músculo esquelético es



uno de los principales órganos blanco de esta hormona, siendo responsable de aproximadamente un 80-90% de la captación total de glucosa evaluada a través de un clamp euglicémico e hiperinsulinémico (2). El mecanismo a través del cual la insulina aumenta la captación de glucosa en la célula muscular comienza con la unión de la hormona a su receptor de membrana, conocido como receptor de insulina (IR) (7). El IR pertenece a la familia de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (10). Por lo tanto, la interacción ligando-receptor induce un cambio conformacional de su estructura permitiendo su autotransfosforilación y activación final como proteína tirosina quinasa en los segmentos β que se proyectan desde la región transmembrana hacia el citoplasma celular (7,11). Esta fosforilación en residuos tirosina, particularmente en Y960, induce el reclutamiento del sustrato del receptor de insulina isoforma 1 (IRS1) vía su dominio de unión a fosfotirosina (PTB) (12,13). El reclutamiento de IRS1 hacia el receptor favorece su fosforilación en diversos residuos aminoacídicos, entre los cuales destacan Y606 y Y628 (13). Esta fosforilación, a su vez, es reconocida por la proteína fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) a través de dominios de homología a Src 2 (SH2) (13), causando su reclutamiento en proximidad a la cara interna de la membrana plasmática y catalizando la síntesis del mensajero lipídico fosfatidil inositol [3,4,5] trifosfato (PIP₃) a partir de fosfatidil inositol [4,5] difosfato (PIP₂) (7,12). La formación de PIP₃ es reconocida por los dominios de homología a plekstrina (PH) presentes en diversas proteínas efectoras como las serina/treonina quinasa dependiente de fosfatidil inositol [3,4,5] trifosfato isoforma 1 (PDK1) y la proteína quinasa B (PKB), también conocida como Akt (7). Con ambas proteínas acopladas a la membrana plasmática, PDK1 fosforila en T308 a Akt lográndose una activación parcial de la enzima (12,14). Adicionalmente, para la activación total de Akt se requiere de una fosforilación en S473, propiciada por el complejo 2 de la diana de rapamicina de mamíferos (mTORC2) (14). Una

vez lograda la activación total, Akt es capaz de fosforilar a dos proteínas activadoras de GTPasas (en inglés “*GTPase-activating proteins*” o GAP) llamadas TBC1D1 y TBC1D4 (también conocida como sustrato de Akt de 160 kD, AS160) (15). Se ha observado que la fosforilación en T642 para AS160 (16) y en T596 para TBC1D1(15) favorece el reclutamiento de proteínas 14-3-3 a través de sus dominios PTB. Se postula que la unión de proteínas 14-3-3 a AS160 y TBC1D1 produce un cambio conformacional que inactiva la función GAP de dichas proteínas (15). De este modo existe un aumento en la actividad de proteínas G monoméricas Rab2/8/10/14 (17) las cuales se encargan del manejo de las GSV (7,15). Diversos reportes muestran que Akt también se asocia a la fosforilación del complejo Ral-GAP (RGC), encargado de regular la direccionalidad de las GSV (7). Sin embargo, hasta la fecha este mecanismo sólo ha sido descrito en adipocitos (18). En paralelo y de forma independiente a la vía de Akt-AS160, se ha descrito que la activación de PI3K se relaciona con el remodelado del citoesqueleto de actina, el cual en el músculo esquelético está mediado por la activación de la proteína G monomérica Rac1 (19). Se ha propuesto que el remodelado de la actina cortical desde una actina globular (G-actina) hacia una actina filamentosa (F-actina) juega un papel en la translocación de GLUT4 favoreciendo el reclutamiento de PI3K-Akt, el tráfico vesicular y el anclaje de GSV en la membrana (20–22). De este modo, la acción de la insulina en conjunto con la activación de la vía PI3K-Akt-AS160 se vinculan con un incremento en los niveles de GLUT4 en la superficie.

La participación de IRS1 (23,24), PI3K (25), Akt (26) y AS160 (27), además del remodelado del citoesqueleto cortical de actina (28) en el proceso de translocación de GLUT4 ha sido estudiado y descrito ampliamente por el grupo de la Dra. Amira Klip en modelos de miotubos de rata L6. Respecto al tráfico vesicular de GLUT4 en respuesta a insulina se ha reportado que

la elevación en los niveles de GLUT4 en superficie parecen ser principalmente mediados por un aumento de la exocitosis en músculo esquelético adulto tanto de ratas como de humanos (29). Sin embargo, en miotubos L6 que expresan endógenamente el *tag* hemaglutinina (HA) en el epítoto exofacial de GLUT4 (L6 HA-GLUT4), se ha observado tanto un aumento de la exocitosis como una disminución en la tasa de endocitosis (30).

En complemento al mecanismo previamente descrito, estudios realizados por Espinosa y colaboradores (31) y Contreras-Ferrat y colaboradores (32,33) han reportado que la unión de insulina a su receptor se asocia a una activación de la NADPH oxidasa 2 (NOX2) vía PI3K-proteína quinasa C α/β (PKC α/β) y a la generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es una especie reactiva de oxígeno que favorece la liberación de calcio (Ca^{2+}) desde el retículo sarcoplasmático por oxidación reversible de residuos de cisteínas reactivas presentes en el canal receptor de ryanodina 1 (RyR1) (34). En paralelo, insulina activa la vía PI3K-fosfolipasa C gamma (PLC γ), que sintetiza inositol trisfosfato (IP_3) produciendo un aumento en la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático hacia el citosol vía el canal de Ca^{2+} receptor de IP_3 (IP_3R). Cabe señalar que la translocación de GLUT4 se reduce al inhibir la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoendoplasmático, tanto con inhibidores farmacológicos como con herramientas moleculares para IP_3R y RyR1 (33). Estos resultados sugieren que los transitorios de la concentración de Ca^{2+} intracelular pueden jugar un papel relevante en el proceso de translocación de GLUT4 y captación de glucosa dependiente de insulina.



ii) Captación de glucosa vía GLUT4 independiente de insulina.

La contracción muscular, generalmente asociada a la realización de ejercicio físico, es capaz de inducir un incremento en la translocación de GLUT4 de forma independiente a insulina (35). Se ha observado que a mayor intensidad y duración de un esfuerzo físico, la captación de glucosa inducida por la contracción muscular es mayor (36). Si bien hasta el día de hoy no existe completa certeza acerca del mecanismo involucrado en esta elevación de la captación de glucosa, se postula que existe una convergencia con la vía de señalización de insulina a nivel de AS160 y TBC1D1, tal como se muestra en la **Figura 1** (6,15,37,38).

Gran parte del conocimiento actual acerca de los mecanismos que regulan el proceso de translocación de GLUT4 en el músculo esquelético se deben a estudios efectuados en líneas celulares L6 (39–41). Una de estas aproximaciones es la línea celular L6 transformadas, las cuales expresan de manera estable un epítotope *myc* en la primera asa extracelular del transportador GLUT4 (L6-GLUT4*myc*) (42). A través de una aproximación colorimétrica, el modelo L6-GLUT4*myc* permite de forma rápida estudiar y cuantificar la translocación de GLUT4 en respuesta a insulina u otros estímulos (42). Adicionalmente, la participación de IRS1 (23,24), PI3K (25), Akt (26) y AS160 (27), además del remodelado del citoesqueleto cortical de actina (28) en el proceso de translocación de GLUT4, se ha estudiado ampliamente por el grupo de la Dra. Amira Klip en modelos de miotubos de rata L6. Al respecto del tráfico vesicular de GLUT4 en respuesta a insulina se ha reportado que la elevación en los niveles de GLUT4 en superficie parecen ser principalmente mediados por un aumento de la exocitosis en músculo esquelético adulto de ratas y humanos (29). Sin embargo, en miotubos L6 que expresan endógenamente el *tag* hemaglutinina (HA) en el epítotope exofacial de GLUT4 (L6

HA-GLUT4), se ha observado tanto un aumento de la exocitosis como una disminución en la tasa de endocitosis (30).

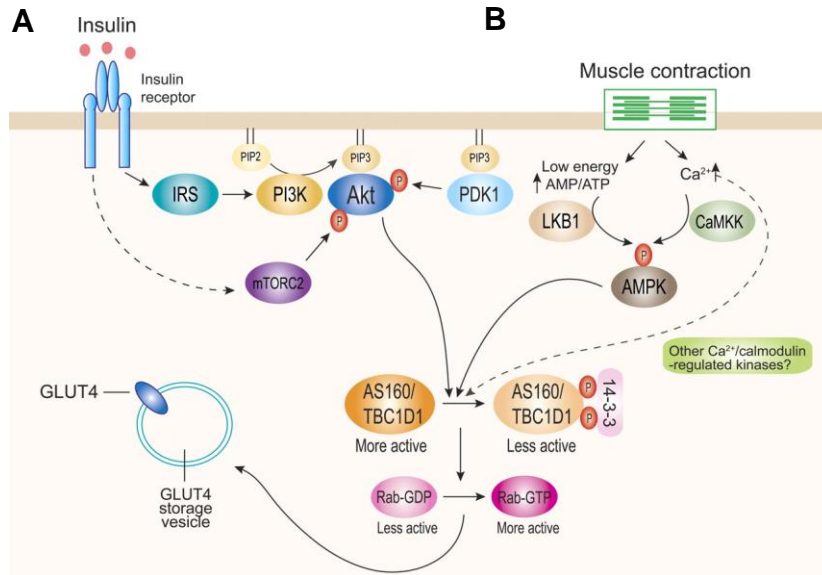


Figura 1. Vías de señalización involucradas en las translocación de GLUT4. En la representación se muestran los mecanismos dependientes de insulina (A) e independientes de insulina (B) involucrados en la translocación de GLUT4 hacia la superficie celular del músculo esquelético: (A) La insulina se une al receptor de insulina, proceso que promueve la activación de su actividad catalítica, permitiendo la fosforilación en Y606 y Y628 de IRS. Esta fosforilación induce el reclutamiento de PI3K en proximidad a la membrana, proteína encargada de catalizar la síntesis de PIP₃ a partir de PIP₂. A su vez, PIP₃ actúa como plataforma para promover el reclutamiento a la membrana de PDK1 y Akt. Una vez acoplados a la membrana, PDK1 puede activar parcialmente a Akt por fosforilación en T308. En paralelo, mTORC2 es capaz de fosforilar en S473 a Akt, promoviendo su máxima activación. Una vez activo Akt fosforila a AS160 en T642 y a TBC1D1 en T596 inactivando su actividad GAP por unión de proteína 14-3-3 y estimulando la translocación de vesículas de GLUT4 por mayor actividad de proteínas G monoméricas Rab. (B) La contracción muscular promueve la activación de LKB1 por cambios en el estado energético celular y de CaMKK por una elevación en los niveles intracelulares de Ca²⁺. Tanto LKB1 como CaMKK pueden fosforilar y activar a AMPK, proteína que a su vez es capaz de fosforilar a TBC1D1 y a AS160, promoviendo de este modo la translocación de GLUT4. Extraído y modificado desde Sakamoto y cols. (2008). *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. Volume 295, Issue 1, Pag. 29-37.

Uno de los principales candidatos propuestos en la literatura es la quinasa activada por adenosina monofosfato (AMPK), un sensor del estado energético celular cuya activación

estaría mediada por la proteína quinasa de hígado B1 (LKB1) (15,38,43). En fibras musculares de ratón, la activación de AMPK (particularmente la isoforma AMPK2 α) a través del compuesto activador 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribonucleosido (AICAR), un homólogo de adenosina monofosfato (AMP) produce una elevación en la fosforilación de AS160 independiente de la vía PI3K-Akt (27). Por otra parte, la liberación intracelular de Ca²⁺, implícita al acoplamiento excitación-contracción de la célula muscular, también se ha propuesto como una reguladora importante en la translocación de GLUT4 (6). Al respecto se ha observado que al estimular a miotubos L6 con ionomicina, un ionóforo que permite el ingreso de Ca²⁺ a la célula, existe un aumento en la translocación de GLUT4 asociado a una mayor activación de proteínas quinasas C clásicas (cPKC), AMPK y Ca²⁺ calmodulina quinasa II (CaMKII), además de un aumento de la exocitosis y disminución de la endocitosis de vesículas de GLUT4 (44).

Así mismo, tanto cPKC (37) como CaMKII (6) han sido postuladas como posibles reguladoras de la fosforilación de AS160. En paralelo al papel del Ca²⁺, el estímulo eléctrico *per se* también ha sido postulado como un mecanismo capaz de inducir un aumento en los niveles de GLUT4 en la superficie de la célula muscular. De forma independiente a cambios en el estado energético intracelular, estímulos de despolarización eléctrica han mostrado inducir un aumento en los niveles superficiales de GLUT4 vía una disminución en la tasa de endocitosis en miotubos L6 (45). Estudios realizados en el Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo (ICBM, Universidad de Chile) por Osorio-Fuentealba y colaboradores (46) han descrito un nuevo posible mecanismo involucrado en la translocación de GLUT4 inducida por estímulos eléctricos que consiste en la liberación de adenosin trifosfato (ATP), el cual es capaz de actuar de forma autocrina y activar la vía PI3K-Akt-AS160 de forma independiente a insulina (47).

Tal como se ha descrito anteriormente, los mecanismos que regulan la captación de glucosa a través de la translocación de GLUT4 en la célula muscular se caracterizan por su alta complejidad y aún existen muchas preguntas por responder en esta línea de investigación. Así mismo, es una incógnita como dicho proceso es susceptible a ser regulado por proteínas o péptidos extracelulares diferentes a la insulina, tales como citoquinas, las cuales pueden ser liberadas al medio extracelular en respuesta a diversos estímulos y pueden jugar un papel relevante en el control del metabolismo. Por esta razón, se requieren nuevos estudios que complementen la evidencia actual y otorguen nuevos conocimientos en el área.

B. FGF21 y su rol en la regulación del metabolismo.

En los últimos años se han estudiado los efectos de diversas citoquinas, sobre el control de la glicemia y la regulación del metabolismo en órganos insulino-dependientes (48). Dentro de este grupo se encuentra el Factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) el cual es sintetizado y liberado desde hepatocitos, adipocitos y/o miocitos (49) en respuesta a diversos estímulos de estrés tales como exposición a bajas temperaturas, ayuno, ingesta excesiva de macronutrientes (50) y la realización de ejercicio físico (51). FGF21 puede actuar regulando el metabolismo de distintos órganos blanco de forma endocrina, paracrina y/o autocrina (52). El mecanismo de acción de FGF21 sobre la célula blanco es a través de su unión al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), particularmente las isoformas 1c (FGFR1c) y 3c (FGFR3c) (53). Tanto FGFR1c como FGFR3c pertenecen a la familia de los receptores tirosina quinasa y requieren además del acoplamiento de una proteína de transmembrana que actúa como un cofactor del receptor, denominada β -Klotho (KLB) (53,54). Una vez que el ligando se une al complejo FGFR/KLB se pueden activar una serie de vías de señalización, entre las cuales destacan la vía PI3K-Akt, PLC γ /DAG-IP₃/PKC-Ca²⁺ y ERK1/2 (53,55).

La acción de FGF21 es pleiotrópica y depende de la expresión de FGFR/KLB en cada tejido (52,56,57). A nivel hepático FGF21 actúa promoviendo la oxidación de ácidos grasos, cetogénesis y la gluconeogénesis, además de promover la lipólisis (58–62). A pesar de esto, la expresión hepática de receptores FGFR1/2/3 es baja y estímulos directos de FGF21 a concentraciones fisiológicas sobre el hepatocito no son capaces de activar las vías de señalización asociadas a FGFR/KLB (56,57). Sin embargo, estímulos farmacológicos suprafisiológicos de FGF21 sobre hepatocitos aislados inducen la fosforilación ERK1/2 y activación en la expresión de genes tempranos (56). Por lo tanto, los efectos fisiológicos de FGF21 sobre el metabolismo hepático parecen ser indirectos a su señalización celular (56). Al respecto se ha descrito que la liberación hepática de FGF21 jugaría un papel endocrino a nivel del sistema nervioso (63), condición que promueve la activación del eje hipotalámico-hipofisiario y la posterior liberación de glucocorticoides desde la corteza suprarrenal (64). El modelo propuesto establece que la liberación glucocorticoides inducida por FGF21 es responsable de la respuesta hepática de adaptación a las condiciones de ayuno (49,63,64). A su vez, FGF21 hepático y los glucocorticoides parecen regularse mutuamente a través de un mecanismo de retroalimentación positiva en el cual FGF21 es capaz de estimular vía sistema nervioso central la producción y liberación de la hormona adenocorticotropina (ACTH), mientras que estímulos con el glucocoticoide dexametasona promueven la expresión de FGF21 en el hígado vía el receptor de glucocoticoide (GR) (64). Por su parte, en adipocitos se ha reportado que FGF21 es capaz de favorecer la captación de glucosa, tanto en líneas celulares 3T3-L3 como en cultivo primario de humano (65). Además, se ha propuesto que FGF21 induce un proceso de “*browning*” del tejido adiposo, mediante un aumento en la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP1) mitocondrial (66). En contraste a los modelos



previamente señalados, menor es la evidencia que existe respecto al papel que jugaría FGF21 en la regulación de la función muscular.

En ratones *knock-out* músculo específico para carnitil-palmitoil transferasa 1 (CPT1), proteína clave en el proceso de β -oxidación mitocondrial, se ha descrito un aumento en la expresión y liberación de FGF21 por activación de Akt que favorece la captación de glucosa, principalmente vía GLUT1. (67). Si bien estos resultados sugieren un aparente papel de FGF21 en la captación de glucosa muscular mediada por GLUT1, el diseño experimental comúnmente empleado en dichos estudios sólo ha contemplado estímulos crónicos de FGF21, generalmente asociados a condiciones patológicas (49). Resultados no publicados obtenidos por Rosales y colaboradores (Laboratorio Fisiología Celular del Muscular, ICBM, Universidad de Chile) han mostrado que estímulos de FGF21 a una concentración de 100 ng/mL durante 20 min, son capaces de inducir un aumento en la captación de 2-NBDG, compuesto fluorescente fosforilable/no metabolizable análogo a la glucosa, en fibras musculares de ratón adulto. Así mismo, este aumento en la captación de 2-NBDG se bloqueó por indinavir, un inhibidor competitivo del sitio de unión citoplasmático de glucosa del transportador GLUT4 (68), tal como se muestra en la **Figura 2**. Dado que indinavir afecta el transporte de glucosa mediado por GLUT4 sin alterar la actividad del transportador GLUT1 (68), estos resultados sugieren que estímulos agudos con FGF21 podrían incrementar la captación de glucosa por un aumento en la translocación de GLUT4 en el músculo esquelético. Sin embargo, el mecanismo exacto a través del cual la célula muscular incrementa los niveles de GLUT4 en la superficie en respuesta a una exposición aguda de FGF21 es aún una incógnita.

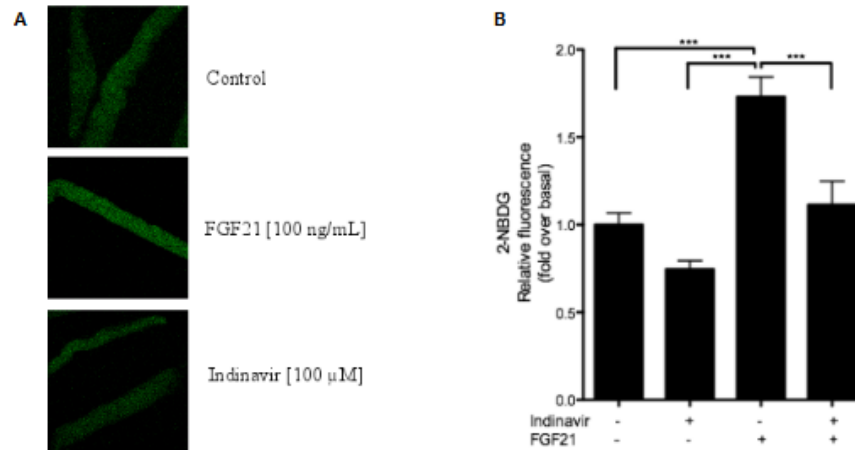


Figura 2. FGF21 aumenta la captación de 2-NBDG a través de un mecanismo dependiente de GLUT4.

Fibras de músculo esquelético adulto (FDB) se aislaron desde ratones C57/BL6, se estimularon y se incubaron con el análogo a glucosa fluorescente 2-NBDG (300 μ M) durante 15 min. Posteriormente, para determinar el papel de GLUT4 en la captación de 2-NBDG inducida por FGF21, las fibras aisladas se incubaron con FGF21 (100 ng/mL) y/o con Indinavir (100 μ M) durante 20 min. (A) Imagen representativa de la captación de 2-NBDG en microscopia confocal. (B) Cuantificación de la fluorescencia emitida por 2-NBDG en fibras estimuladas. Se observa que fibras aumentan su captación de 2-NBDG en respuesta a estímulos de FGF21. A su vez, esta captación se revierte hasta la condición basal en respuesta a indinavir, sugiriendo que captación de 2-NBDG es mediada por GLUT4. Se analizaron los resultados obtenidos de 3 experimentos diferentes utilizando ANOVA de una vía, con *post test* de Bonferroni (***) $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; resultados se muestran como promedio \pm error estándar) * diferencias respecto al control. Rosales y cols. (2016, Directores de Tesis: Drs. Ariel Contreras y Enrique Jaimovich). **Resultados sin publicar.**

Por otra parte, en miotubos de humano se ha observado que estímulos de FGF21 a una concentración de 200 ng/mL durante 24 h aumentan la captación de glucosa, tanto a través de GLUT1 como GLUT4, inclusive bajo condiciones de resistencia a la insulina inducida por palmitato (69,70).

A pesar que la mayoría de los reportes indican que la expresión de receptores FGFR en células L6 es relativamente baja (71,72), dicha expresión parece ser suficiente para generar transducción de señal y respuestas biológicas (72). Por otra parte, si bien existe evidencia indicando que la expresión de KLB en células L6 es prácticamente nula, es preciso considerar

que aquellos reportes corresponden en su totalidad a estudios efectuados en células L6 sin diferenciación (mioblastos) y que sólo se limitan a evaluar la función de KLB según la activación de la vía ERK1/2 (73).

Considerando los diversos efectos de FGF21 sobre la regulación del metabolismo (74), estudiar su participación en la translocación de GLUT4 a nivel muscular podría ofrecer nuevas perspectivas acerca de cómo citoquinas circulantes pueden regular la homeostasis de la glucosa en nuestro organismo. Por lo tanto, el presente proyecto de tesis se plantea las siguientes preguntas de investigación e hipótesis:

- ¿Podría un estímulo agudo de FGF21 aumentar los niveles de GLUT4 en la membrana plasmática en miotubos L6-GLUT4 myc ?
- ¿Cuál es la señalización involucrada en los efectos de FGF21 en miotubos L6-GLUT4 myc ?

2. **Hipótesis.**

“Un estímulo agudo de FGF21 induce exposición de GLUT4 a la superficie celular por un mecanismo que involucra la activación de Akt y el remodelado del citoesqueleto de actina cortical en miotubos L6-GLUT4 myc ”.



3. Objetivos.

Objetivo general:

Estudiar la participación de Akt y del remodelado de actina cortical en la exposición de GLUT4 a la superficie celular inducida por FGF21 en miotubos L6-GLUT4 myc .

Objetivos específicos:

En cultivos celulares de miotubos L6-GLUT4 myc :

- I. Evaluar el efecto de FGF21 sobre la exposición de GLUT4 a la superficie celular.
- II. Determinar el efecto de FGF21 sobre la fosforilación de Akt en serina 473.
- III. Estudiar el efecto de FGF21 en el remodelado del citoesqueleto de actina cortical.



4. Materiales y Métodos.

Cultivo celular.

Para la mayoría de los estudios se utilizó como medio “Dulbecco's modified essential medium” (DMEM) con 2% L-Glutamina, el cual es suplementado previamente con 1% de aminoácidos no esenciales y 2% Penicilina/Estreptomicina (todos estos reactivos obtenidos de Gibco). Mioblastos de rata L6 que expresan constitutivamente GLUT4 con un epítotope exofacial “*myc*” (L6-GLUT4*myc*) fueron obtenidos por gentileza del Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo (ICBM, Facultad Medicina, Universidad de Chile) y A. Klip (Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá). Para la proliferación de mioblastos se utilizó medio DMEM 10% suero fetal bovino (FBS) el cual fue cambiado día por medio hasta alcanzar un 50% de confluencia. Para el proceso de diferenciación se empleó medio DMEM 2% FBS, el cual debe ser cambiado todos los días durante 4-6 días hasta obtener miotubos. El proceso de proliferación y diferenciación fue monitoreado visualmente utilizando microscopía óptica (Leica DMIL Led). Fotografías digitales de microscopía óptica se obtuvieron con cámara (Leica EC3) y digitalizadas con software Leica Application Suite EZ (versión 3.2.1). Los estímulos con insulina (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca) a 100 nM o con recombinante de FGF21 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) a 100 ng/mL se efectuaron durante 20 min. Todas las células empleadas en el trabajo se mantuvieron en incubador a 37°C, 5% CO₂ hasta su uso.

Inmunodetección de proteínas.

Con el fin de evaluar la abundancia y/o activación de diversas proteínas se llevó a cabo el ensayo de Western blot con anticuerpos primarios específicos para las siguientes proteínas:

Akt, p-Akt, FGFR1, GAPDH (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) y KLB (Abcam, Cambridge, UK). Miotubos de rata L6 se lisaron desde placas de 35 mm a 4°C con 40 µL de tampón de lisis [EGTA 5 mM; EDTA 1 mM; Tris 20 mM; sacarosa 270 mM; ortovanato de sodio 1 mM; glicerofosfato de sodio 50 mM; fluoruro de sodio 50 mM; pirofosfato de sodio 500 µM; DTT 1 mM; 1% triton X100; 10% cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Basilea, Suiza)]. El lisado resultante se centrifugó a 4°C, 15294 x g durante 15 min. El sobrenadante se recolectó y posteriormente se empleó para cuantificación de proteínas utilizando el método de Lowry (75). Según el resultado de la cuantificación de proteínas se prepararon las muestras ajustando concentración de proteínas a 17 µg de proteína por carril. Previo a la carga en el gel de poliacrilamida 10% (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), las muestras se agitaron 5 s en vortex, sometidas a un pulso centrifugación y posteriormente se denaturaron en un baño seco a 95°C durante 60- 90 min hasta que los patrones muestren una separación adecuada. Para electrotransferencia se utilizaron membranas de polivinildifluoruro (PVDF) (GE Healthcare Amersham, Buckinghamshire, UK) durante 120 min a un voltaje constante de 80 V. Luego de bloquear la membrana con TBS-Tween (TBS-T) 5% leche descremada o 5% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo primario correspondiente según las especificaciones recomendadas por los fabricantes. La incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (anti-rabbit o anti-mouse, según corresponda) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando luminol o ECL (GE Healthcare) en habitación de revelado. Cuantificación de blots fue realizada empleando software Image J (National Institutes of Health, USA) y normalizada en función a Akt total o GAPDH según corresponda.



Evaluación de ARN mensajero.

El ARN mensajero (ARNm) total se extrajo desde el cultivo de miotubos con el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN complementario (ADNc) se preparó con 1 µg de ARNm, utilizando enzima SuperScript II (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) y se amplificó utilizando partidores específicos (57,76):

Partidores (Rata)	Sentido (5' → 3')	Reverso (5' → 3')
FGFR1	TGGCACCTGAGGCATTGTT	AAGAGCACCCCAAAAGACCAC
FGFR2	ACCAACTGCACCAATGAACTGT	TTAAACGTGGGCCTCTGTGA
FGFR3	TGCCTGCTGACCCCAAGT	CCTGTCCAAAGCAGCCTTCT
FGFR4	CCGGCCAGACCAAACC	TCAGGTCTGCCAAATCCTTGT
Beta-Klotho	GACGAGGGCTGTTTTATGTGG	TAATGAGCGGAGGACTTGGG
18S ARNr	TCCCCGAGAAGTTTCAGCACATCC	CTTCCCATCCTTCACGTCTTCTG

La concentración de ADN se normalizó con la expresión de una subunidad ribosomal 18S. La condiciones para la amplificación de PCR fueron las siguientes: un ciclo de 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 seg, 55°C durante 30 seg y 72°C por 30 seg y un ciclo final de 10 min a 72°C. La cuantificación de la expresión génica se normalizó posteriormente en función a la expresión de FGFR1. Los datos se expresaron en $2^{(-\Delta\Delta CT)} \pm$. Los valores CT se determinaron por el software Rotor Gene 6000 Series (QIAGEN, Hilden, Alemania) cuando la fluorescencia fue 25% más alta que el ruido basal. Los productos del PCR se verificaron a través del análisis de su curva de fusión.



Cuantificación GLUT4 myc en superficie.

Para detección de GLUT4 myc en superficie celular se llevó a cabo el protocolo descrito previamente por Osorio-Fuentealba y colaboradores (47). Brevemente, mioblastos L6-GLUT4 myc se cultivaron en placas de 24 pocillos, diferenciados hasta obtener miotubos y posteriormente incubados con medio sin suero durante 3 h para luego ser tratados con insulina (100 nM) o FGF21 (100 ng/mL) durante 20 min. Seguidamente, las células se colocaron rápidamente en hielo (4°C) y se lavaron con PBS frío (4°C) 2 veces. Posteriormente, las células se fijaron con una solución PBS al 4% de paraformaldehído durante 20 min, se lavaron 2 veces con PBS frío y se incubaron con PBS 100 mM glicina durante 10 min. Un par de placas se permeabilizaron con PBS 0,1% TRITON X100 durante 10 min como un control positivo. Luego de ser lavadas nuevamente con PBS frío (3 veces), las células se incubaron con PBS 5% suero fetal bovino (BSA) durante 15 min con el fin de prevenir unión inespecífica del anticuerpo primario (anti- myc) en la monocapa celular. Una vez bloqueadas, se incubaron con 1 μ g/mL (1:500) de anticuerpo primario “anti- myc ” (monoclonal, mouse, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) en PBS 2,5% BSA durante toda la noche a 4°C, dejando 2 placas sin incubación como control. Seguidamente, las células se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (anti-ratón 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) en PBS 2,5% BSA por 45 min a 4°C o 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron cuidadosamente 5 veces con PBS frío y se incubaron con 1 mL de solución O-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) disuelta en buffer fosfato-citrato 0,05 M; pH: 5, más 20 μ L de H₂O₂ al 30% hasta que el medio de los pocillos adquirió un color anaranjado. La reacción se detuvo por la adición de 250 μ L de 3 M HCl a los 30 min. Luego de homogenizar cuidadosamente, el

sobrenadante de cada placa se recolectó y traspasó en duplicado hasta una placa de 96 pocillos. La absorbancia se evaluó a una longitud de onda de 492 nm en espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Captación de 2-NBDG.

Con el fin de estimar la captación de glucosa en la línea celular L6-GLUT4 myc , los mioblastos se sembraron en placas de 35 mm sobre vidrios cubre objetos de 25 mm de diámetro hasta obtener miotubos. Luego, las células se incubaron con DMEM sin suero durante 2 h y posteriormente se trataron con una solución KREBS sin glucosa durante 5 min. Tras 20 min de estímulo con insulina (100 nM) o FGF21 (100 ng/mL), las células se incubaron con el análogo a glucosa fluorescente 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucosa 2-NBDG a 300 μ M de durante 20 min. Luego de ser lavadas, las células se mantuvieron con KREBS con glucosa (5,6 mM) durante 5 min y posteriormente se observaron a través de microscopía de epifluorescencia Cell Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemania) excitando la sonda a 488 nm y registrando la emisión empleando un filtro paso banda de 525 nm. La cuantificación de la fluorescencia se realizó con el software Image J (National Institutes of Health, USA). Se llevaron a cabo 4 experimentos independientes ($n = 4$). En cada experimento se tomaron 10 imágenes por condición, con al menos 10 miotubos analizados. Se seleccionaron tres regiones de interés sobre cada miotubo, las cuales se promediaron y posteriormente se ajustaron sustrayendo el valor correspondiente a una región de interés posicionada en el extracelular. Finalmente, los datos se normalizaron y expresaron en función a la fluorescencia relativa a la condición basal.



Remodelado de citoesqueleto de actina cortical.

Para evaluar cambios en remodelado de actina cortical, las células se cultivaron en placas de 12 pocillos sobre cubre objetos de vidrio de 18 mm de diámetro, se diferenciaron a miotubos y se privaron de suero por 2 h previo a la estimulación con insulina o FGF21. Posteriormente, las células se fijaron con PBS al 4% paraformaldehído durante 20 min a 4°C, se lavaron 2 veces con PBS frío y posteriormente se incubaron con la sonda fluorescente rodamina/faloidina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluida 1:200 en PBS al 2,5% BSA durante 30 min con el fin de marcar los niveles de actina cortical. Finalmente, para analizar la polimerización de actina las células se observaron utilizando microscopio de epifluorescencia Cell Observer Z1 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemania) excitando la sonda a 543 nm (rojo) para la sonda rodamina/faloidina. Se llevaron a cabo 4 experimentos independientes (n = 4). En cada experimento, se tomaron 10 imágenes por condición. Para cada condición se analizaron al menos 10 miotubos. El criterio de selección para miotubos fue en base a la morfología y número de núcleos, los cuales se marcaron utilizando la sonda fluorescente Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El número de risos de membrana (*membrane ruffles*) se determinó usando el software ImageJ posterior a la configuración de umbral de la imagen. Se contabilizaron el número total de risos de membrana en función al número de miotubos presentes en cada imagen. Los datos se expresaron como la razón del número de risos por el número de miotubos. Así mismo, para evaluar el patrón del citoesqueleto de actina filamentosa se hizo un análisis del perfil de fluorescencia correspondiente a un trazo transversal del miotubo para cada condición experimental con el software Image J (National Institutes of Health, USA).



Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 6. Los datos se sometieron a una prueba de normalidad de D'Agostino & Pearson ($n = 4$). Los resultados de los experimentos se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar (DE), y la significancia de las diferencias se evaluó usando la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para datos no paramétricos de Kruskal-Wallis y una prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Dunn. Se consideró un $p < 0,05$ para la significancia estadística.



5. Resultados

Modelo de miotubos L6-GLUT4 myc .

En los experimentos efectuados se empleó la línea celular de mioblastos de rata transformados L6-GLUT4 myc , los que se estimularon con un medio de proliferación DMEM al 10% de suero fetal bovino (FBS) reemplazado diariamente hasta alcanzar una confluencia igual o menor al 50%. Posteriormente se diferenciaron durante 4 días con un medio DMEM 2% FBS. Para garantizar que la expresión de GLUT4 myc fuera la óptima, los mioblastos se seleccionaron inicialmente con blasticidina (100 μ M). En la **Figura 3** se observa un cultivo representativo a través de microscopía de campo claro.

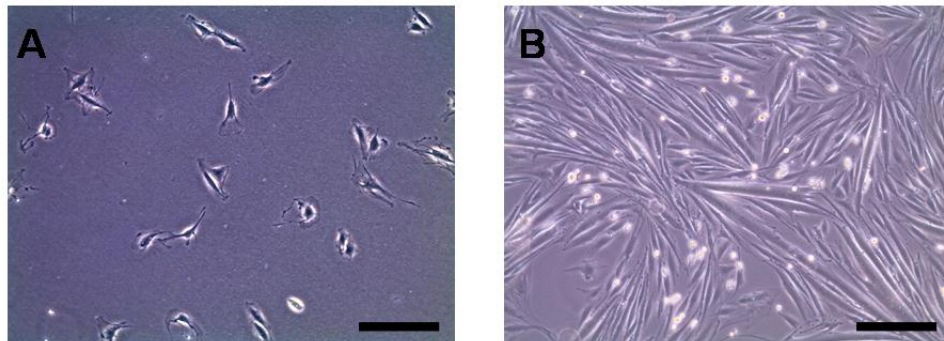
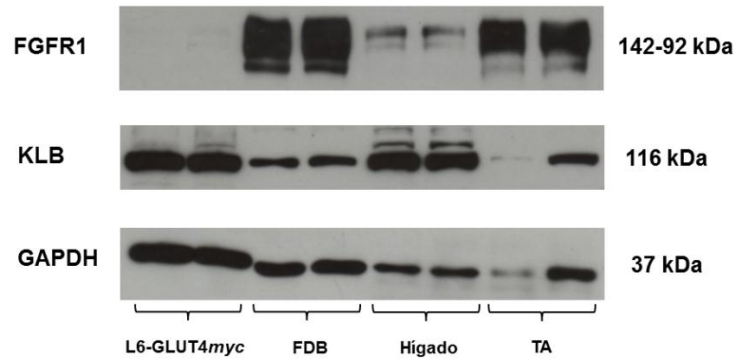


Figura 3. Formación de miotubos a partir de mioblastos transformados de rata L6-GLUT4 myc . (A) Mioblastos L6-GLUT4 myc se sembraron y estimularon día por medio con medio DMEM 10% suero fetal bovino (FBS) hasta alcanzar el 50% de confluencia. Posteriormente, las células se estimularon diariamente con DMEM 2% FBS durante 4 días hasta diferenciarse en miotubos (B). Imagen representativa de microscopía de luz. Escala imagen: 100 μ m.

Expresión de FGFR1 y KLB en miotubos L6-GLUT4 myc .

Tal como se sugiere en reportes previos (52,56,57), la acción de FGF21 sobre un tejido o línea celular depende principalmente de la expresión del receptor FGFR1 y de KLB. A través de la técnica de RT-qPCR se observó que existe expresión de ARN mensajero para los receptores FGFR en sus cuatro isoformas, incluido FGFR1, y para KLB en miotubos L6-GLUT4 myc (resultados no mostrados). Con el objetivo de evaluar la expresión relativa de FGFR1 y KLB en miotubos L6-GLUT4 myc se realizó un ensayo de Western blot en el cual se comparó la abundancia proteica de los receptores de FGF21 entre la línea celular L6-GLUT4 myc y diversos tejidos de ratón adulto C57/BL6J. En la **Figura 4A y 4B** se observa que abundancia de FGFR1 en miotubos L6-GLUT4 myc fue prácticamente nula en comparación otros tejidos tales como fibras musculares de *flexor digitorum brevis* (FDB), hígado o tejido adiposo de ratones adultos C57/BL6J. Por su parte, la abundancia de KLB fue relativamente similar a la observada en el hígado y ligeramente superior a la encontrada en fibras musculares de FDB y tejido adiposo. En su conjunto, estos resultados sugieren que los miotubos L6-GLUT4 myc expresan tanto el ARN mensajero como las proteínas correspondientes a FGFR1 y KLB. Sin embargo, el grado de expresión de proteica de FGFR1 en la línea celular L6-GLUT4 myc es bajo en comparación a otros tejidos sensibles a FGF21 tales como músculo, hígado o tejido adiposo.

A



B

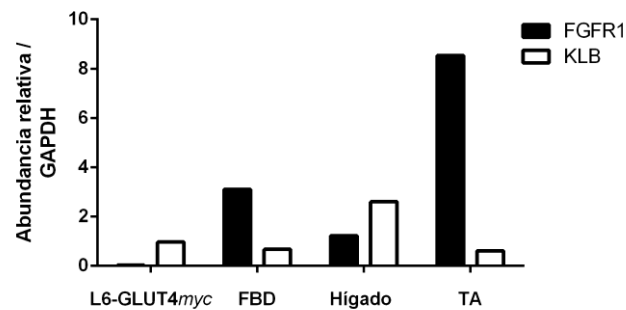


Figura 4. Abundancia relativa de FGFR1 y KLB en miotubos L6-GLUT4myc. (A) Imagen representativa de inmunodetección relativa de proteínas en miotubos L6-GLUT4myc en función a tejidos de ratón: flexor digitorum brevis (FDB), hígado y tejido adiposo (TA) (n = 2). En cada carril se cargaron 17 µg de proteína. (B) Cuantificación de relación FGFR1/GAPDH en negro y KLB/GAPDH en blanco (n = 2) expresada como valor promedio. FGFR1: receptor de factor de crecimiento isoforma 1; KLB: β-Klotho; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. GAPDH fue medida como control de carga. Cuantificación de densitometría realizada con Image J.

Efecto de FGF21 sobre los niveles de GLUT4 en la superficie celular en miotubos L6-GLUT4myc.

Con el objetivo de evaluar el efecto de FGF21 sobre la exposición de GLUT4 en miotubos L6-GLUT4myc se efectuó el ensayo de detección óptica de GLUT4myc en superficie empleado previamente por Osorio-Fuentealba y colaboradores (52). Brevemente, luego de un periodo de estimulación con FGF21 e insulina, los miotubos se fijaron y se marcaron con un anticuerpo

primario que permite reconocer el epítoto exofacial c-*Myc* acoplado a GLUT4 y un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Posteriormente, las células se incubaron con una solución amortiguador fosfato citrato suplementada con peróxido de hidrógeno y o-fenilenediamina dihidrocloruro. Estos compuestos reaccionan en presencia de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario produciendo un compuesto cromógeno de color amarillo el cual será de mayor intensidad a medida que más epítoto –*myc* del GLUT4*myc* esté presente en la superficie celular. Como se muestra en la **Figura 5A**, la adición de 100 nM de insulina promovió un aumento significativo de $2,24 \pm 0,35$ veces en comparación a la condición basal ($1,00 \pm 0,06$ veces). Se encontraron valores similares en la condición 100 nM insulina + 100 ng/mL FGF21 ($2,33 \pm 0,26$ veces). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en respuesta las diferentes concentraciones ensayadas de FGF21. Este resultado sugiere que un estímulo agudo de FGF21 no promovería una exposición en la superficie celular de GLUT4*myc* en las células musculares en cultivo. Por otro lado, se estudió el efecto de 100 ng/mL FGF21, concentración que en fibras adultas promueve captación de glucosa (**Resultados sin publicar, Figura 2 y Figura S1A**) durante distintos tiempos de estimulación. Como muestra la **Figura 5B**, FGF21 no promovió cambios estadísticamente significativos en los niveles de GLUT4*myc* en superficie a los diferentes tiempos de estimulación. En conjunto, estos resultados sugieren que FGF21 no promueve cambios en la abundancia de GLUT4*myc* en la superficie celular en miotubos L6-GLUT4*myc* a los tiempos y concentraciones ensayadas

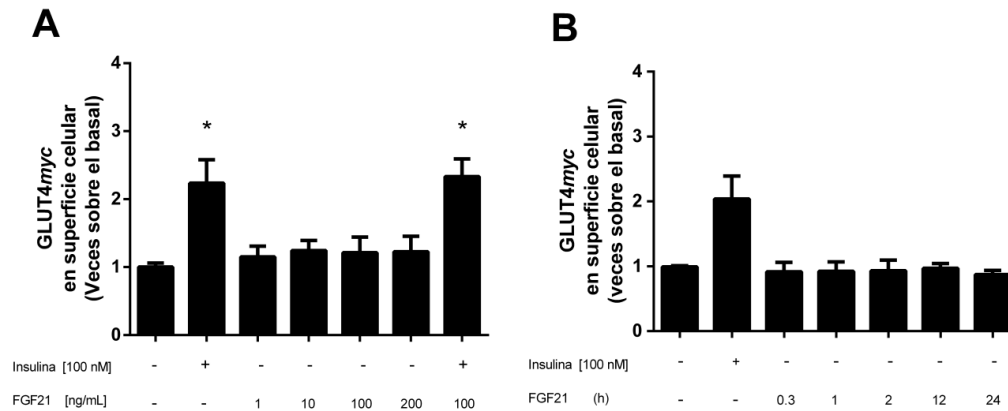


Figura 5. Efecto de FGF21 en la exposición de GLUT4myc en miotubos L6-GLUT4myc. Ensayo de detección óptica de GLUT4myc en superficie de miotubos L6-GLUT4myc. **(A)** Curva dosis-respuesta de FGF21 a 1, 10, 100 y 200 ng/mL por 20 min en miotubos L6-GLUT4myc (n = 5). **(B)** Curva tiempo-respuesta de FGF21 a 0, 0.3, 1, 2, 12 y 24 h sobre miotubos L6-GLUT4myc a una concentración estándar de 100 ng/mL (n = 5). Valores expresados como veces de aumento con respecto a la condición basal. ANOVA de una vía para datos no paramétricos de Kruskal-Wallis con *post-hoc* de comparaciones múltiples de Dunn. * p < 0,05. Resultados se muestran como promedio ± desviación estándar.

FGF21 no induce captación de 2-NBDG.

Para estudiar el efecto de FGF21 sobre la captación de glucosa miotubos L6-GLUT4myc se realizó un ensayo de captación de 2-NBDG (77). Como se observa en la **Figura 6**, existió un aumento estadísticamente significativo en la captación de 2-NBDG en respuesta a insulina (p = 0,0005) equivalente a $2,25 \pm 0,65$ veces sobre la condición basal. Por otra parte, no se observó un aumento significativo en la captación de 2-NBDG en aquellas células preincubadas con FGF21. En conjunto, nuestros resultados sugieren que un estímulo agudo de FGF21 a 100 ng/mL genera cambios estadísticamente significativos sobre la captación de glucosa en miotubos L6-GLUT4myc.

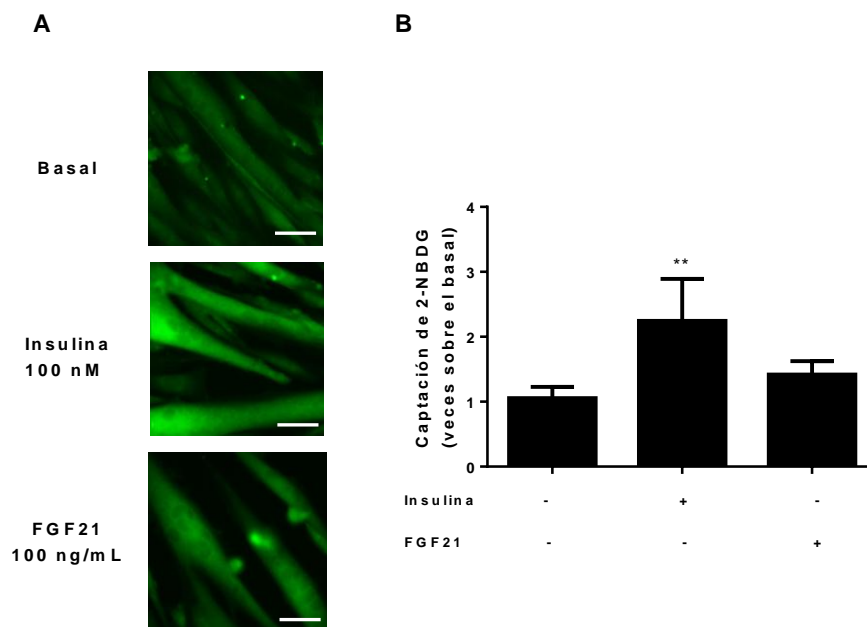


Figura 6. FGF21 no aumenta la captación de 2-NBDG en miotubos L6-GLUT4myc. Los miotubos se incubaron con la sonda 2-NBDG (300 μ M) durante 20 min. Posteriormente, los miotubos se incubaron con insulina (100 nM) o FGF21 (100 ng/mL) durante 20 min. (A) Imagen representativa de la captación de 2-NBDG en microscopía de epifluorescencia, con lectura a longitud de onda de 488 nm. (B) Cuantificación de la fluorescencia emitida por 2-NBDG en miotubos estimulados (n = 4). ANOVA de una vía para datos no paramétricos de Kruskal-Wallis con *post-hoc* de comparaciones múltiples de Dunn. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. Escala imagen: 50 μ m

FGF21 no promueve fosforilación de Akt en serina 473.

Con el objetivo de determinar el efecto de FGF21 sobre la activación de Akt, proteína implicada en la translocación de GLUT4 inducida por insulina, se evaluó la fosforilación de Akt (Ser473) por análisis de Western blot. Como se observa en la **Figura 7 y 8**, se detectó el aumento canónico en la fosforilación de Akt (Ser473) en respuesta a estímulos agudos de insulina. Este aumento también se observó en la condición de FGF21 + insulina. Sin embargo, no se observó la fosforilación de Akt en las células tratadas con FGF21 a diferentes concentraciones. Estos resultados sugieren que un estímulo agudo de FGF21 no promueve la



activación de Akt en Ser473, lo cual podría explicar la ausencia del efecto FGF21 sobre la exposición en la superficie celular de los GLUT4 (**Figura 5**).

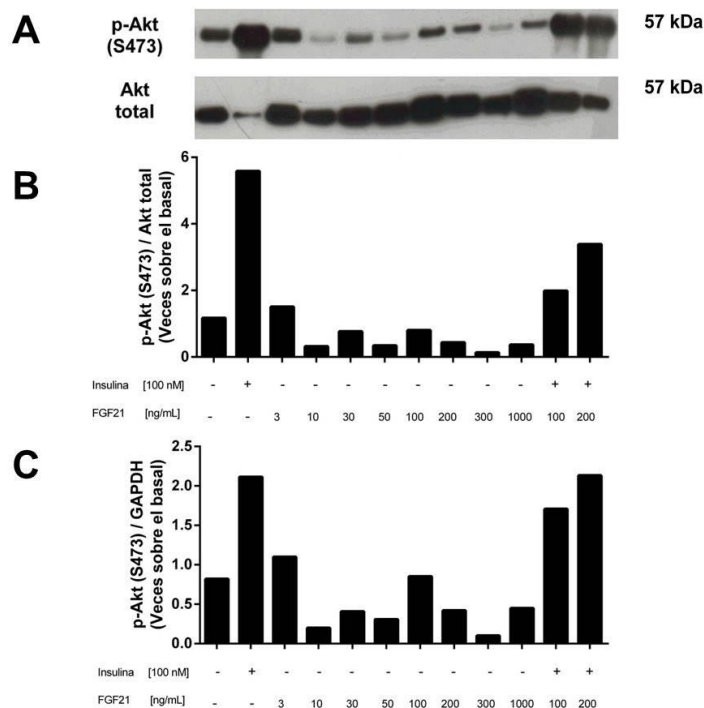


Figura 7. Efecto de FGF21 sobre la p-Akt (S473). (A) Imagen representativa de la banda inmunoreactiva para Akt en Ser473 por la incubación de FGF21 a 3, 10, 30, 50, 100, 200, 300 y 1000 ng/mL sobre miotubos L6-GLUT4 myc por 20 min. (B) Cuantificación de relación p-Akt/Akt ($n = 2$) normalizada en función a la condición basal y expresada como valor promedio. (C) Cuantificación de relación p-Akt/GAPDH ($n = 2$) normalizada en función a la condición basal y expresada como valor promedio. En cada carril se cargaron 17 μ g de proteína. GAPDH se evaluó como control de carga. p-Akt (S473): Fosforilación de Akt en serina 473; Akt total; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Cuantificación de densitometría realizada con Image J.

Con el fin de confirmar estos datos, se realizaron ensayos de Western blot a una concentración de 100 ng/mL FGF21 durante 20 min. Tal como se observa en la **Figura 8**, insulina a una concentración de 100 nM durante 20 min indujo un aumento significativo en la fosforilación de Akt en Ser473. Contrariamente, FGF21 a 100 ng/mL durante 20 min no mostró efecto

sobre la fosforilación de Akt en Ser473. A su vez, la co-incubación de insulina más FGF21 mostró un efecto similar a la condición de estimulación con insulina sobre la fosforilación de Akt. Estos resultados, en conjunto con los anteriormente mostrados, sugieren que FGF21 no induce respuesta de fosforilación sobre Akt.

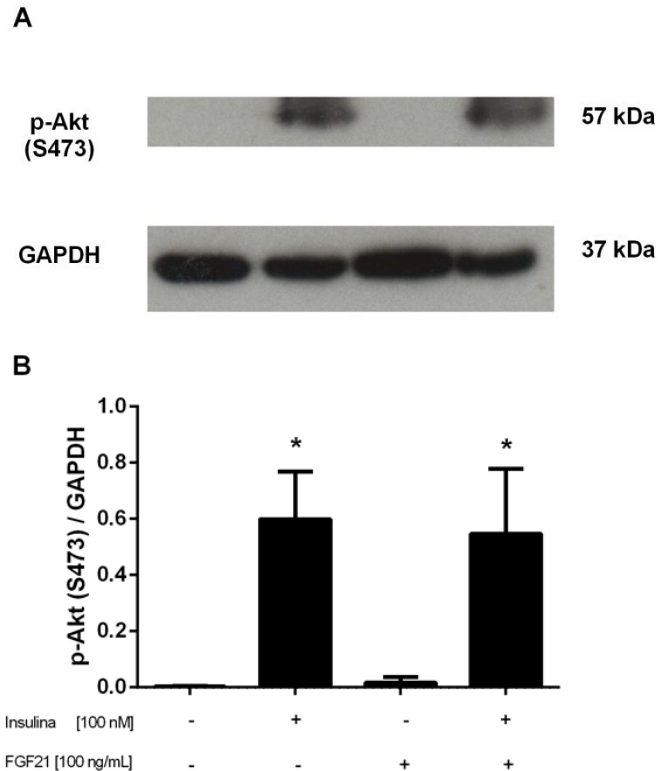


Figura 8. Efecto de FGF21 sobre la p-Akt (Ser473). (A) Imagen representativa del efecto de 100 ng/mL FGF21 sobre la p-Akt en Ser473 en miotubos L6-GLUT4myc durante 20 min. (B) Cuantificación de relación p-Akt/GAPDH (n = 4) expresada como valor promedio. 17 μ g por carril. p-Akt (S473): Fosforilación de Akt en serina 473; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Cuantificación de densitometría realizada con Image J. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples para datos no paramétricos de Kruskal-Wallis con *post-hoc* de Dunn. * p < 0,05. Resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar.



FGF21 no genera efectos sobre el remodelado de actina cortical.

Como se reporta en la literatura, el remodelado de actina cortical es fundamental en el proceso de translocación de GLUT4 inducido por insulina en miotubos L6-GLUT4 myc (28,78,79). Con el objetivo de estudiar el posible efecto de FGF21 sobre el citoesqueleto de actina se realizó un ensayo de fluorescencia empleando la sonda rodamina/faloidina, la cual posee una gran afinidad por el citoesqueleto de actina filamentosa (F-actina). Como se puede observar en la **Figura 9A**, el citoesqueleto de actina permaneció en forma de fibras de estrés en condiciones basales. Por otro lado, en respuesta a insulina, se observaron puntos pequeños de mayor fluorescencia distribuidos a lo largo de los miotubos, los cuales corresponden a rizos de membrana (del inglés, *membrane ruffles*) descritos anteriormente por Tong y colaboradores (28). En contraste, este fenómeno no fue constatado en respuesta a FGF21, observándose un patrón similar a la condición basal. A su vez, se realizó una cuantificación del número de rizos de membrana relativos a la cantidad de miotubos, observándose un aumento estadísticamente significativo ($p = 0,04$) en respuesta a insulina, sin observarse diferencias significativas entre la condición basal y FGF21 (**Figura 9B**).

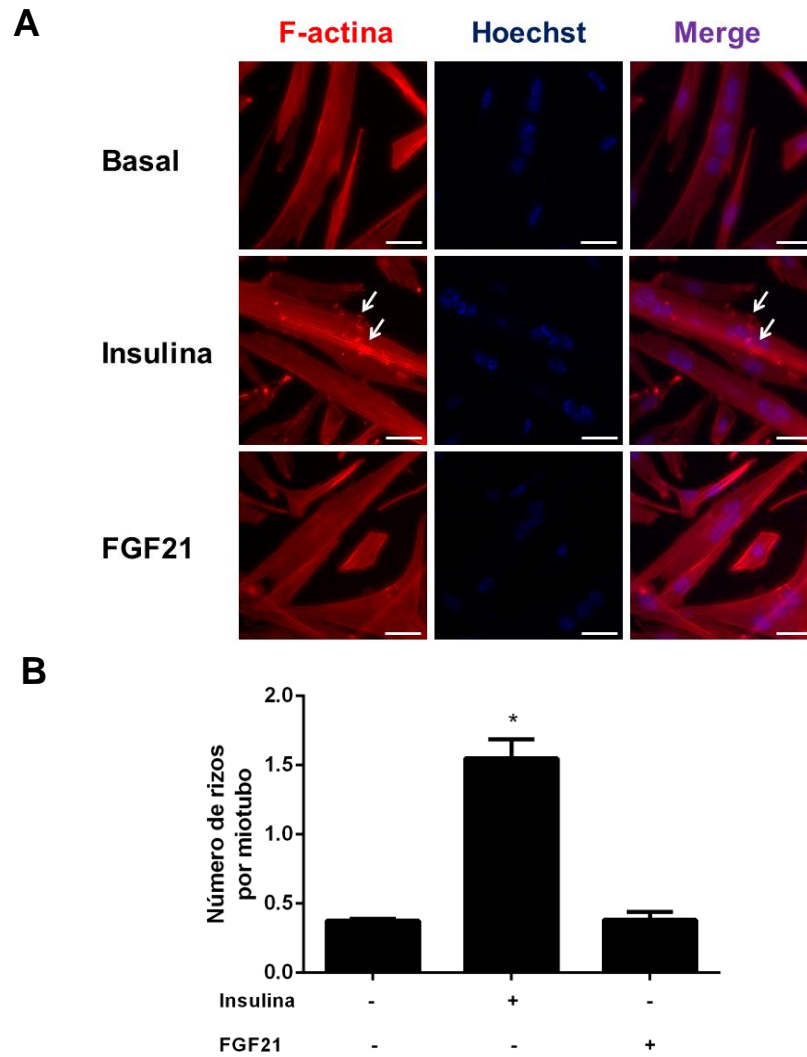


Figura 9. Efecto de FGF21 sobre la formación de rizos de membrana. (A) Imagen representativa de microscopía de epifluorescencia en miotubos L6-GLUT4myc estimulados con insulina (100 nM) y/o FGF21 (100 ng/mL) durante 20 min. Posterior a la estimulación, las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con las sondas fluorescentes rodamina/faloidina para marcar el citoesqueleto de actina filamentosa (F-actina) y Hoechst 33342 para marcar núcleo. Rizos de membrana se muestran en las flechas blancas. Escala imagen: 50 μ m. (B) Cuantificación número de rizos de membrana por miotubos (n = 4). Para cada condición se analizaron al menos 10 miotubos. Cuantificación de miotubos y rizos de membrana se realizó con Image J. Para análisis estadístico se empleó prueba ANOVA de una vía para datos no paramétricos de Kruskal-Wallis con *post-hoc* de Dunn. * $p < 0,05$. Resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar.

Adicionalmente, se realizó un análisis del perfil de fluorescencia correspondiente a un trazo en sentido transversal de los miotubos (**Figura 10A**). Tal como se observa en la **Figura 10B**, la condición basal presentó un patrón de fluorescencia en forma de picos, los cuales representan la disposición de las fibras de estrés del citoesqueleto de actina. Sin embargo, en respuesta a insulina el patrón de fluorescencia presentó un aumento puntual en las zonas correspondientes a los rizos de membrana. Respecto a FGF21, el análisis de fluorescencia mostró un patrón similar a la condición basal, corroborando las observaciones previas. Por lo tanto, los datos presentados anteriormente sugieren que FGF21 en forma aguda no induce cambios en el remodelado de actina cortical en miotubos L6-GLUT4 myc .

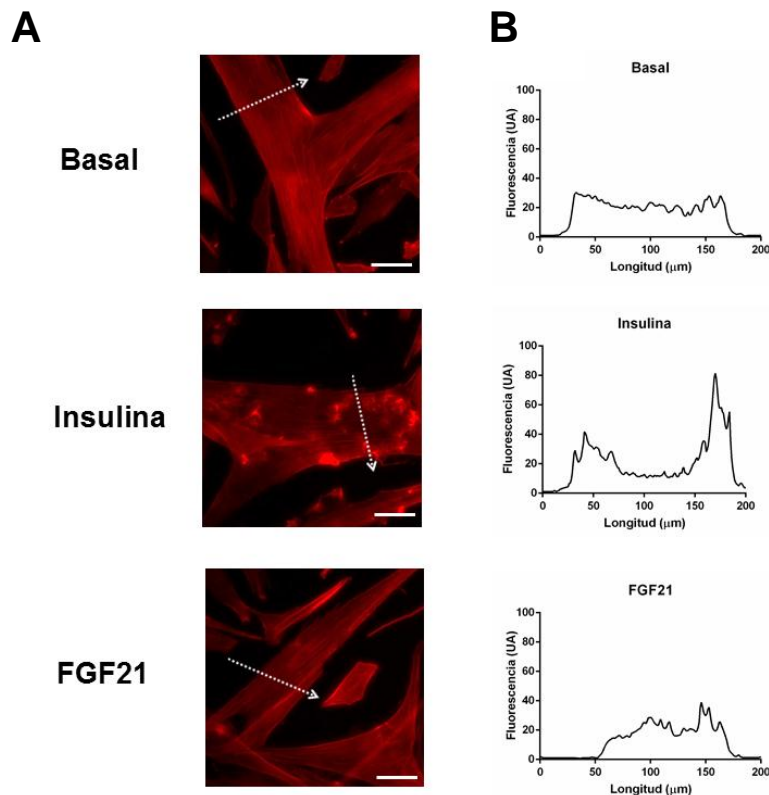


Figura 10. Análisis del perfil de fluorescencia de trazo transversal en miotubos L6-GLUT4 myc . (A) Imagen representativa de microscopía de epifluorescencia en miotubos L6-GLUT4 myc estimulados con insulina (100 nM) y/o FGF21 (100 ng/mL) durante 20 min. Posterior a la estimulación, las células se fijaron, permeabilizaron e

incubaron con las sondas fluorescente rodamina/faloidina para marcar el citoesqueleto de actina filamentosa (F-actina). Flecha con línea entrecortada representa la dirección del análisis sobre el miotubo. Escala imagen: 50 μm . **(B)** Fluorescencia correspondiente al trazado transversal sobre miotubos. Para el análisis de imágenes se utilizó Image J. Datos se expresan en unidades arbitrarias (UA).

6. Discusión.

Diversos reportes en la literatura (69,70), en conjunto con resultados sin publicar del Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo, sugieren que FGF21 juega un papel en la captación de glucosa en el músculo esquelético. A su vez, la línea celular de rata L6-GLUT4 myc es un modelo experimental ampliamente empleado para estudiar mecanismos de señalización y tráfico de GLUT4 asociados a la captación de glucosa dependiente e independiente de insulina en el músculo esquelético (42). Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto de investigación fue estudiar los efectos de un estímulo agudo de FGF21 sobre la translocación de GLUT4 en miotubos L6-GLUT4 myc y la posible participación de Akt y el remodelado de actina cortical en este proceso. En nuestros resultados se observó que existe expresión del mensajero de FGFR1 en miotubos L6-GLUT4 myc . Así mismo, la abundancia proteica de FGFR1 en miotubos L6-GLUT4 myc es relativamente menor en comparación a tejidos sensibles a FGF21, tales como fibras de músculo adulto de ratón (FDB) y tejido adiposo (**Figura 4A y 4B**). Estos datos coinciden con lo descrito en la literatura, observándose que FGF21 actúa directamente en aquellos tejidos con una mayor abundancia del receptor FGFR1, tales como el tejido adiposo (67). Del mismo modo, los efectos de FGF21 sobre el hígado, un tejido con un menor grado de abundancia de FGFR1, parecen ser indirectos y estar mediados por la liberación de otros agentes tales como el cortisol (71,72). A su vez, la

abundancia de FGFR1 encontrada en fibras de músculo esquelético de ratón adulto (FDB) explica en parte la capacidad de estas células para responder a estímulos agudos de FGF21 (**Figura 2**, datos sin publicar). En relación con la expresión de FGFR1 y KLB en la línea celular de miotubos L6, el estudio de Adams y colaboradores (71) evaluó la expresión relativa del ARN mensajero correspondiente a las 4 isoformas del receptor FGFR además de KLB a través de RT-qPCR. La expresión de FGFR1 en mioblastos L6 es relativamente similar a la presentada en la línea celular de hepatocitos Hep3B, la cual es capaz de responder a estímulos de FGF21 (71). Sin embargo, en comparación a la línea de adipocitos 3T3-L1, su nivel de expresión es relativamente más bajo. A su vez, en mioblastos L6 no se detectó la expresión de KLB, a diferencia de lo observado en las líneas Hep3B y 3T3-L1. Debido a esto, se constató que la línea celular de mioblastos L6 no fue capaz de responder a los estímulos de FGF21, situación que se evaluó a través de la activación de la vía ERK1/2, un nodo de señalización canónico río abajo del complejo FGFR/KLB (54). Tomando en consideración estos datos, los autores de dicho trabajo emplearon mioblastos L6 como un control negativo ante estímulos con FGF21. De hecho, al sobre-expresar el ARN mensajero correspondiente a KLB en las mioblastos L6, éstas presentaron activación de ERK1/2 en respuesta a FGF21 (71). En nuestro trabajo se observó que existe expresión del mensajero para KLB (**resultados no mostrados**), además de encontrar una abundancia proteica del cofactor en miotubos L6-GLUT4^{myc} (**Figura 4A y 4B**). Esta discordancia puede explicarse en que, mientras las células L6 empleadas por Adams y colaboradores (71) eran de tipo *wild type* y no se diferenciaron a miotubos, las células L6 utilizadas en nuestro estudio alcanzaron un estadio de diferenciación a miotubos y expresaban constitutivamente el epítipo *myc* en la proteína GLUT4. Por lo tanto, el nivel de diferenciación de la línea celular y la sobre expresión del epítipo *myc* podrían alterar la expresión y abundancia de FGFR1 y KLB, impidiendo una comparación eficaz entre

los mioblastos L6 empleados por Adams y colaboradores (67) y los miotubos L6-GLUT4 myc utilizados en nuestro trabajo. Una posible estrategia para estudios futuros en este modelo podría involucrar la sobre expresión del receptor FGFR1 en células L6-GLUT4 myc para lograr un rescate de la señalización.

En relación a los efectos de FGF21 sobre la translocación de GLUT4, no se observa un aumento significativo en los niveles de GLUT4 myc en la superficie de miotubos L6 (**Figura 5**). Si bien no existen reportes previos en la literatura que evalúen la translocación de GLUT4 en respuesta a estímulos agudos de FGF21 en el músculo esquelético, Lee y colaboradores (69) observaron que en presencia de un ARN interferente pequeño específico para GLUT4 se reduce significativamente el efecto de captación de 2-NBDG inducido por FGF21 en miotubos humanos. A diferencia nuestro trabajo, Lee y colaboradores emplearon concentraciones superiores a 100 ng/mL (200 ng/mL) durante 24 h de estímulo (69). A su vez, resultados preliminares de nuestro grupo muestran que en fibras de músculo de ratón, con concentraciones y tiempos de estimulación similares a las empleadas en el presente proyecto, existe un aumento en la exposición de GLUT4 myc (**resultados sin publicar, Anexos, Figura S2B**). Por lo tanto, el grado de abundancia de FGFR1 en miotubos L6-GLUT4 myc parece ser un factor limitante en la capacidad de responder a FGF21 en esta línea celular.

En relación a los efectos de FGF21 sobre la captación de glucosa se observó una tendencia a aumentar la captación de 2-NBDG en miotubos L6-GLUT4 myc (**Figura 6**), contrastando con lo observado por nuestro grupo en fibras de ratón adulto y en miotubos humanos (**resultados sin publicar, Anexos, Figura S1A y S2B**). Dado que FGF21 no generó un efecto significativo en la exposición de GLUT4 myc en superficie, una posible explicación para comprender este fenómeno puede radicar en un efecto sobre la actividad intrínseca de los

transportadores GLUT1 y GLUT4, tal como reporta Teixeira y colaboradores en relación al efecto de la hormona triiodotironina sobre miotubos L6-GLUT4 myc (80). En dicho trabajo se muestra que en respuesta a un estímulo agudo de 30 min con triiodotironina existe un aumento significativo en la captación de 2-NBDG en ausencia de un aumento en los niveles de GLUT4, GLUT3 o GLUT1 (80). A su vez, al igual que en nuestro trabajo, no se observa efecto de triiodotironina sobre la fosforilación de Akt en Ser473 (80). Si bien los autores no logran identificar el mecanismo involucrado en este fenómeno, proponen que el efecto de triiodotironina podría estar mediado por un cambio conformacional que altere la actividad del transportador (80). Respecto a FGF21, se ha observado que es capaz de aumentar la expresión del transportador GLUT1 en la línea celular de adipocitos 3T3-L1 (81), miotubos humanos (70) y en fibras de músculo esquelético adulto (82). Sin embargo, en todos los diseños experimentales FGF21 es administrado como un estímulo de al menos 2 h con la capacidad de alterar la expresión de genes. Dado que en nuestro trabajo se hallaron niveles proteicos bajos del receptor FGFR1, al mismo tiempo que se emplean tiempos de estimulación con FGF21 equivalentes a 20 min, no parece plausible que la tendencia observada respecto a la captación de 2-NBDG se deba a un efecto sobre la expresión génica de los transportadores GLUT1. Otro aspecto a considerar radica en aspectos metodológicos relacionados con la técnica de detección de GLUT4 myc . Mientras este método permite recopilar información de una población completa de miotubos, el análisis de la captación de 2-NBDG corresponde a miotubos independientes que presentan un comportamiento variable. Con el fin de despejar estas dudas, una posible aproximación corresponde a realizar nuevos experimentos en los cuales se utilicen inhibidores del transporte de glucosa, tales como citocalasina B e indinavir. Dado que citocalasina B es un inhibidor del transporte de glucosa a nivel de GLUT1 y GLUT4 (83), mientras que indinavir solo inhibe el transporte de glucosa vía GLUT4 (68), la

utilización de ambos componentes puede aportar a determinar si la tendencia de captación observada previamente es mediada por GLUT1 o por GLUT4. Para lograr una colección de datos que involucre a la totalidad de miotubos presentes en la placa de experimentación, sería conveniente realizar experimentos de pulso y caza utilizando el análogo radioactivo de glucosa ^3H -2DG.

Respecto a al papel de FGF21 en la activación de Akt, no se observó un efecto sobre la fosforilación de Akt en Ser473. Si bien la vía de señalización PI3K/Akt ha sido propuesta comúnmente como un nodo de señalización río abajo de la interacción FGFR/KLB (54), no existe evidencia que muestre que FGF21 aumente los niveles de p-Akt (Ser473). Si bien FGF21 no parece promover de forma directa la activación de Akt, reportes en adipocitos y miotubos (69,70,84) muestran un efecto indirecto aumentando la sensibilidad de estos tejidos a insulina. Dichos resultados difieren con los datos presentados en nuestro trabajo, donde se observa que la coincubación de miotubos L6-GLUT4 myc con insulina y FGF21 no genera un efecto adicional sobre la fosforilación de Akt en Ser473 en comparación con insulina. Esto se puede explicar debido a que la abundancia proteica de FGFR1 en miotubos L6-GLUT4 myc es baja, imposibilitando una posible respuesta a FGF21.

Finalmente, en relación al remodelado de actina cortical se observa que 100 nM insulina promovió la formación de rizos de membrana, tal como ha sido descrito previamente (28). Contrariamente, 100 ng/mL FGF21 no indujo cambios estadísticamente significativos sobre el remodelado de actina cortical en miotubos L6-GLUT4 myc . Si bien este fenómeno no ha sido estudiado hasta la fecha, existen reportes en los cuales se muestra un efecto de otros factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) sobre la migración celular de fibroblastos, proceso que involucra al citoesqueleto de actina, JNK y Akt (85). Sin embargo, dado que la abundancia

proteica de FGFR1 en miotubos L6-GLUT4 myc es baja y que FGF21 no induce fosforilación de Akt en Ser473, es probable que FGF21 sea incapaz de activar a otras proteínas localizadas río arriba en la vía de la señalización de Akt, tal como PI3K. Dado PI3K juega un papel en la activación de Rac1, GTPasa monomérica fundamental en el remodelado de actina cortical y translocación de GLUT4 (19), es esperable no encontrar rizados de membrana en respuesta a un estímulo agudo de FGF21 en miotubos L6-GLUT4 myc . Esto concuerda con los resultados obtenidos en relación a los niveles de GLUT4 myc en respuesta a FGF21, donde no se encuentran cambios significativos.

Nuestro trabajo es el primer estudio que indaga acerca del papel de FGF21 sobre la translocación de GLUT4 en la línea celular L6-GLUT4 myc diferenciadas a miotubos. Si bien la línea celular de miotubos L6-GLUT4 myc parece no responder a estímulos con FGF21, otros modelos de estudio de músculo esquelético, tales como fibras de músculo adulto en ratón y miotubos humanos si responden al factor aumentando la captación de glucosa. Considerando los efectos de FGF21 sobre la captación de glucosa en el músculo esquelético, nuevos estudios deben ser realizados con el fin de determinar los mecanismos moleculares involucrados en esta respuesta, así como también el potencial terapéutico del factor en el contexto de patologías metabólicas inducidas por la malnutrición y el sedentarismo, como la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2.



7. Conclusión

Un estímulo agudo de FGF21 no induce aumentos estadísticamente significativos en la exposición del transportador GLUT4 en la superficie celular, captación de glucosa, fosforilación de Akt en Ser473 ni remodelado del citoesqueleto de actina cortical en miotubos L6-GLUT4*myc*. Así mismo, la expresión del receptor tipo 1 de FGF21 (FGFR1) en la línea celular empleada es relativamente baja en comparación a otros tejidos sensibles a FGF21. **En razón a los presentes resultados, se rechaza la hipótesis planteada inicialmente. En conclusión, la línea celular de miotubos L6-GLUT4*myc* no parece ser un modelo apropiado con el objetivo de investigar los efectos agudos de FGF21 sobre la captación de glucosa en el músculo esquelético.**



Referencias

1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2015 Mar [cited 2016 Aug 28];96(3):183–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25294644>
2. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2009 Nov [cited 2014 Sep 16];32 Suppl 2:S157-63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2811436&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Gaster M, Handberg A, Beck-Nielsen H, Schroder HD. Glucose transporter expression in human skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2000 Sep [cited 2016 Aug 27];279(3):E529-38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950819>
4. Jones JP, Tapscott EB, Olson AL, Pessin JE, Dohm GL. Regulation of glucose transporters GLUT-4 and GLUT-1 gene transcription in denervated skeletal muscle. *J Appl Physiol* [Internet]. 1998 May [cited 2016 Aug 27];84(5):1661–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572814>
5. Guillet-Deniau I, Leturque A, Girard J. Expression and cellular localization of glucose transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT4) during differentiation of myogenic cells isolated from rat fetuses. *J Cell Sci* [Internet]. 1994 Mar [cited 2016 Aug 27];487–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006068>
6. Richter EA, Hargreaves M, Abbott M, Bogachus L, Turcotte L, Abbott M, et al. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev* [Internet]. American Physiological Society; 2013 Jul [cited 2016 Aug 24];93(3):993–1017. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899560>
7. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 May 23 [cited 2016 Jul 27];13(6):383–96. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3351>
8. Hou JC, Pessin JE. Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. NIH Public Access; 2007 Aug [cited 2016 Aug 28];19(4):466–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644329>
9. Rorsman P. Review: Insulin secretion: function and therapy of pancreatic beta-cells in diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis*. SAGE Publications; 2005;5(4):187–91.
10. Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol* [Internet]. American Physiological Society; 1994 Feb [cited 2016 Aug 31];266(2 Pt 1):C319-34. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141246>
11. Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* [Internet]. 2004 Feb [cited 2016 Aug 31];47(2):170–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722654>
 12. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2006;7(2):85–96. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrm1837>
 13. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005;87(1):99–109.
 14. Gao Y, Moten A, Lin H-K. Akt: a new activation mechanism. *Cell Res* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 Jul 6 [cited 2016 Sep 2];24(7):785–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cr.2014.57>
 15. Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2008;295(1).
 16. Middelbeek RJW, Chambers MA, Tantiwong P, Treebak JT, An D, Hirshman MF, et al. Insulin stimulation regulates AS160 and TBC1D1 phosphorylation sites in human skeletal muscle. *Nutr Diabetes* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Jun [cited 2016 Sep 2];3(6):e74. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nutd.2013.13>
 17. Dugani CB, Klip A. Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. *EMBO Rep* [Internet]. European Molecular Biology Organization; 2005 Dec [cited 2016 Aug 30];6(12):1137–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319959>
 18. Chen X-W, Leto D, Xiong T, Yu G, Cheng A, Decker S, et al. A Ral GAP complex links PI 3-kinase/Akt signaling to RalA activation in insulin action. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2016 Aug 31];22(1):141–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148297>
 19. JeBailey L, Rudich A, Huang X, Di Ciano-Oliveira C, Kapus A, Klip A. Skeletal muscle cells and adipocytes differ in their reliance on TC10 and Rac for insulin-induced actin remodeling. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2004 Feb [cited 2016 Aug 31];18(2):359–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615606>
 20. Chiu TT, Jensen TE, Sylow L, Richter EA, Klip A. Rac1 signalling towards GLUT4/glucose uptake in skeletal muscle. *Cell Signal* [Internet]. 2011 Oct [cited 2016 Aug 31];23(10):1546–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683139>
 21. Patel N, Huang C, Klip A. Cellular location of insulin-triggered signals and implications for glucose



- uptake. *Pflügers Arch Eur J Physiol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2016 Aug 31];451(4):499–510. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284741>
22. Stöckli J, Fazakerley DJ, James DE, Abel ED, Peroni O, Kim JK, et al. GLUT4 exocytosis. *J Cell Sci* [Internet]. The Company of Biologists Ltd; 2011 Dec 15 [cited 2016 Aug 31];124(Pt 24):4147–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247191>
 23. Huang C, Somwar R, Patel N, Niu W, Török D, Klip A. Sustained exposure of L6 myotubes to high glucose and insulin decreases insulin-stimulated GLUT4 translocation but upregulates GLUT4 activity. *Diabetes* [Internet]. American Diabetes Association; 2002 Jul [cited 2016 Aug 25];51(7):2090–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086937>
 24. Huang C, Thirone ACP, Huang X, Klip A. Differential Contribution of Insulin Receptor Substrates 1 Versus 2 to Insulin Signaling and Glucose Uptake in L6 Myotubes. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2005 May 13 [cited 2016 Aug 25];280(19):19426–35. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M412317200>
 25. Isakoff SJ, Taha C, Rose E, Marcusohn J, Klip A, Skolnik EY. The inability of phosphatidylinositol 3-kinase activation to stimulate GLUT4 translocation indicates additional signaling pathways are required for insulin-stimulated glucose uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 1995 Oct 24 [cited 2016 Aug 25];92(22):10247–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479761>
 26. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, et al. Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts. *Mol Cell Biol* [Internet]. American Society for Microbiology; 1999 Jun 1 [cited 2016 Aug 25];19(6):4008–18. Available from: <http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.19.6.4008>
 27. Kramer HF, Witczak CA, Fujii N, Jessen N, Taylor EB, Arnolds DE, et al. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. *Diabetes* [Internet]. American Diabetes Association; 2006 Jul [cited 2016 Aug 27];55(7):2067–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16804077>
 28. Tong P, Khayat ZA, Huang C, Patel N, Ueyama A, Klip A. Insulin-induced cortical actin remodeling promotes GLUT4 insertion at muscle cell membrane ruffles. *J Clin Invest* [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2001 Aug [cited 2016 Aug 29];108(3):371–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489930>
 29. Karlsson HKR, Chibalin A V, Koistinen HA, Yang J, Koumanov F, Wallberg-Henriksson H, et al. Kinetics of GLUT4 trafficking in rat and human skeletal muscle. *Diabetes* [Internet]. American Diabetes Association; 2009 Apr [cited 2016 Aug 27];58(4):847–54. Available from:



- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19188436>
30. Fazakerley DJ, Holman GD, Marley A, James DE, Stöckli J, Coster ACF. Kinetic evidence for unique regulation of GLUT4 trafficking by insulin and AMP-activated protein kinase activators in L6 myotubes. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2010 Jan 15 [cited 2016 Aug 29];285(3):1653–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915010>
 31. Espinosa A, Garcia A, Hartel S, Hidalgo C, Jaimovich E. NADPH Oxidase and Hydrogen Peroxide Mediate Insulin-induced Calcium Increase in Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2009 Jan 23 [cited 2016 Nov 27];284(4):2568–75. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M804249200>
 32. Contreras-Ferrat A, Lavandero S, Jaimovich E, Klip A. Calcium signaling in insulin action on striated muscle. *Cell Calcium*. 2014;56(5):390–6.
 33. Contreras-Ferrat A, Llanos P, Vásquez C, Espinosa A, Osorio-Fuentealba C, Arias-Calderon M, et al. Insulin elicits a ROS-activated and an IP₃ -dependent Ca²⁺ release, which both impinge on GLUT4 translocation. *J Cell Sci* [Internet]. The Company of Biologists Ltd; 2014 May 1 [cited 2016 Jul 12];127(Pt 9):1911–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569874>
 34. Hidalgo C, Sánchez G, Barrientos G, Aracena-Parks P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Sep 8 [cited 2016 Feb 6];281(36):26473–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16762927>
 35. Mul JD, Stanford KI, Hirshman MF, Goodyear LJ. Exercise and Regulation of Carbohydrate Metabolism [Internet]. 1st ed. Vol. 135, Molecular and Cellular Regulation of Adaptation to Exercise. Elsevier Inc.; 2015. 17-37 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.020>
 36. Richter E a, Hargreaves M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev* [Internet]. 2013 Jul [cited 2014 Jul 11];93(3):993–1017. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899560>
 37. Thong FSL, Bilan PJ, Klip A. The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes* [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 Aug 27];56(2):414–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259386>
 38. Sylow L, Kleinert M, Richter EA, Jensen TE. Exercise-stimulated glucose uptake — regulation and implications for glycaemic control. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2016.162>
 39. Bilan PJ, Mitsumoto Y, Maher F, Simpson IA, Klip A. Detection of the GLUT3 facilitative glucose



- transporter in rat L6 muscle cells: regulation by cellular differentiation, insulin and insulin-like growth factor-I. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1992 Jul 31 [cited 2016 Sep 2];186(2):1129–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1497646>
40. Mitsumoto Y, Klip A. Development regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1992 Mar 5 [cited 2016 Sep 2];267(7):4957–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1311324>
41. Wilson CM, Mitsumoto Y, Maher F, Klip A. Regulation of cell surface GLUT1, GLUT3, and GLUT4 by insulin and IGF-I in L6 myotubes. *FEBS Lett* [Internet]. 1995 Jul 10 [cited 2016 Sep 2];368(1):19–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2895%2900589-2>
42. Wang Q, Khayat Z, Kishi K, Ebina Y, Klip A. GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay. *FEBS Lett* [Internet]. 1998 May 8 [cited 2016 Sep 1];427(2):193–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9607310>
43. Chau MDL, Gao J, Yang Q, Wu Z, Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1alpha pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 2010 Jul 13 [cited 2016 Aug 11];107(28):12553–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616029>
44. Li Q, Zhu X, Ishikura S, Zhang D, Gao J, Sun Y, et al. Ca²⁺ signals promote GLUT4 exocytosis and reduce its endocytosis in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2014 Jul 15 [cited 2016 Aug 27];307(2):E209-24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24895284>
45. Wijesekara N, Tung A, Thong F, Klip A. Muscle cell depolarization induces a gain in surface GLUT4 via reduced endocytosis independently of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2006 Jun [cited 2016 Aug 27];290(6):E1276-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418206>
46. Osorio-Fuentealba C, Altamirano F, Espinosa A, Jaimovich E. ATP release induced by electrical stimulation increases glucose uptake via AKT in skeletal muscle. *FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology*; 2011;25(1 Supplement):914.7-914.7.
47. Osorio-Fuentealba C, Contreras-Ferrat AE, Altamirano F, Espinosa A, Li Q, Niu W, et al. Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3Kγ-Akt-AS160 in skeletal muscle cells. *Diabetes* [Internet]. American Diabetes Association; 2013 May [cited 2016 Aug 24];62(5):1519–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23274898>
48. Eckardt K, Görgens SW, Raschke S, Eckel J. Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2014;57(6):1087–99.



49. Itoh N. FGF21 as a Hepatokine, Adipokine, and Myokine in Metabolism and Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. Frontiers; 2014 Jul 7 [cited 2016 Aug 4];5:107. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2014.00107/abstract>
50. Kim KH, Lee M-S. FGF21 as a Stress Hormone: The Roles of FGF21 in Stress Adaptation and the Treatment of Metabolic Diseases. *Diabetes Metab J* [Internet]. 2014 [cited 2016 Aug 5];38(4):245. Available from: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4093/dmj.2014.38.4.245>
51. Cuevas-Ramos D, Almeda-Valdés P, Meza-Arana CE, Brito-Córdova G, Gómez-Pérez FJ, Mehta R, et al. Exercise increases serum fibroblast growth factor 21 (FGF21) levels. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2012 [cited 2016 Aug 8];7(5):e38022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701542>
52. Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the Physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2016;78(1):annurev-physiol-021115-105339. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-021115-105339>
53. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2015 [cited 2016 Aug 5];4(3):215–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772309>
54. Donate-Correa J, Martín-Núñez E, Delgado NP, de Fuentes MM, Arduan AO, Mora-Fernández C, et al. Implications of Fibroblast growth factor/Klotho system in glucose metabolism and diabetes. *Cytokine Growth Factor Rev*. Elsevier Ltd; 2016;28:71–7.
55. Li X, Wang C, Xiao J, McKeehan WL, Wang F. Fibroblast growth factors, old kids on the new block. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;53:155–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.12.014>
56. Owen BM, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. NIH Public Access; 2015 Jan [cited 2016 Aug 5];26(1):22–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25476453>
57. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova A V, et al. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* [Internet]. NIH Public Access; 2007 Sep 14 [cited 2016 Aug 29];282(37):26687–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17623664>
58. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* [Internet]. 2007 Jun [cited 2016 Aug 29];5(6):426–37. Available from:



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550778>

59. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* [Internet]. 2007 Jun [cited 2016 Aug 29];5(6):415–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550777>
60. Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, Ding X, He T, Goetz R, et al. FGF21 induces PGC-1 and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. National Academy of Sciences; 2009 Jun 30 [cited 2016 Aug 10];106(26):10853–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0904187106>
61. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* [Internet]. 2008 Dec [cited 2016 Aug 29];149(12):6018–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687777>
62. Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 Aug 29];58(1):250–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840786>
63. Liang Q, Zhong L, Zhang J, Wang Y, Bornstein SR, Triggle CR, et al. FGF21 Maintains Glucose Homeostasis by Mediating the Cross Talk Between Liver and Brain During Prolonged Fasting. *Diabetes*. 2014;63(12).
64. Patel R, Bookout AL, Magomedova L, Owen BM, Consiglio GP, Shimizu M, et al. Glucocorticoids regulate the metabolic hormone FGF21 in a feed-forward loop. *Mol Endocrinol* [Internet]. The Endocrine Society; 2015 Feb [cited 2016 Dec 12];29(2):213–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25495872>
65. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2005 Jun [cited 2016 Aug 29];115(6):1627–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15902306>
66. Fisher FM, Kleiner S, Douris N, Fox EC, Mepani RJ, Verdeguer F, et al. FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev* [Internet]. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012 Feb 1 [cited 2016 Aug 11];26(3):271–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302939>
67. Vandanmagsar B, Warfel JD, Wicks SE, Ghosh S, Salbaum JM, Burk D, et al. Impaired Mitochondrial Fat Oxidation Induces FGF21 in Muscle. *Cell Rep* [Internet]. NIH Public Access; 2016 May 24 [cited

2016 Aug 4];15(8):1686–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184848>

68. Hresko RC, Hruz PW. HIV Protease Inhibitors Act as Competitive Inhibitors of the Cytoplasmic Glucose Binding Site of GLUTs with Differing Affinities for GLUT1 and GLUT4. Badley AD, editor. PLoS One [Internet]. 2011 Sep 23 [cited 2016 Nov 22];6(9):e25237. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0025237>
69. Lee MS, Choi S-E, Ha ES, An S-Y, Kim TH, Han SJ, et al. Fibroblast growth factor-21 protects human skeletal muscle myotubes from palmitate-induced insulin resistance by inhibiting stress kinase and NF- κ B. *Metabolism*. 2012;61(8):1142–51.
70. Mashili FL, Austin RL, Deshmukh AS, Fritz T, Caidahl K, Bergdahl K, et al. Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Metab Res Rev* [Internet]. 2011 Mar [cited 2016 Jan 26];27(3):286–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21309058>
71. Adams AC, Coskun T, Rovira ARI, Schneider MA, Raches DW, Micanovic R, et al. Fundamentals of FGF19 & FGF21 action in vitro and in vivo. PLoS One [Internet]. Public Library of Science; 2012 [cited 2016 Dec 12];7(5):e38438. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675463>
72. Suzuki M, Uehara Y, Motomura-Matsuzaka K, Oki J, Koyama Y, Kimura M, et al. β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor (FGF) 21 Signaling through FGF Receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol Endocrinol* [Internet]. Endocrine Society ; 2008 Apr [cited 2016 Dec 12];22(4):1006–14. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/me.2007-0313>
73. Smith R, Duguay A, Bakker A, Li P, Weiszmann J, Thomas MR, et al. FGF21 can be mimicked in vitro and in vivo by a novel anti-FGFR1c/ β -Klotho bispecific protein. PLoS One [Internet]. Public Library of Science; 2013 [cited 2016 Dec 14];8(4):e61432. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23630589>
74. Degirolamo C, Sabbà C, Moschetta A. Therapeutic potential of the endocrine fibroblast growth factors FGF19, FGF21 and FGF23. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;15(1):51–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2015.9>
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd.2015.9>
75. Waterborg JH. The Lowry Method for Protein Quantitation. *Protein Protoc Handbook*, [Internet]. 2000;7–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-169-8:7>
76. Benomar Y, Amine H, Crépin D, Al Rifai S, Riffault L, Gertler A, et al. Central Resistin/TLR4 Impairs Adiponectin Signaling, Contributing to Insulin and FGF21 Resistance. *Diabetes* [Internet]. 2016 Apr



[cited 2017 Jan 5];65(4):913–26. Available from:
<http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/db15-1029>

77. Zou C, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods* [Internet]. 2005 Sep 30 [cited 2017 Sep 11];64(3):207–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182371>
78. McCarthy AM, Spisak KO, Brozinick JT, Elmendorf JS. Loss of cortical actin filaments in insulin-resistant skeletal muscle cells impairs GLUT4 vesicle trafficking and glucose transport. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2016 Aug 22];291(5):C860-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16774991>
79. Brozinick JT, Hawkins ED, Strawbridge AB, Elmendorf JS, Elmendorf JS. Disruption of cortical actin in skeletal muscle demonstrates an essential role of the cytoskeleton in glucose transporter 4 translocation in insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* [Internet]. NIH Public Access; 2004 Sep 24 [cited 2017 Mar 8];279(39):40699–706. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247264>
80. Teixeira SS, Tamrakar AK, Goulart-Silva F, Serrano-Nascimento C, Klip A, Nunes MT. Triiodothyronine acutely stimulates glucose transport into L6 muscle cells without increasing surface GLUT4, GLUT1, or GLUT3. *Thyroid* [Internet]. Mary Ann Liebert, Inc.; 2012 Jul [cited 2017 Oct 24];22(7):747–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22663547>
81. Ge X, Chen C, Hui X, Wang Y, Lam KSL, Xu A. Fibroblast growth factor 21 induces glucose transporter-1 expression through activation of the serum response factor/Ets-like protein-1 in adipocytes. *J Biol Chem* [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2011 Oct 7 [cited 2017 Oct 20];286(40):34533–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846717>
82. Vandanmagsar B, Warfel JD, Wicks SE, Ghosh S, Salbaum JM, Burk D, et al. Impaired Mitochondrial Fat Oxidation Induces FGF21 in Muscle. *Cell Rep* [Internet]. NIH Public Access; 2016 May 24 [cited 2016 Aug 11];15(8):1686–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27184848>
83. Malaisse WJ, Giroix M-H, Sener A. Effect of cytochalasin b on glucose uptake, utilization, oxidation and insulinotropic action in tumoral insulin-producing cells. *Cell Biochem Funct* [Internet]. 1987 Jul [cited 2017 Oct 24];5(3):183–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3038362>
84. Mottillo EP, Desjardins EM, Fritzen AM, Zou VZ, Crane JD, Yabut JM, et al. FGF21 does not require adipocyte AMP-activated protein kinase (AMPK) or the phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase (ACC) to mediate improvements in whole-body glucose homeostasis. *Mol Metab* [Internet]. 2017 Apr [cited 2017 Oct 24];6(6):471–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28580278>
85. Wang X, Zhu Y, Sun C, Wang T, Shen Y, Cai W, et al. Feedback Activation of Basic Fibroblast Growth



Factor Signaling via the Wnt/ β -Catenin Pathway in Skin Fibroblasts. *Front Pharmacol* [Internet].
Frontiers Media SA; 2017 [cited 2017 Oct 20];8:32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28217097>

ANEXOS

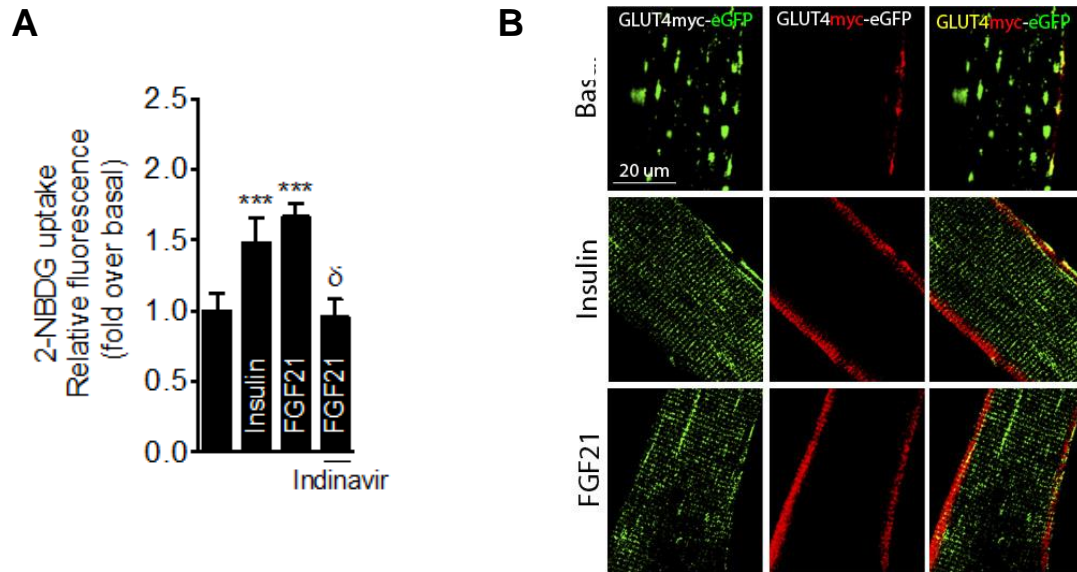


Figura S1. FGF21 aumenta la captación de 2-NBDG a través de un mecanismo dependiente de la translocación de GLUT4 en fibras de músculo esquelético adulto (FDB). (A) Cuantificación de la fluorescencia emitida por 2-NBDG en fibras estimuladas. Fibras de músculo esquelético adulto (FDB) fueron aisladas desde ratones C57/BL6 estimuladas e incubadas con el análogo a glucosa fluorescente 2-NBDG (300 μM) durante 15 min. Posteriormente, para determinar el papel de GLUT4 en la captación de 2-NBDG inducida por FGF21, las fibras aisladas fueron incubadas con FGF21 (100 ng/mL), Insulina (100 nM) y/o con Indinavir (100 μM) durante 20 min. Se observa que fibras aumentan su captación de 2-NBDG en respuesta a estímulos de FGF21. A su vez, esta captación se revierte hasta la condición basal en respuesta a indinavir, sugiriendo que captación de 2-NBDG es mediada por GLUT4. Se analizaron los resultados obtenidos de 3 experimentos diferentes utilizando ANOVA de una vía, con *post test* de Bonferroni (***) $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; resultados se muestran como promedio \pm error estándar) * diferencias respecto al control. (B) Imagen representativa de microscopía confocal de la exposición de GLUT4myc en fibras de musculo esquelético adulto de ratón (FDB). Animales fueron electroporados y posteriormente transfectados con un plasmidio para GLUT4myc (rojo) acoplado a una proteína fluorescente verde (eGFP). Luego de extraer el músculo FBD del animal, las fibras aisladas fueron incubadas con FGF21 (100 ng/mL) o Insulina (100 nM) durante 20 min. Tanto en respuesta a Insulina como a FGF21 se observa translocación de GLUT4myc-eGPF. Rosales y cols. (2017, Directores de Tesis: Drs. Ariel Contreras y Enrique Jaimovich). **Resultados sin publicar.**

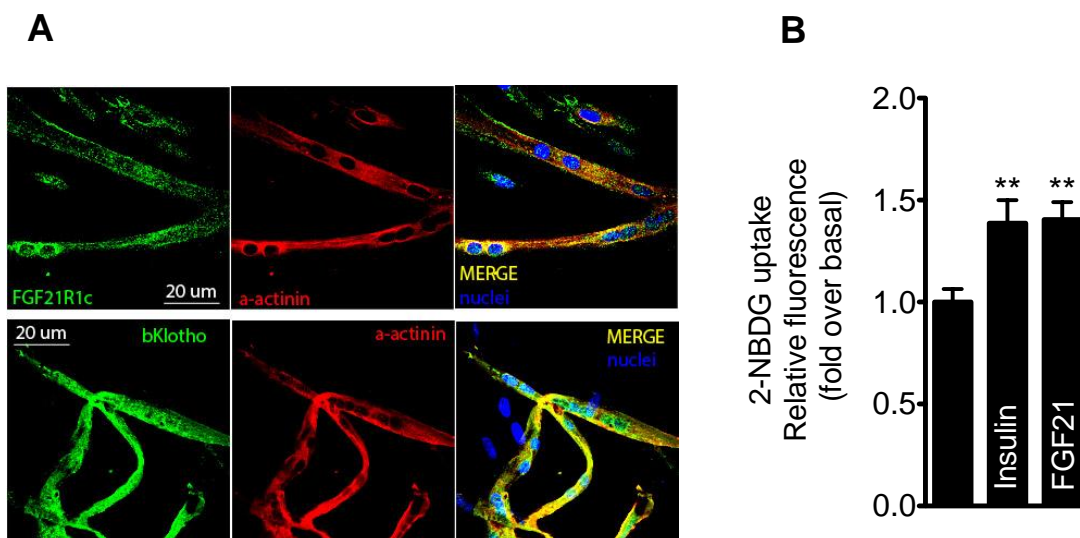


Figura S2. Miotubos humanos expresan FGFR1-KLB y aumentan la captación de 2-NBDG en respuesta a FGF21. (A) Imagen representativa de microscopía confocal mostrando la localización de FGFR1 (verde, superior), KLB (verde, inferior), alfa actinina (rojo) y nucleo (azul) en miotubos humanos. (B) Cuantificación de la fluorescencia emitida por 2-NBDG en miotubos incubados con Insulina (100 nM) o FGF21 (100 ng/mL) durante 20 min. Se analizaron los resultados obtenidos de 3 experimentos diferentes utilizando ANOVA de una vía, con *post test* de Bonferroni (***) $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; resultados se muestran como promedio \pm error estándar * diferencias respecto al control. Contreras-Ferrat (2017). Resultados sin publicar.