



UNIVERSIDAD DE CHILE
Doctorado en Nutrición y Alimentos
Programa Interfacultades

UNIVERSIDAD DE CHILE
Doctorado en Nutrición y Alimentos

**EFFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS-21 SOBRE LA
CAPTACIÓN DE GLUCOSA EN FIBRAS AISLADAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO**

**Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Doctor en
Nutrición y Alimentos**

Programa Interfacultades

Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias e Instituto de
Nutrición y Tecnología de Alimentos

GIOVANNI PATRICIO ROSALES SOTO
AGOSTO, 2022

Director de Tesis: Dr. Enrique Jaimovich
Santiago, 2022

*A mi abuela Irma, quien fue mi fuente
de motivación y apoyo constante.*

*Y muy especialmente a Paulina, Antonia y Trinidad,
por su incondicionalidad y amor.*

AGRADECIMIENTOS

En esta etapa especial de mi proceso académico, quisiera agradecer a mi tutor el Dr. Enrique Jaimovich, quien me permitió la oportunidad de poder desarrollar mi trabajo en el laboratorio de Fisiología Celular del Músculo, donde pude aprender mucho y relacionarme con un entorno que me ha ofrecido experiencias muy gratificantes durante todo este proceso.

A mi amigos con quienes compartí inquietudes, momentos de alegrías, pero también frustraciones; aquellas que te hacen reflexionar y te enseñan a valorar las distintas etapas que hacen parte de este proceso. Muy especialmente a Alexis, quien ha sido un verdadero mentor; a Cristian, Manuel, Gerardo, Mónica, Roberto y Cristóbal con quienes compartí cada día en el laboratorio. Además, destacar a los Dres. Paola, Denisse, Gonzalo y Matías quienes me aportaron con su invaluable retroalimentación y su amistad. No puedo dejar de mencionar a Ernesto, quien tuvo un papel fundamental durante esta última etapa; a Patricio Arroyo, quien me dio la flexibilidad de poder compatibilizar mi trabajo con el desarrollo de esta tesis y por supuesto a Ceci, quien estuvo a cargo de las gestiones y resguardaba el cumplimiento de los plazos del programa.

Y por supuesto a mi familia, que siempre me ha apoyado de manera incondicional, sobre todo quisiera destacar a Paulina quien ha sido mi pilar fundamental en la vida; como también Antonia y Trinidad quienes me motivan a superarme cada día.

Giovanni Patricio Rosales Soto

“Más que un cuerpo de conocimientos, la ciencia es una forma de pensar” - Carl Sagan

ÍNDICE GENERAL

Lista de símbolos, abreviaturas o nomenclatura	7
Resumen	10
Abstract	12
Introducción	13
<i>Regulación del transporte de glucosa mediado por insulina</i>	13
<i>Músculo esquelético y captación de glucosa</i>	16
<i>Factor de crecimiento de fibroblastos-21</i>	18
<i>Resistencia a la insulina en músculo esquelético</i>	21
<i>FGF21 y su relación con la captación de glucosa</i>	23
Objetivos.....	27
<i>Objetivo general</i>	27
<i>Objetivos específicos</i>	27
Materiales y métodos	28
<i>Animales</i>	28
<i>Cultivo de fibras aisladas de músculo FDB</i>	28
<i>Ensayo de captación de glucosa en fibra aislada con sonda fluorescente 2-NBDG</i>	28
<i>Captación de ³H-2DG</i>	29
<i>Ensayo de detección de GLUT4 en la superficie celular</i>	30
<i>Inmunodetección de proteínas mediante técnica de Western blot</i>	32
<i>Test de tolerancia a la glucosa e insulinemia</i>	32
<i>Análisis estadístico</i>	33
Resultados.....	34
<i>FGFR1 y KLB se encuentran presentes en fibras aisladas de músculo esquelético de ratón</i>	34
<i>FGF21 aumenta la captación de glucosa en fibras aisladas de músculo adulto</i>	35
<i>FGF21 promueve la translocación de GLUT4myc-eGFP hacia la superficie celular</i>	38

<i>Baja concentración de FGF21, potencia el efecto de insulina cuando están presentes de manera simultánea.....</i>	<i>41</i>
<i>La actividad de PI3K es requerida para aumentar la captación de 2-NBDG inducida por FGF21.....</i>	<i>43</i>
<i>FGF21 ejerce sus efectos de manera independiente de la fosforilación de AMPKα^{thr172}.....</i>	<i>45</i>
<i>El efecto de FGF21 sobre el transporte de 2-NBDG es independiente de la fosforilación del INSR y de quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2).....</i>	<i>46</i>
<i>PKC-ζ está involucrada en el efecto de FGF21 sobre la captación de 2-NBDG.....</i>	<i>47</i>
<i>Ratones alimentados con HFD durante ocho semanas presentan resistencia a la insulina.....</i>	<i>50</i>
<i>FGF21 aumenta la captación de 2-NBDG en fibras aisladas provenientes de animales alimentados con HFD.....</i>	<i>52</i>
Discusión	55
Conclusión.....	63
Bibliografía.....	64
Anexo 1: Premios, congresos y publicaciones	85
Presentaciones en congresos nacionales	85
Publicaciones generadas durante esta tesis:	86
Anexo 2: Financiamiento	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. La señalización de insulina regula la exocitosis de GLUT4:	15
Figura 2. Distribución subcelular de FGFR1 y KLB en fibras aisladas del músculo esquelético.	35
Figura 3. FGF21 promueve la captación de 2-NBDG en fibras aisladas de músculo esquelético adulto.....	36
Figura 4. La captación de glucosa dependiente de FGF21 está mediada por la actividad GLUT4.	38
Figura 5. FGF21 promueve la translocación de GLUT4 a la superficie celular.....	40
Figura 6. La captación de 2-NBDG se potencia a concentraciones bajas de FGF21 en presencia de insulina.....	42
Figura 7. La captación de glucosa dependiente de FGF21 implica la actividad de pi3k, pero no de akt.....	44
Fig. 8. La captación de glucosa inducida por FGF21 es independiente de la fosforilación de AMPK α	46
Figura 9. Los efectos de FGF21 sobre la captación de glucosa son independientes de la fosforilación de INSR y ERK1/2.....	47
Figura 10. La captación de 2-NBDG inducida por FGF21 requiere de PKC- ζ	49
Figura 11. Alteraciones en el peso corporal y estado metabólico en ratones alimentados con HFD.	51
Figura 12. FGF21 promueve la captación de glucosa en fibras aisladas proveniente de animales alimentados con dieta HFD, sin presentar diferencias respecto a los niveles de FGFR1 y KLB.	53
Figura 13. Modelo propuesto.....	62

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

2-NBDG	: 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose
3T3-L1	: líneas celulares de preadipocitos
ADNc	: ADN complementario
ADP	: adenosín difosfato
AGNE	: ácidos grasos no esterificados
AMPK	: proteína quinasa dependiente de AMP
aPKCs	: proteínas quinasas C atípicas
AS160	: proteína sustrato de Akt de 160 kDa
BIM I	: bisindolilmaleimida I
BSA	: albúmina de suero bovino
C57BL/6J	: cepa endogámica de ratón de laboratorio
COPII	: complejo proteico de la capa II
DMEM	: medio Dulbecco modificado de Eagle
DMT2	: diabetes mellitus tipo 2
EDL	: músculo extensor largo de los dedos
eGFP	: proteína fluorescente verde mejorada
EGTA	: ácido etilén glicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERK1/2	: quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2
FDB	: músculo <i>flexor digitorum brevis</i>
FGF21	: factor de crecimiento de fibroblastos-21
FGFs	: factores de crecimiento de fibroblastos
FGFR	: receptor de factor de crecimiento fibroblástico
FRS2	: sustrato 2 de receptor para FGF
GLUT1	: transportador de glucosa tipo 1
GLUT4	: transportador de glucosa tipo 4

GSV	: vesículas que contienen GLUT4
H4IIE	: células de hepatoma
HEPES	: ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HFD	: dieta alta en grasas
HOMA-IR	: modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
HRP	: peroxidasa de rabanito
HS	: suero de caballo
IGF-1	: factor de crecimiento insulínico de tipo 1
IMC	: índice de masa corporal
INSR	: receptor de insulina
IRS	: sustrato del receptor de insulina
kDa	: kilodalton
KLB	: β -Klotho
MAPK	: proteína quinasas activadas por mitógenos
mTORC2	: complejo 2 diana de rapamicina de mamíferos
MyHC	: cadena pesada de miosina
NCD	: dieta normal <i>chow</i>
<i>ob/ob</i>	: ratón transgénico deficiente de leptina
PBS	: solución salina tamponada con fosfato
PDK1	: quinasa dependiente de fosfoinositidos-1
PDVF	: membrana de difluoruro de polivinilideno
Pi	: fosfato inorgánico
PI3K	: fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP2	: fosfatidilinositol 3,4-bifosfato
PIP3	: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB	: proteína quinasa B / Akt
PKCs	: proteínas quinasas C
PKC λ	: proteína quinasa C lambda
PKC ζ	: proteína quinasa C zeta
pPKC- ζ	: pseudosustrato PKC- ζ

Rab-GAP : proteína activadora de GTPasa
RE : retículo endoplasmático
RI : resistencia a la insulina
RIPA : solución tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación
SDS-PAGE : electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SIRT1 : sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD
TAB : tejido adiposo blanco
TAP : tejido adiposo pardo
TBS-T : solución salina tamponada con Tris y *Tween 20* (0.1%)
TMB : 3,3',5,5'-tetrametilbencidina
Túbulo-T : túbulo transversal
YIPF6 : familia del dominio Yip1, miembro 6

RESUMEN

La concentración de glucosa se encuentra relativamente constante a nivel plasmático. La insulina contribuye a la captación de glucosa en el músculo esquelético, el cual representa el principal sitio de acción de la insulina. La captación de glucosa ocurre principalmente de manera dependiente de transportadores de glucosa (GLUT4) los que pueden translocar desde depósitos intracelulares para posteriormente fusionarse a la membrana plasmática y de esta manera facilitar el ingreso de glucosa a la célula.

En condiciones de resistencia a la insulina la acción tisular en el músculo esquelético de esta hormona, se ve reducida para permitir incorporación de glucosa desde el torrente sanguíneo; sin embargo, se han descrito moléculas que pueden ser secretadas desde el músculo esquelético y que pueden tener un papel en la captación de glucosa, una de ellas es FGF21. La bioactividad de FGF21, se ha demostrado en modelos *in vitro*; su administración exógena promueve la incorporación de glucosa tanto en adipocitos como en miotubos humanos; sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular involucrado.

En esta tesis, se estudian los mecanismos moleculares que regulan la captación de glucosa en fibras aisladas de músculo esquelético cuando se le adiciona de manera exógena FGF21. Con este objetivo, las fibras aisladas fueron incubadas con inhibidores farmacológicos que permitieron determinar una vía alterativa a la canónica de insulina que involucra la participación de PKC atípicas (PKC- ζ) y la translocación de GLUT4 hacia la superficie celular. Además, se demostró que la presencia simultánea de FGF21 a baja concentración (1ng/mL) e insulina, presentan un efecto aditivo sobre la captación de glucosa. También, se muestra que en fibras aisladas que provienen de animales alimentados con dieta alta en grasa, FGF21 tiene un efecto en la captación de glucosa sin diferencias respecto a animales alimentados con dieta normal.

En conclusión, FGF21 promueve la captación de glucosa mediante la translocación de GLUT4, por un mecanismo dependiente de la actividad de PI3K y PKC- ζ e independiente de Akt.

Observamos también, que FGF21 aumenta la captación de glucosa en fibras aisladas de músculo esquelético que provienen de animales alimentados con dieta alta en grasas.

ABSTRACT

Glucose concentration is relatively constant at the plasma level. Insulin contributes to glucose uptake in skeletal muscle, which represents the main site of insulin action. Glucose uptake occurs mainly in a glucose transporter (GLUT4)-dependent manner, which can translocate from intracellular stores and subsequently fuse to the plasma membrane to facilitate the entry of glucose into the cell.

In conditions of insulin resistance, the tissue action of this hormone in skeletal muscle is reduced to allow glucose incorporation from the bloodstream; however, molecules that can be secreted from skeletal muscle and that may have a role in glucose uptake have been described, one of which is FGF21. The bioactivity of FGF21 has been demonstrated in an *in vitro* model; its exogenous administration promotes glucose incorporation in both adipocytes and human myotubes; however, the molecular mechanism involved is unknown.

In this thesis, we study the molecular mechanisms that regulate glucose uptake in isolated skeletal muscle fibers when FGF21 is added exogenously. To this end, the isolated fibers were incubated with pharmacological inhibitors that allowed us to determine an alternative pathway to the canonical insulin pathway involving the participation of atypical PKC (PKC- ζ) and the translocation of GLUT4 to the cell surface. In addition, it was shown that the simultaneous presence of FGF21 at low concentration (1ng/mL) and insulin, present an additive effect on glucose uptake. Also, it is shown that in isolated fibers from animals fed a high-fat diet, FGF21 has an effect on glucose uptake with no difference with respect to animals fed a normal diet.

In conclusion, FGF21 promotes glucose uptake through GLUT4 translocation, by a mechanism dependent on PI3K and PKC- ζ activity and independent of Akt. We also observed that FGF21 increases glucose uptake in isolated skeletal muscle fibers from animals fed a high-fat diet.

INTRODUCCIÓN

En el organismo, la glucosa está presente de manera permanente en el torrente sanguíneo y mantiene su concentración basal relativamente constante (~ 5 mmol/L). Esto, es controlado por el balance entre la absorción de glucosa desde el intestino, su producción endógena por parte del hígado y la captación y utilización por parte de los tejidos periféricos (Leto & Saltiel, 2012). Uno de los principales tejidos que regula la glicemia es el músculo esquelético, el cual contribuye en un ~ 80 % a la captación de glucosa mediada por insulina (Baron et al., 1988), lo que involucra una compleja red de transducción de señales para ejercer sus efectos en los tejidos blanco.

Regulación del transporte de glucosa mediado por insulina

La insulina es una hormona peptídica sintetizada y secretada por las células β del páncreas endocrino. La secreción de insulina depende principalmente de la concentración plasmática de glucosa y mantiene la normoglucemia mediante la inhibición de la producción hepática de glucosa y la captación por parte del hígado (promoviendo la glucogénesis) y los tejidos extrahepáticos, principalmente el músculo esquelético (McConnell et al., 2020; Najjar & Perdomo, 2019). Otros efectos generados por la insulina, involucran la inhibición de la lipólisis y la síntesis de triglicéridos en los adipocitos lo que se reduce los niveles circulantes de ácidos grasos no esterificados (AGNE) (Dimitriadis et al., 2011). El efecto de la insulina se relaciona con la disponibilidad de nutrientes, y depende de la unión de la insulina a un receptor que se encuentra ubicado en la membrana celular en los tejidos blanco como el músculo esquelético (Haeusler et al., 2018; Petersen & Shulman, 2018; Richter et al., 2021).

El receptor de insulina (INSR, por sus siglas en inglés), corresponde a un heterotetrámero conformado por dos subunidades α en la región extracelular y dos subunidades β en la región

intracelular que poseen un dominio actividad tirosina quinasa (Hubbard, 2013) lo que permite iniciar una serie de eventos intracelulares que como resultado, promueven incorporar la glucosa a las células mediante difusión facilitada a través de un transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) (Huang & Czech, 2007; Saltiel & Kahn, 2001).

Estos transportadores se encuentran principalmente expresados en las células musculares y en los adipocitos; se almacenan en vesículas intracelulares que contienen GLUT4 (GSV, por sus siglas en inglés) que translocan desde depósitos intracelulares hacia la membrana plasmática y de esta manera facilitar el ingreso de glucosa a la célula (Bryant et al., 2002; Carnagarin et al., 2015; Richter & Hargreaves, 2013). La insulina aumenta la difusión facilitada de glucosa a través de los GLUT4 (Bryant et al., 2002; Hruz & Mueckler, 2001; Huang & Czech, 2007), por lo que su translocación hacia la membrana celular del músculo es fundamental (Rose & Richter, 2005).

Ha sido descrito río abajo del INSR, la activación de una proteína andamio conocida como sustrato del receptor de insulina (IRS, por sus siglas en inglés), que es uno de los principales mediadores de los efectos de la insulina (Petersen & Shulman, 2018). La fosforilación del IRS, permite la activación de proteínas que participan como un nodo crítico en esta vía de regulación involucrando a fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que está conformada por un heterodímero y se regula mediante el acoplamiento entre la subunidad p85 y otra subunidad que es catalítica llamada p110 (Petersen & Shulman, 2018; Saltiel & Kahn, 2001). La activación de PI3K permite catalizar la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PIP2), esta reacción es importante para reclutar una quinasa dependiente de fosfoinositol-1 (PDK1) (Carnagarin et al., 2015; Saltiel & Kahn, 2001).

Lo descrito, resulta en la activación de la proteína quinasa B (PKB), también conocida como Akt (Welsh et al., 2005). La fosforilación de Akt es descrita como otro nodo crítico, que media los efectos río abajo del INSR (Petersen & Shulman, 2018) y permite la inactivación de la proteína sustrato de Akt de 160 kDa (AS160) que posee dominio Rab-GAP (proteína activadora de

GTPasa) y que está involucrado en la translocación de GLUT4 a la membrana celular, regulando la captación de glucosa (Míinea et al., 2005; Roach et al., 2007; Thong et al., 2007).

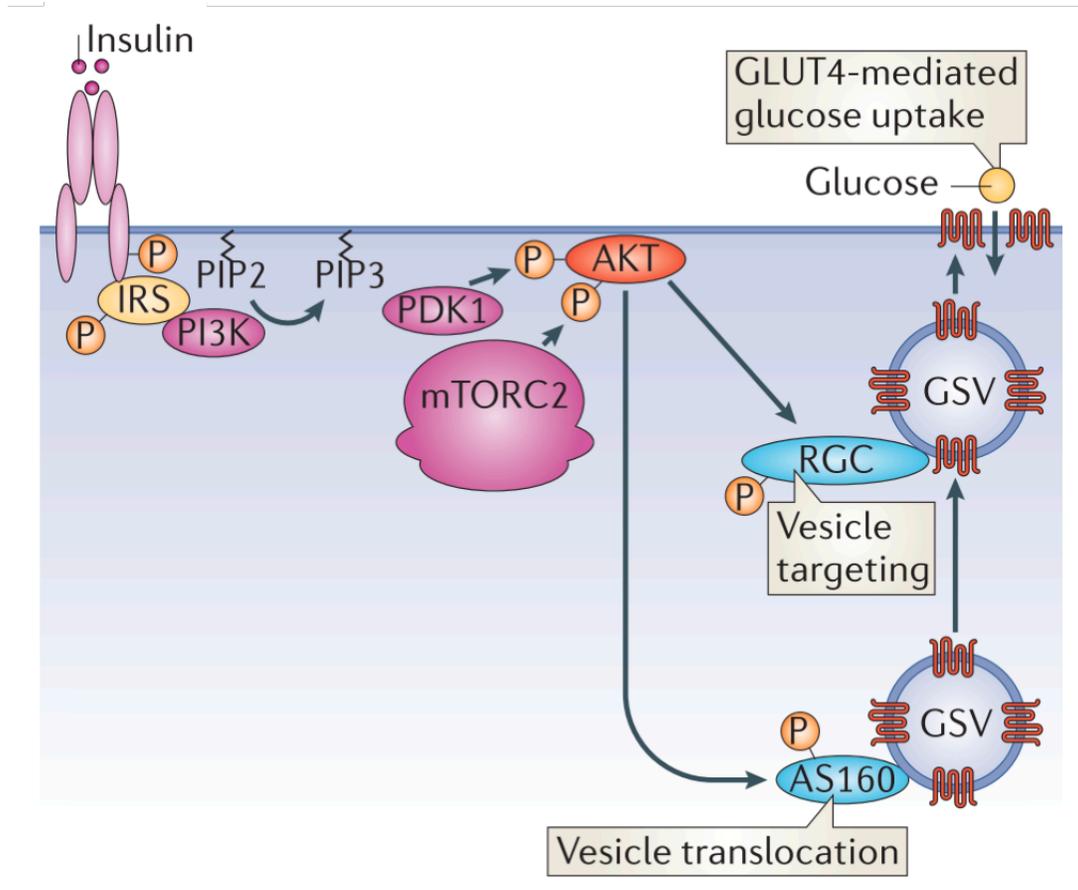


Figura 1. La señalización de insulina regula la exocitosis de GLUT4: La fosforilación del INSR desencadena una cascada de señalización dependiente del IRS que involucra el reclutamiento y activación de PI3K. Esta proteína convierte PIP2 en PIP3, que sirve de plataforma para el reclutamiento de PDK1 y de AKT. Cuando Akt se encuentra en la membrana plasmática, es fosforilada por PDK1 y el complejo 2 diana de rapamicina de mamíferos (mTORC2), esto permite la activación de Akt, promoviendo la exocitosis de GLUT4 mediante la fosforilación e inactivación de AS160 y una subunidad reguladora (RGC) que participan en la retención de GSV. Extraída de (Leto & Saltiel, 2012).

Músculo esquelético y captación de glucosa

El músculo esquelético representa un tejido esencial para la realización de diversas tareas relacionadas con la postura, la locomoción, la independencia funcional y constituye un ~ 40% de la masa corporal en sujetos adultos no obesos (Frontera & Ochala, 2015; Schiaffino & Reggiani, 2011). Este tejido presenta una compleja arquitectura, en la que se agrupan de manera muy estrecha paquetes de células conocidas como fibras musculares. Dentro de sus principales funciones se encuentran el movimiento y la generación de fuerza a intensidades variables (Mukund & Subramaniam, 2019; Schiaffino & Reggiani, 2011). Además, desempeña un papel importante en la captación de glucosa (Carnagarin et al., 2015) y representa el principal sitio de acción de la insulina, permitiendo la remoción de glucosa desde la sangre (~80-85%) en sujetos sanos con tolerancia normal a la glucosa (Carnagarin et al., 2015; DeFronzo, 2004; DeFronzo et al., 1981).

En condiciones basales, la captación de glucosa ocurre principalmente de manera dependiente de GLUT1, un transportador ubicuo y que en el músculo se encuentra predominantemente en el sarcolema (Rudich et al., 2003; Sylow et al., 2021). Las células del tejido muscular presentan invaginaciones en el sarcolema que se conocen con el nombre de túbulos transversales (túbulos-T), los que transmiten el potencial de acción por la fibra muscular y permiten la contracción de estas células (Mukund & Subramaniam, 2019). En respuesta a insulina o la actividad contráctil, los GLUT4 translocan hacia los túbulos-T permitiendo la difusión facilitada de glucosa al músculo (Huang & Czech, 2007; Lauritzen, 2013; Richter et al., 1982). Una vez al interior de la fibra muscular, la glucosa puede ser oxidada y participar de la glucólisis o promover la síntesis de glucógeno (Klein et al., 2022; Petersen & Shulman, 2018; Woerle et al., 2003).

Basado en las características metabólicas y la actividad contráctil del músculo esquelético, se pueden clasificar tres tipos de fibras musculares: *tipo I*, *Ila* y *Iib*. Esto responde a distintos fenotipos que determinan propiedades específicas de las fibras musculares en relación a su velocidad de activación, tipo de metabolismo y eficiencia energética y se relacionan con distintas isoformas de ATPasas de cadena pesada de miosina (MyHC) (Gundersen, 2011; Schiaffino &

Reggiani, 2011). Así, aquellas fibras clasificadas como tipo I o de contracción lenta, presentan una característica metabólica oxidativa y son resistentes a la fatiga, lo que le permite mantenerse en actividad durante períodos prolongados. Por otra parte, aquellas fibras de tipo II o de contracción rápida, son fatigables, lo que les permite realizar actividades de mayor intensidad, pero breves y presentan diferencias en sus perfiles metabólicos debido a que las de tipo I son de metabolismo oxidativo, mientras que las de tipo II son glicolíticas. Estas características, determinan una distribución de la expresión de este tipo de fibras en los distintos músculos del organismo, generándose músculos de tipo rápido, lento o mixto (Frontera & Ochala, 2015; Mukund & Subramaniam, 2019; Schiaffino & Reggiani, 2011).

La energía requerida por este tejido, se obtiene mediante la hidrólisis de ATP (adenosín trifosfato) a ADP (adenosín difosfato) y Pi (fosfato inorgánico) (Hardie, 2014). Un déficit en los requerimientos energéticos celulares incrementan la relación AMP:ATP y activan un complejo enzimático llamado proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Gowans et al., 2013). Este complejo promueve la restauración del balance energético celular, permitiendo la incorporación de glucosa mediante la translocación de GLUT4 inducido por estímulo contráctil en las fibras musculares (Kang et al., 2021; Kjøbsted et al., 2019; Sakamoto et al., 2005). Por otra parte, ratones sometidos a restricción calórica mostraron un aumento en la sensibilidad a insulina en el músculo esquelético por un mecanismo dependiente de PI3K y que involucra a una enzima sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) (Schenk et al., 2011), siendo este otro mecanismo involucrado en la captación de glucosa relacionada al flujo de nutrientes.

En los últimos años, se ha descrito que el músculo esquelético cumple un papel importante sobre el funcionamiento del cuerpo a través de la actividad de factores humorales relacionadas a la actividad contráctil (Hoffmann & Weigert, 2017). Resultados obtenidos por Goldstein y colaboradores en 1961, de experimentos realizados con transfusiones cruzadas entre perros en reposo y perros con actividad muscular estimulada eléctricamente, se postuló la existencia de factores humorales inducidos por la actividad muscular que regulaban diferentes procesos, como por ejemplo la captación de glucosa (Goldstein, 1961). A partir de estos factores humorales, se comienzan a estudiar las citoquinas y otros péptidos que son expresados y

liberados por el músculo esquelético, principalmente como una respuesta a la contracción muscular (Pedersen, 2011, 2013). Comprender el papel fisiológico y la respuesta biológica de estas moléculas es motivo de múltiples investigaciones (Sanford et al., 2020), dado el efecto que pueden tener sobre mitigar enfermedades y promover una mejora en la calidad de vida de las personas.

Dentro de las citoquinas descritas a la fecha, resulta interesante comprender qué papel tiene el factor de crecimiento de fibroblastos-21 (FGF21), ya que se secreta en condiciones fisiológicas de manera postprandial y regula la homeostasis de la glucosa en ratones (Markan et al., 2014). Además, ejerce efectos que tienen relación con la captación de glucosa en las células de adipocitos 3T3-L1 y miotubos humanos tratados con FGF21 (Kharitononkov et al., 2005; Mashili et al., 2011).

Factor de crecimiento de fibroblastos-21

Durante el año 2000, un equipo liderado por Itoh, describe a partir del ADN complementario de muestras de ratón y humanas, un nuevo miembro de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), preferentemente expresado en el hígado e identificado como FGF21 (Nishimura et al., 2000). La composición de FGF21 murino, corresponde a una pre-proteína de 210 aminoácidos, que posee una secuencia péptido señal de 28 aminoácidos y su forma secretada tiene una masa molecular de ~23 kilo dalton (kDa) (182 aminoácidos). La variante humana, corresponde a una pre-proteína de 209 aminoácidos, incluyendo también, un péptido señal de 28 aminoácidos (Staiger et al., 2017). Ambas secuencias peptídicas (murino y humana) comparten un ~75% de aminoácidos idénticos (Nishimura et al., 2000). Una característica de FGF21, es que presenta una baja afinidad por heparán sulfato en la matriz extracelular lo que se asocia a que sea un factor secretado a la circulación sistémica (Goetz et al., 2007).

La expresión de FGF21 ha sido demostrada en diferentes tejidos, tales como hígado (Nishimura et al., 2000), tejido adiposo (Zhang et al., 2008), riñón (Kim et al., 2013), páncreas (Johnson et

al., 2009), vasos sanguíneos, corazón (Planavila et al., 2013) y músculo esquelético (Lee et al., 2012; Mashili et al., 2011). La regulación de la expresión de FGF21 depende del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR, por sus siglas en inglés). En el hígado, tejido donde predominantemente se expresa FGF21, la regulación de la expresión de este péptido está determinada por PPAR α , que puede unirse a la región promotora del gen de FGF21 para su transcripción (Lundåsen et al., 2007). En modelo murino, se ha podido establecer que el incremento en los niveles circulantes de FGF21 está relacionado con períodos de ayuno de entre 12 a 24 h, esto permite promover la gluconeogénesis hepática e incrementar los niveles circulantes de glucosa (Liang et al., 2014), y se restablece la concentración plasmática de FGF21 a niveles basales a partir de 4 h posterior a una ingesta (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007). Por otra parte, se ha mostrado que la administración farmacológica de rosiglitazona, un agonista de PPAR γ (subtipo de la familia PPARs), puede incrementar la expresión de FGF21 (*in vivo*) desde células del tejido adiposo y sus niveles plasmáticos en animales sanos y obesos (Muisse et al., 2008). Aunque se describe que condiciones de ayuno han incrementado fisiológicamente los niveles plasmáticos de FGF21 en pocas horas en modelo de ratón, en humanos se aprecia esta respuesta, pero en ayuno prolongado (10 días) (Fazeli et al., 2015).

Si bien, se ha descrito principalmente al hígado (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007; Vernia et al., 2016) como fuente principal en la secreción de FGF21, en muestras obtenidas a partir de biopsias de músculo esquelético humano, se ha podido demostrar la expresión del transcrito para FGF21 (Hojman & Pedersen, 2009; Suomalainen et al., 2011) como también, en músculos disecados a partir de ratones (Oost et al., 2019; Rodríguez-Nuevo et al., 2018; Tezze et al., 2017). El aumento en los niveles proteicos y la secreción de FGF21 ha sido demostrado de manera *ex vivo* mediante un modelo murino transgénico a través de la activación constitutiva de Akt y asociado a un mecanismo dependiente de PI3K (Izumiya et al., 2008). También, se ha demostrado en miotubos primarios de ratones y humanos que la disfunción mitocondrial aumenta los niveles de FGF21 por mecanismos dependientes de Akt y AMPK (Keipert et al., 2014; Vandanmagsar et al., 2016).

Para poder ejercer su acción en las células blanco, FGF21 requiere de un receptor, conocido como receptor de factor de crecimiento fibroblástico (FGFR, por sus siglas en inglés) y a su vez de β -Klotho (KLB), una proteína transmembrana que funciona como cofactor obligatorio para la señalización de FGF21 (Kurosu et al., 2007; Ogawa et al., 2007). La unión de FGF21 a su cofactor KLB induce su heterodimerización con el FGFR, generando autofosforilación de los residuos de tirosina de FGFR, lo que promueve la activación de cascadas de transducción de señales que implican al sustrato 2 de receptor para FGF (FRS2), MAP quinasas, PI3K-Akt y PKCs (Gotoh et al., 2004; Izumiya et al., 2008; Lax et al., 2002; Li et al., 2016). Estas vías han sido implicadas en la mayoría de las funciones biológicas que son reguladas por el FGFR (Gimeno & Moller, 2014; Jeon et al., 2016; Kharitonov et al., 2008; Li et al., 2016; Moyers et al., 2007).

En un estudio de nuestro laboratorio, se demostró un aumento en la expresión de FGF21 tanto a nivel de ARN mensajero (ARNm) como proteína, además de su secreción en cultivo de fibras aisladas provenientes de ratón, mediante la utilización de estímulo eléctrico o ATP exógeno. En relación a esto, un estímulo con ATP (3 μ M) incrementa de manera significativa los niveles de FGF21 secretado al medio de cultivo en un período de 240 min posterior a la estimulación (Arias-Calderon, 2019). Mediante la utilización de técnicas de Western blot e inmunoprecipitación se ha podido detectar la presencia de FGFR y KLB en músculo esquelético de ratón y cultivo primario de miotubos humanos (Benoit et al., 2017; Jeon et al., 2016; Vandanmagsar et al., 2016). La presencia del complejo FGFR/KLB nos permite hipotetizar un posible efecto auto/paracrino respecto a FGF21 directamente en el músculo esquelético.

Respecto a la secreción de FGF21, los mecanismos que controlan esto no son del todo conocidos. Estructuralmente, FGF21 presenta un péptido señal en el segmento amino terminal que le permite dirigirse hacia el retículo endoplasmático (RE) y continuar mediante el tráfico vesicular hacia el aparato de Golgi (Zhang & Schekman, 2013). Recientemente, se ha demostrado en hepatocitos que YIPF6 (familia del dominio Yip1, miembro 6) un receptor de membrana que regula el transporte vesicular, se une a nivel del lumen del RE a FGF21. Esto,

transfiere selectivamente la interacción YIPF6-FGF21 en vesículas COPII (complejo proteico de la capa II) lo que permite su secreción al medio extracelular (Wang et al., 2019).

Con respecto a la bioactividad de FGF21, se ha demostrado en modelo *in vitro* que la administración exógena promueve la incorporación de glucosa tanto en adipocitos como en líneas celulares de preadipocitos 3T3-L1 por mecanismos dependientes del transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1) (Kharitononkov et al., 2005). Estudios realizados en modelo murino con resistencia a la insulina, han mostrado que la administración aguda de FGF21 reduce los niveles circulantes de glucosa (Xu et al., 2009). Mediante la utilización de un clamp hiperinsulinémico-euglicémico en ratones transgénicos deficientes de leptina (*ob/ob*), se demostró que el tratamiento de FGF21 (8 días) mejora la sensibilidad a insulina (glucosa infundida 20% más) comparado con un tratamiento vehículo (Berglund et al., 2009). Otro estudio, mostró que la administración de FGF21 (14 días), reduce los niveles de insulina en ayuno tanto en ratones normales como alimentados con HFD. Además, reduce en un 23% los niveles plasmáticos de glucosa en los animales alimentados con dieta HFD (Emanuelli et al., 2014). Estos efectos, han sido atribuidos a una expansión del tejido adiposo subcutáneo lo que mejora la sensibilidad hepática a insulina y en la captación de glucosa (Li et al., 2018).

Resistencia a la insulina en músculo esquelético

La resistencia a la insulina (RI) se caracteriza por una insuficiencia de esta hormona por ejercer sus efectos en los tejidos sensibles. En este sentido, se manifiesta en un deterioro en inhibir la producción hepática de glucosa y una disminución en la captación de glucosa por parte del tejido adiposo y el músculo esquelético (Kahn & Flier, 2000); como consecuencia, en un estado de RI, se requiere una mayor concentración hormonal para mantener una respuesta normal (Kahn, 1978). Esta condición, se ha podido determinar comparando la respuesta de la concentración plasmática de glucosa en pacientes diabéticos mediante la administración de glucosa e insulina de manera simultánea. Aquellos pacientes que no mostraron una disminución

de la glicemia posterior a la administración de insulina, fueron clasificados como insensibles a insulina. (Himsworth, 1936).

En condiciones fisiológicas, la producción endógena de glucosa en humanos se mantiene relativamente constante (~ 5 mmol/L); sin embargo, en condiciones fisiopatológicas, se ha podido determinar utilizando glucosa marcada (*in vivo*) un incremento en la producción endógena de glucosa por vía gluconeogénica (Gastaldelli et al., 2000). Este incremento en la gluconeogénesis, permite una mayor liberación de glucosa y contribuye a un estado de hiperglicemia tanto en condiciones de ayuno como postprandiales en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Gastaldelli et al., 2000, 2007). Este estado de hiperglicemia, refleja un deterioro respecto a la capacidad de la insulina para poder regular la producción hepática de glucosa y como consecuencia genera un estado de hiperinsulinemia como un mecanismo compensatorio (Smith et al., 2020).

En sujetos resistentes a la insulina, una ingesta de glucosa (75 g) aumenta la glicemia y la concentración de insulina comparada con sujetos normales, esto sin afectar la tasa metabólica y la oxidación de carbohidratos postprandial (Galgani & Ravussin, 2012). Esta hiperglicemia postprandial, más bien compensa la captación tisular de glucosa, sin presentar diferencias en sujetos DMT2 respecto a sujetos no diabéticos (Woerle et al., 2006). Sin embargo, se ha reportado mediante la utilización de isótopos de glucosa, que la captación de glucosa postprandial por parte del músculo esquelético se ve reducida en sujetos con DMT2 (Meyer et al., 2004). Esto, se ha explicado por defectos en la señalización intracelular (post-receptor) de insulina que tienen relación con una reducción en la actividad de IRS-1, PI3K (Cusi et al., 2000; Dresner et al., 1999) y también se ha reportado una disminución en la fosforilación Akt (Krook et al., 1998; Tonks et al., 2013) cuando se administra una infusión de insulina en sujetos obesos y con DMT2.

FGF21 y su relación con la captación de glucosa

Considerando los efectos demostrados de FGF21 sobre la disminución de los niveles circulantes de glucosa, se ha determinado (*in vitro*) que el tratamiento con FGF21 reduce la producción endógena de glucosa en células de hepatoma H4IIE y además, promueve la captación de glucosa en adipocitos diferenciados 3T3-L1 (Xu et al., 2009). La vía de transducción involucrada en la inhibición de la producción hepática de glucosa está relacionada con PI3K-PKC ι/λ (atípicas), esto fue demostrado mediante la utilización de inhibidores farmacológicos y lisado de proteínas totales provenientes de células H4IIE tratadas con FGF21; también ha sido demostrado en un modelo murino transgénico deficiente del receptor de leptina (db/db) utilizando un extracto de proteínas de tejido hepático posterior a un tratamiento de FGF21 (Kong et al., 2013).

KLB es una proteína involucrada en la respuesta de FGF21 (Ding et al., 2012; Kurosu et al., 2007); sin embargo, en un modelo de ratones que carece de KLB específicamente en hepatocitos, se demostró que el tratamiento con FGF21 durante dos semanas, tiene efectos sobre la captación de glucosa de manera independiente de la acción directa sobre el hígado (Lan et al., 2017). A través de la utilización de isótopos estables por aminoácidos en cultivo celular de 3T3-L1 tratados con FGF21, analizados posteriormente con espectrometría de masas, se ha podido determinar que la señalización río abajo del receptor FGFR1 se propaga mediante la actividad de quinasas reguladas por señales extracelulares $\frac{1}{2}$ (ERK1/2) y del complejo 1 diana de rapamicina en mamíferos (mTORC1) (Minard et al., 2016); esto se ha confirmado *in vivo* mediante la administración intraperitoneal de FGF21 y su posterior recolección de muestras de tejido adiposo blanco (TAB) (Emanuelli et al., 2014; Minard et al., 2016).

El tratamiento con FGF21, ya sea una sola inyección (Xu et al., 2009) o la administración continua durante 4 semanas (Li et al., 2018) en un modelo murino, ha mostrado tener un papel insulino sensibilizante evaluado mediante clamp hiperinsulinémico-euglicémico, que refleja un incremento en la tasa de infusión de glucosa para mantener la euglucemia. Parte de los tejidos

involucrados en la reducción de los niveles de glucosa mediante tratamiento con FGF21 durante dos semanas, seguido de un estímulo con insulina corresponden al TAB, tejido adiposo pardo (TAP) y músculo esquelético, esto se realizó *in vivo* mediante la utilización de isótopos de glucosa (Emanuelli et al., 2014).

Una vía alternativa que involucra un efecto agudo relacionado al transporte de glucosa mediado por insulina son las isoformas atípicas de PKC (aPKC). Esto se ha demostrado en cultivos celulares de mioblastos L6 y pre-adipocitos humanos mediante la utilización de transferencia adenoviral de aPKC que como resultado involucra a esta familia de proteínas para la captación de glucosa inducida por insulina (Bandyopadhyay et al., 2002). La actividad de aPKC es dependiente de PI3K (Bandyopadhyay et al., 1997). FGF21 también involucra la actividad de PI3K río debajo de su receptor (Li et al., 2016), por lo que se podría hipotetizar que parte de los efectos relacionados a este papel insulino sensibilizante en músculo esquelético involucra la participación de aPKC.

Se ha descrito, que FGF21 promueve la captación de glucosa en miotubos primarios humanos. En músculo esquelético de ratón la incubación simultánea de FGF21 e insulina, incrementa la captación de glucosa por un mecanismo independiente de Akt, AS160 y ERK1/2; proteínas involucradas en la vía canónica de insulina (Mashili et al., 2011); a pesar de ello, no se describe el mecanismo que está involucrado. Desde el punto de vista fisiológico, el único momento donde se encuentran en circulación FGF21 e insulina es postprandial (Markan et al., 2014). En este sentido, se ha mostrado que una dieta rica en carbohidratos (CHO) (80% CHO), incrementa los niveles plasmáticos de FGF21 en sujetos sanos comparada con una dieta control eucalórica (CON). Este incremento de los niveles de FGF21, fue acompañado de un aumento de la captación de glucosa en la pierna de los sujetos que eran parte del estudio, respecto a la dieta CON (Lundsgaard et al., 2016). No se puede descartar que este incremento en la secreción de FGF21, independiente de su origen, tenga un efecto fisiológico a nivel muscular relacionado con la captación de glucosa.

La obesidad es una condición que también promueve un incremento en la expresión génica y los niveles circulantes de FGF21 tanto en ratones como en humanos. En modelo murino, se demostró que la exposición a dieta HFD durante 22 semanas incrementan los niveles séricos de FGF21 y además, la expresión de ARNm para FGF21 tanto en hígado como TAB comparado con ratones delgados (Fisher et al., 2010). Respecto a los humanos, se evidenció un aumento en los niveles circulantes de FGF21 de sujetos con sobrepeso u obesos, respecto a sujetos delgados (Mraz et al., 2009; Zhang et al., 2008). Utilizando análisis de regresión logística se mostró asociación positiva entre los niveles séricos de FGF21, adiposidad, insulina en ayunas y triglicéridos tras ajustar por edad e índice de masa corporal (IMC) (Zhang et al., 2008).

En modelo murino sometido a DIO, la respuesta reducida en la señalización de FGF21 ha sido atribuido a una disminución en la expresión de FGFR en hígado y TAB (Fisher et al., 2010) o KLB en TAB (Markan et al., 2017) comparado con animales alimentados con dieta *chow*. En humanos, sujetos con DMT2 presentan una disminución en la expresión de KLB en músculo esquelético y defectos en la señalización de FGF21 en comparación con sujetos delgados (Jeon et al., 2016; Kruse et al., 2017). Siendo el músculo esquelético un tejido predominante en la captación de glucosa por vía GLUT4 (Lee et al., 2012), es necesario entender el potencial que puede tener como blanco de las acciones de FGF21 en condiciones de DIO.

En este sentido, FGF21 proporciona una visión de interés debido a las aproximaciones terapéuticas estudiadas en ensayos preclínicos donde también se refleja una disminución de las concentraciones plasmáticas de glucosa con la administración subcutánea de análogos de FGF21 (Adams et al., 2013; Camacho et al., 2013). En humanos, este tipo de tratamiento no ha mostrado un descenso de los niveles de glucosa en ayuno en comparación con un placebo (Gaich et al., 2013; Talukdar et al., 2016). Otros estudios dan cuenta de efectos indeseados respecto a la homeostasis ósea en ratones (Geng et al., 2020). En este sentido, tanto la administración farmacológica como la sobreexpresión de FGF21, promueven la pérdida de tejido óseo y estimulan la adipogénesis en la células madres mesenquimales de la médula ósea (Li et al., 2020; Wei et al., 2012).

De acuerdo a los antecedentes, el tratamiento con FGF21 tiene efectos sobre la regulación de la glicemia. A nivel muscular, la administración exógena de FG21 promueve la captación de glucosa por un mecanismo aparentemente independiente de la vía Akt-AS160. Por otro lado, se ha descrito la participación de PI3K-aPKC en el transporte de glucosa estimulado por insulina en mioblastos de rata. No obstante, no se ha descrito la participación de la vía PI3K-aPKC sobre la captación de glucosa inducida por FGF21 en el músculo esquelético de manera alternativa a la insulina.

HIPÓTESIS

“El factor de crecimiento de fibroblastos-21 (FGF21) exógeno aumenta la captación de glucosa a través de una vía dependiente de la actividad de PI3K-aPKC-GLUT4 en fibras aisladas de músculo esquelético de ratón”.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar los mecanismos moleculares que regulan la captación de glucosa inducida por FGF21 en fibras aisladas de músculo esquelético de ratón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1:

Determinar el efecto de FGF21 en la captación de glucosa y la translocación de GLUT4 hacia la membrana celular en fibras aisladas de músculo esquelético de ratones alimentados con dieta normal *chow* (NCD).

Objetivo 2:

Evaluar la participación de la vía transduccional fosfatidilinositol 3-quinasa y proteína quinasa C atípicas (PI3K-aPKC) en la captación de glucosa inducida por FGF21 en fibras aisladas de músculo esquelético de ratones alimentados con NCD.

Objetivo 3:

Comparar los niveles de captación de glucosa inducidos por FGF21 en fibras aisladas de músculo esquelético de ratones alimentados con NCD y con HFD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los animales machos cepa C57BL/6J fueron obtenidos desde el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Se mantuvieron en una habitación con temperatura constante a 21°C y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h. A los 20 días de nacidos, los ratones provenientes de una misma camada fueron divididos en dos grupos. El grupo control recibió una dieta NCD que contenía 10% grasa, 20% proteínas y 70% carbohidratos. El grupo alimentado con HFD recibió una dieta con 60% grasa, 20% proteínas y 20% carbohidratos (D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ). Los animales fueron eutanasiados posterior a las 8 semanas de tratamiento. El Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, aprobó todos los procedimientos realizados en los animales asociado al proyecto Fondecyt N° 1151293 (Dr. Enrique Jaimovich).

Cultivo de fibras aisladas de músculo FDB

El procedimiento realizado para la obtención de fibras musculares ha sido descrito anteriormente (Casas et al., 2010). Una vez disecado el músculo *flexor digitorum brevis* (FDB), se procedió a disgregar las fibras mediante digestión enzimática en todo el músculo, esto durante un tiempo de 90 minutos a una temperatura de 37°C con la utilización de colagenasa tipo 2 (1,96 mg/mL) en medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) con un 5% de suero equino (HS) (Worthington, Lakewood, NJ, EEUU). Posteriormente, el músculo se disoció mecánicamente al pasar a través de pipetas Pasteur pulidas al fuego. Las fibras aisladas se sembraron en cubreobjetos recubiertos con una membrana basal de matriz Matrigel® y se le agregó medio de cultivo DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) suplementado con suero de caballo al 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Las fibras se utilizaron para experimentación en un tiempo no superior a 12 h después del aislamiento.

Ensayo de captación de glucosa en fibra aislada con sonda fluorescente 2-NBDG

El procedimiento utilizado para determinar la captación de 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-

yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) fluorescente (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) fue descrito anteriormente (Osorio-Fuentealba et al., 2013). Brevemente, las fibras musculares fueron lavadas con solución tampón *Krebs-Ringer* en ausencia de glucosa y se estimularon con insulina (100 nM) (Actrapid, Novo-Nordisk, Dinamarca) o FGF21 (Enzo, Farmingdale, NY, EEUU) a diferentes concentraciones (10, 25, 50, 100, 500, 1000 ng/mL respectivamente) durante 20 min, antes de exponerse durante 15 minutos a 2-NBDG (300 μ M). Previo a las medidas de fluorescencia, las placas de cultivo fueron lavadas nuevamente con solución tampón *Krebs-Ringer*. Las fibras fueron excitadas a través de un láser de argón a una longitud de onda de 488 nm, y la emisión de fluorescencia se recolectó con un objetivo 40X Plan ApoFluo y un filtro de paso de banda entre 505 y 550 nm en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5. La captación de 2-NBDG se calculó mediante la densidad integrada de la señal fluorescente intracelular considerando tres regiones diferentes de cada fibra analizada (después de restar la señal extracelular de fondo). El rendimiento de cada animal fue de 6 a 8 placas de cultivo de fibras, que se trataron con diferentes condiciones y para cada condición, se analizaron 5 a 20 fibras individuales por cada placa de cultivo de cada animal de forma independiente. Las regiones de interés de las imágenes, fueron tomadas de manera longitudinal a las fibras y se cuantificaron mediante el software Image J (NIH, Bethesda, MD, EEUU). Los inhibidores farmacológicos utilizados fueron: Citocalasina B (5 μ M) (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU); Indinavir (100 μ M) (Merck, Rahway, NJ, EEUU); LY294002 (50 μ M) (Merck, Rahway, NJ, EEUU); MK-2206 (1 μ M) (Cayman Chemical, Michigan, EEUU), BIM I (Bisindolilmaleimida I) (2.5 μ M) (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU); Gö6976 (1 μ M) (Farmingdale, NY, EEUU); pPKC- ζ (pseudosustrato PKC- ζ) (100 nM) (Tocris Biosciences, Bristol, Reino Unido).

Captación de ^3H -2DG

Se utilizó FGF21 o insulina durante 20 minutos a una temperatura de 37°C para estimular las placas de cultivo con fibras musculares aisladas como se describió previamente (Osorio-Fuentealba et al., 2013). Las fibras fueron lavadas en dos ocasiones con una solución salina tamponada con HEPES [en mM: NaCl 122, KCl 4.9, MgSO₄ 2.5, CaCl₂ 1, HEPES 20 (pH 7.4)]. La captación de glucosa fue medida durante 10 minutos utilizando ^3H -2-desoxiglucosa (10 mM) a 37°C en la solución descrita con anterioridad. Posteriormente, las fibras fueron lavadas en

tres ocasiones con solución salina enfriada que contenía HEPES en presencia de D-glucosa (30 mM). La radiactividad presente en las placas de cultivo se determinó mediante recuento de centelleo líquido después de la adición de NaOH (0.05 N).

Inmunofluorescencia indirecta

Las fibras musculares aisladas de músculo FDB fueron cultivadas y tratadas en cubreobjetos de vidrio de 35 mm, para realizar la inmunofluorescencia contra la proteína FGFR1 y KLB según el protocolo utilizado en nuestro laboratorio (Llanos et al., 2015). Brevemente, las células fueron lavadas 2 veces con tampón fosfato salino (PBS) 1X (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, pH 7,4) y posteriormente se fijaron mediante incubación durante 10 min a temperatura ambiente con PBS que contenía paraformaldehído (PFA) al 4% (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA). A continuación, las fibras se lavaron con PBS, se permeabilizaron con 100 mM de Tritón X-100 al 0,1% en PBS. Luego, se lavaron 4 veces con PBS 1X y se bloquearon durante 1 h con una solución PBS 1X-BSA 1% a temperatura ambiente. Se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario anti-FGFR1 (1:200, #9740, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EEUU) o anti-KLB (1:200, #PA5-44023, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EEUU) a 4°C. Además, se utilizó un anticuerpo contra el receptor de dihidropiridina (DHPR) (1:200, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE.UU.) para detectar el DHPR. Se lavaron tres veces con PBS-BSA 1% y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario Alexa Fluor-488 anti-conejo y Alexa Fluor-546 anti-ratón, respectivamente (dilución 1:250, Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces con PBS-BSA 1% y se montaron en portaobjetos utilizando medio de montaje de fluorescencia Dako (Dako, CA, EEUU). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5 y analizadas posteriormente utilizando el programa de libre acceso ImageJ (NIH, EEUU).

Ensayo de detección de GLUT4 en la superficie celular

La presencia de GLUT4 en la superficie de la fibra se evaluó mediante la detección de una proteína quimera GLUT4_{myc}-eGFP en el sarcolema de la fibra muscular. Para esto, se realizó una inyección intramuscular de plásmidos y a continuación el procedimiento de electroporación

como se describió anteriormente (DiFranco et al., 2009). Brevemente, los ratones de seis semanas de edad, fueron anestesiados con isoflurano y se les administró hialuronidasa (2 mg/mL) en una solución de NaCl (0,9%) directamente al músculo FDB. Luego de 1 h, se inyectaron 20 µg de un plásmido que codifica para una proteína quimera GLUT4 myc -eGFP bajo el control del promotor CMV (generosamente proporcionado por A. Klip) y se realizó la electroporación dando 20 pulsos de 20 ms de duración, a 1 Hz, con una amplitud de ~ 100 mV/cm.

Los ratones fueron mantenidos durante 2 semanas antes de realizar los experimentos. Las fibras aisladas fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio y se mantuvieron en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) sin suero durante 30 minutos. Las células fueron incubadas durante 20 min con FGF21 (100 ng/mL) o insulina (100 nM) (Actrapid, Novo-Nordisk, Dinamarca). La presencia de GLUT4 myc -eGFP en la superficie de las fibras, se realizó sin permeabilizar su membrana celular, como se describió anteriormente (Llanos et al., 2015). Brevemente, después de lavar las placas de cultivo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) [en mM: NaCl 127; KCl 2.7; Na₂HPO₄ 10; KH₂PO₄ 1.8], éstas fueron fijadas mediante la incubación de PBS con paraformaldehído al 4% (*Electron Microscopy Science*, Hatfield, PA, EEUU) durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, las fibras fueron lavadas con PBS y se bloquearon durante 1 hora con PBS-BSA (albúmina de suero bovino) al 1% a temperatura ambiente. Los niveles de GLUT4 myc -eGFP en la superficie celular se inmunodetectaron con el anticuerpo monoclonal anti- myc (dilución 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) seguido de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-Fluor 546 (dilución 1:600, *Molecular Probes*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Bajo estas condiciones, la translocación de GLUT4 permite que el epítipo myc se encuentre fuera de la membrana plasmática y pueda ser inmunodetectada. Las muestras se montaron en portaobjetos utilizando medio utilizando medio de montaje de fluorescencia Dako (Dako, CA, EEUU) y se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su utilización. Las imágenes de inmunofluorescencia se adquirieron con un microscopio Carl Zeiss Pascal 5 y el procesamiento se realizó con el software ImageJ (NIH, EEUU).

Inmunodetección de proteínas mediante técnica de Western blot

Los músculos FDB de ratones fueron homogeneizados en una solución tampón de lisis RIPA frío [en mM: NaCl 140; Triton X-100 al 1%, EDTA 1; EGTA 1 y Tris-HCl 20 (pH 7.5)] complementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa como se describió anteriormente (Llanos et al., 2015). Las muestras fueron incubadas en hielo durante 30 minutos, y después se centrifugaron durante 30 minutos a 3.000 g. Las proteínas sobrenadantes se separaron en geles SDS-PAGE al 8%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) a 350 mA durante 120 min. Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 h en tampón TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) suplementado con leche descremada al 3%, con Tween-20 0,5%. Luego fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Akt (1:2000, #2920); anti-fosfo-Akt (Ser473, 1:2000, #4060); anti-AS160 (1:1000, #2670); anti-fosfo-AS160 (Thr642, 1:1000, #4288); anti-fosfo-AMPK α (Thr172, 1:1000, #2535); anti AMPK α (1: 1000, #5831); anti-fosfo-receptor de insulina β (Tyr1150/1151, 1:1000, #3024) y anti-receptor de insulina β (1:1000, #3020) todos de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EEUU). Además se utilizaron anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204, 1:1000, #136521) y anti-ERK1/2 (1:1000, #514302) provenientes de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EEUU). Posteriormente, las membranas PDVF fueron lavadas con una solución salina tamponada con Tris y *Tween 20* (0.1%) (TBS-T) y se incubaron durante 1.5 h con un anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo unidos a peroxidasa de rabanito (HRP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). El análisis de densitometría se realizó con el software Image J (NIH, Bethesda, MD).

Test de tolerancia a la glucosa e insulinemia

Para poder determinar la tolerancia a la glucosa de los animales, fueron mantenidos en condiciones de ayuno entre 12-16 h y se les administró de manera intraperitoneal una carga de glucosa equivalente a 2 g/kg. Se recolectaron muestras de sangre de la cola a distintos tiempos: 0, 15, 30, 60 y 120 min. La concentración de glucosa fue medida a través de un glucómetro *One Touch Ultramini®* (Johnson & Johnson, CA, EEUU). Las concentraciones de insulina en plasma se determinaron con un ensayo inmunoenzimático específico para ratones (Mercodia, Uppsala, Suecia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, una vez centrifugadas las

muestras se agregaron 50 μ l del sobrenadante a la placa preparada con el anticuerpo de captura propio del kit, además del cóctel de anticuerpos de detección, los que fueron incubados en agitación durante 1h. Posteriormente, se lavó la placa con solución de lavado propio del kit y se incubó durante 1 h con 100 μ l del sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), agregando 100 μ l de solución de detención de la reacción al finalizar el procedimiento. La lectura de la placa se realizó a una longitud de onda de 450 nm.

Análisis estadístico

Los datos experimentales se presentan como promedio \pm error estándar (SEM) de un número de experimentos indicados como (n). Se midió la respuesta de entre 5 a 20 fibras musculares en cada condición, pero se expresa el promedio obtenido por animal. Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico y las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo a través de las pruebas de *t* de Welch o ANOVA con post hoc de *Dunnet* (señalado en cada figura) mediante el uso del programa *GraphPad Prism 9* (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

RESULTADOS

FGFR1 y KLB se encuentran presentes en fibras aisladas de músculo esquelético de ratón

Con la finalidad de determinar los niveles proteicos de FGFR1 y de KLB en el músculo esquelético, se realizaron análisis de inmunodetección utilizando extractos homogeneizados de FDB, además de hígado y tejido adiposo como control positivo. FGF21 presenta una gran afinidad por FGFR1 (Kilkenny & Rocheleau, 2016), sin embargo su expresión es menor en hígado que en tejido adiposo (Fisher & Maratos-flier, 2015; Itoh, 2014) (**Fig. 2A**). La señalización intracelular inducida por FGF21 involucra también la isoforma FGFR3 (Suzuki et al., 2008) y FGFR4, este último predominantemente expresado en el hígado (Kurosu et al., 2007).

Para poder identificar la distribución subcelular de FGFR1 y KLB, se realizaron cultivos de fibras aisladas provenientes de músculo FDB de ratón. Las fibras fueron permeabilizadas y para determinar la presencia de FGFR1, así como de KLB, se utilizaron anticuerpos anti-FGFR1 y anti-KLB (en verde); además, como marcador de túbulo-T se utilizó un anticuerpo anti-DHPR (en rojo) (**Fig. 2B-C**). Los resultados muestran que tanto FGFR1 como KLB se encuentran presentes en fibras musculares y muestran un patrón de localización tanto en el sarcolema como en el citoplasma, esto confirma la presencia del receptor y el cofactor necesarios para la transducción de señales río abajo de FGF21.

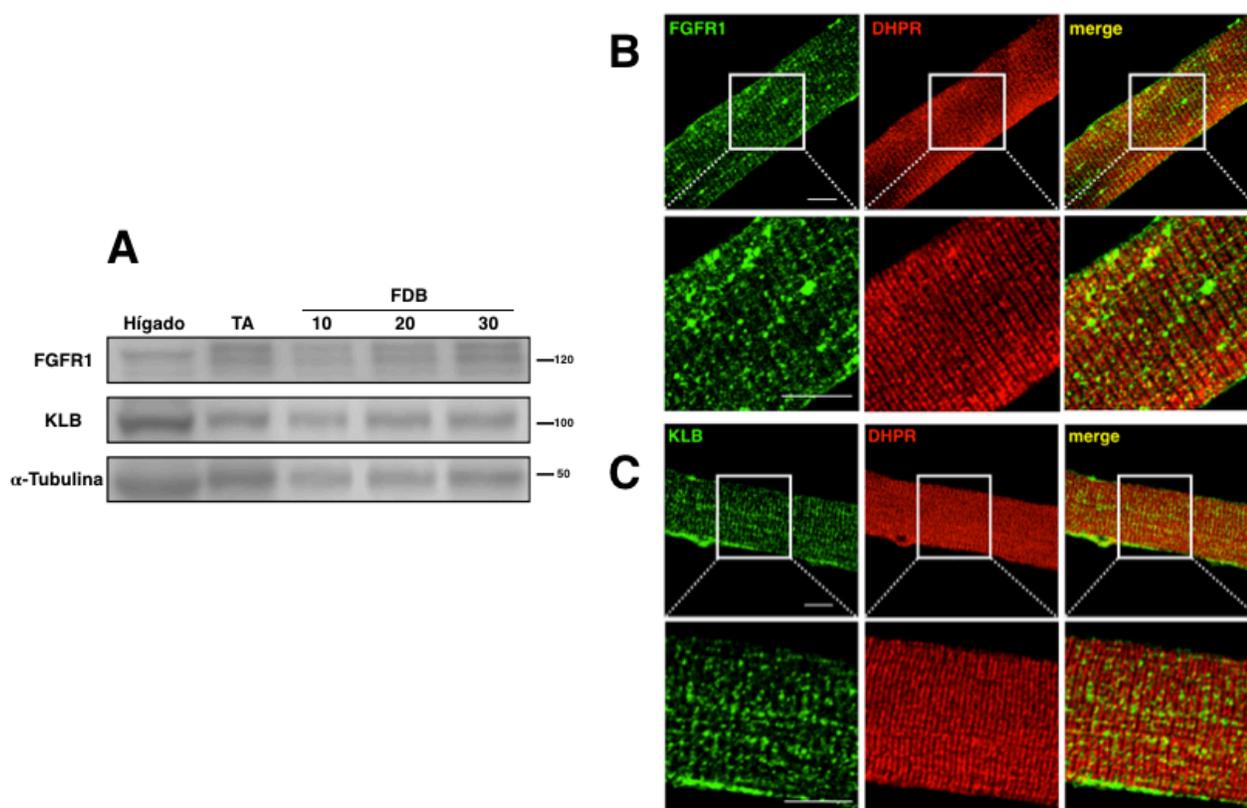


Figura 2. Distribución subcelular de FGFR1 y KLB en fibras aisladas del músculo esquelético. A: *Western blot* representativo de FGFR1 y KLB, muestras de hígado homogeneizadas (20 μ g de proteínas, carril 1), tejido adiposo (TA) (20 μ g de proteínas, carril 2) y FDB de músculo esquelético (10, 20 y 30 μ g de proteínas, carril 3, 4 y 5 respectivamente), (n = 3). **B-C:** imágenes confocal de la sección medial de fibras aisladas del músculo FDB (plano focal comprende grosor de 1 μ m). Las fibras se permeabilizaron y se incubaron conjuntamente con anticuerpo monoclonal anti-FGFR1 (1:200) o anti-KLB (1:200) y anti-DHPR (1:300); luego se usaron los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 y 546; (figuras representativas de al menos 10 fibras analizadas). Escala: 20 μ m.

FGF21 aumenta la captación de glucosa en fibras aisladas de músculo adulto

Para evaluar el efecto agudo de FGF21 sobre la captación de glucosa, las fibras fueron incubadas durante 20 min con concentraciones crecientes de FGF21, seguido de la medición de captación de 2-NBDG como se describe (Materiales y Métodos). La captación basal se determinó reemplazando el medio DMEM por la solución tampón *Krebs-Ringer*. El efecto

máximo sobre la captación de 2-NBDG se muestra con 100 ng/mL FGF21. En este caso la captación de 2-NBDG muestra un incremento de $1,90 \pm 0,18$ veces sobre la condición basal (**Fig. 3A**). A esta concentración, se observó que FGF21 promueve un efecto máximo sobre la captación de 2-NBDG con una magnitud ligeramente superior a la obtenida con insulina $1,65 \pm 0,08$ (100 nM) (**Fig. 3B**). Para corroborar este efecto sobre la captación de glucosa en las fibras aisladas, se realizó el ensayo clásico de glucosa tritiada (**Fig. 3C**). Aquí se muestra el aumento de la captación de glucosa tritiada tanto con insulina ($1,48 \pm 0,17$) como con FGF21 ($1,53 \pm 0,08$) las que fueron similares a los resultados obtenidos con 2-NBDG. Estos resultados muestran que la exposición aguda a FGF21 promueve la captación de glucosa en fibras musculares aisladas.

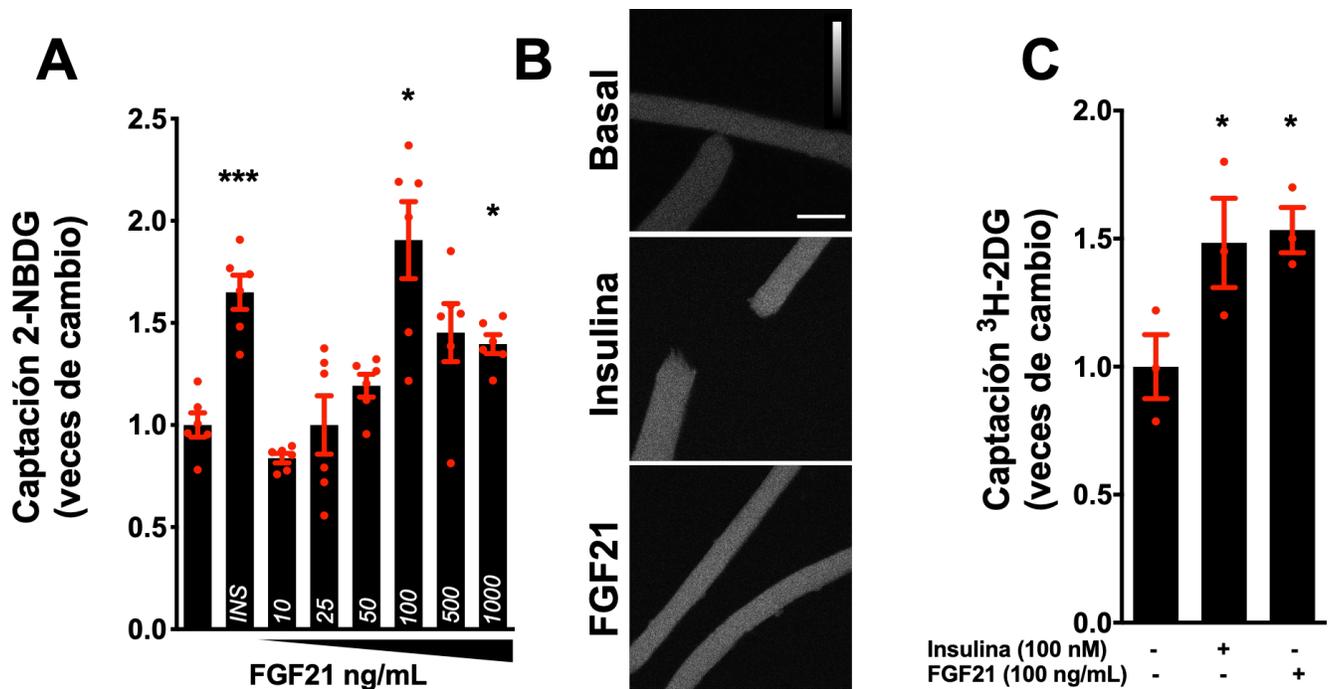


Figura 3. FGF21 promueve la captación de 2-NBDG en fibras aisladas de músculo esquelético adulto. Las placas de cultivo de fibras aisladas se incubaron durante 20 min con insulina (100 nM) o FGF21 como se indica y posteriormente fueron cargadas durante 15 min con 2-NBDG (300 μ M). Se muestran las veces de cambio sobre la condición basal. **A:** curva dosis-respuesta a FGF21 (n = 6 animales). **B:** Imágenes representativas de la absorción de 2-NBDG. Barra de escala (50 μ m). **C:** se

evaluó la captación de ^3H -2DG en fibras musculares aisladas estimuladas con insulina o FGF21 ($n = 3$ animales). Los valores se muestran como la media de cultivos independientes \pm SEM. *** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs basal. Prueba de ANOVA con post hoc de Dunnett. Los datos representan cultivos de fibras independientes provenientes de 3 o 6 animales.

El efecto de FGF21 sobre la captación de glucosa es dependiente de la actividad del GLUT4

Para determinar si el efecto de FGF21 en los cultivos de fibras se produce debido a la actividad de los transportadores de glucosa, se utilizó Citocalasina B, un compuesto que bloquea el transporte de glucosa mediado tanto por GLUT1 como por GLUT4 (Estensen & Plagemann, 1972; Lever, 1979). En este caso, la incubación con Citocalasina B ($5 \mu\text{M}$) durante 15 minutos, restringió la captación de 2-NBDG inducida por FGF21 en las placas de cultivo de fibras aisladas (**Fig. 4A**). Por otra parte, para bloquear específicamente la actividad de los transportadores GLUT4, se utilizó Indinavir (Rudich et al., 2003). En esta ocasión, la presencia de Indinavir ($100 \mu\text{M}$) evitó la captación de 2-NBDG inducida por FGF21 (**Fig. 4B**).

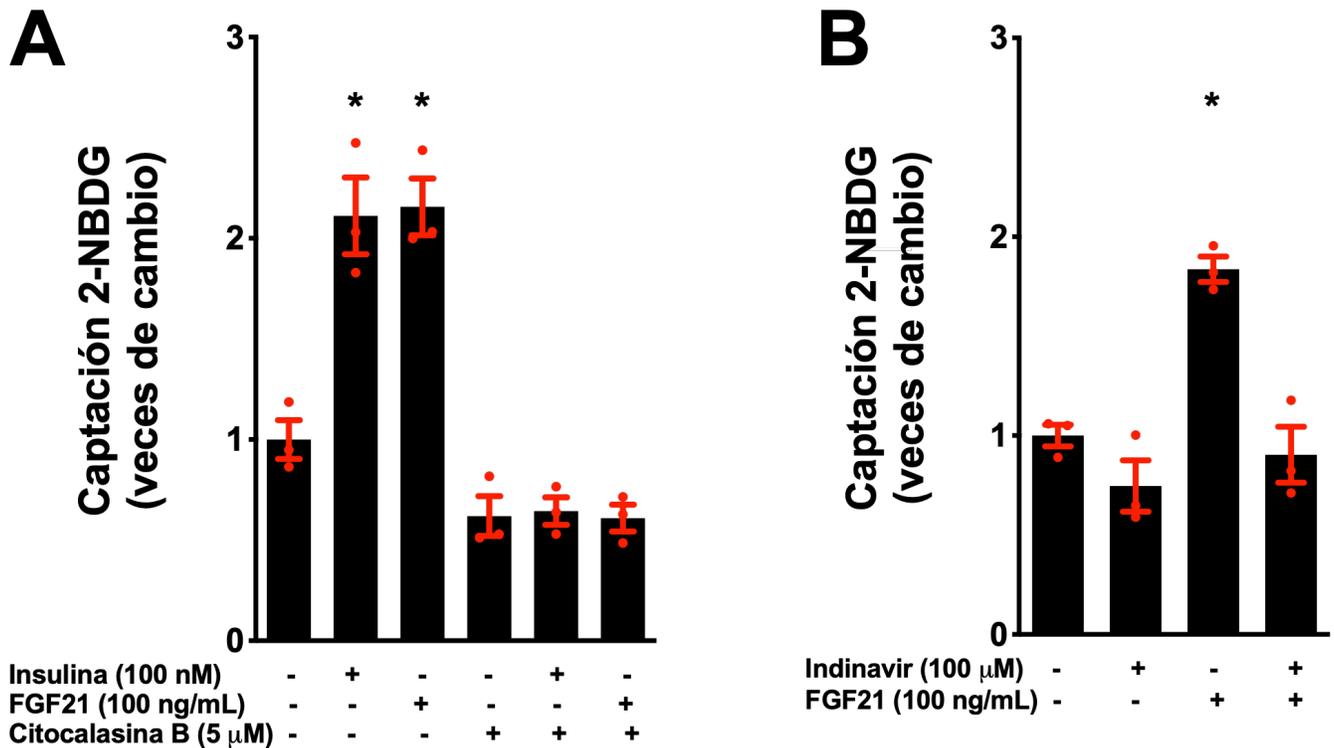


Figura 4. La captación de glucosa dependiente de FGF21 está mediada por la actividad GLUT4. Las placas de cultivo de fibras aisladas se incubaron durante 20 min con insulina (100 nM) o FGF21 como se indica, y posteriormente fueron cargadas durante 15 min con 2-NBDG (300 μ M) **A:** Citocalasina B (5 μ M) añadida a la solución de transporte en presencia de insulina o FGF21 (n = 3) **B:** Captación de 2-NBDG luego de la incubación durante 40 min con Indinavir (100 μ M) en presencia o ausencia de FGF21 (n = 3). Los valores son medias \pm SEM. * p < 0,05 vs basal. Prueba de ANOVA con post hoc de Dunnet . Los datos representan cultivos de fibras independientes provenientes de 3 o 6 animales.

FGF21 promueve la translocación de GLUT4myc-eGFP hacia la superficie celular

Para determinar el efecto de la exposición aguda a FGF21 sobre la translocación de vesículas que contienen GLUT4 hacia el sarcolema, se utilizaron muestras de músculo FDB de ratones sometidos a electroporación con un vector plasmidial que codifica para una proteína quimera GLUT4myc-eGFP como se mencionó en Materiales y Métodos (Contreras-Ferrat et al., 2010; Llanos et al., 2015; Osorio-Fuentealba et al., 2013). Este transportador posee un epítipo *myc* en la primera asa extracelular y está asociado a un eGFP en la región carboxilo terminal. Como

se muestra en la **Fig. 5**, tanto la insulina como FGF21 incrementan la presencia de *myc* en la región sarcolemal medida a través de inmunofluorescencia indirecta contra el epítipo *myc*. A su vez, se pudo observar una redistribución intracelular de la señal de eGFP (**Fig. 5A, C**). La razón de *myc/eGFP* se utilizó para estimar la proporción de GLUT4*myc*-eGFP presente en el exterior de la membrana, como una medida de la translocación de GLUT4. FGF21 aumentó la tasa de *myc/eGFP* en una cantidad similar a la insulina, alcanzando valores de $1,83 \pm 0,09$ y $2,08 \pm 0,06$ respectivamente sobre la condición no estimulada (**Fig. 5B**). Estos resultados permiten mostrar que la exposición aguda con FGF21 promueve la translocación de GLUT4 hacia el sarcolema de las fibras musculares aisladas.

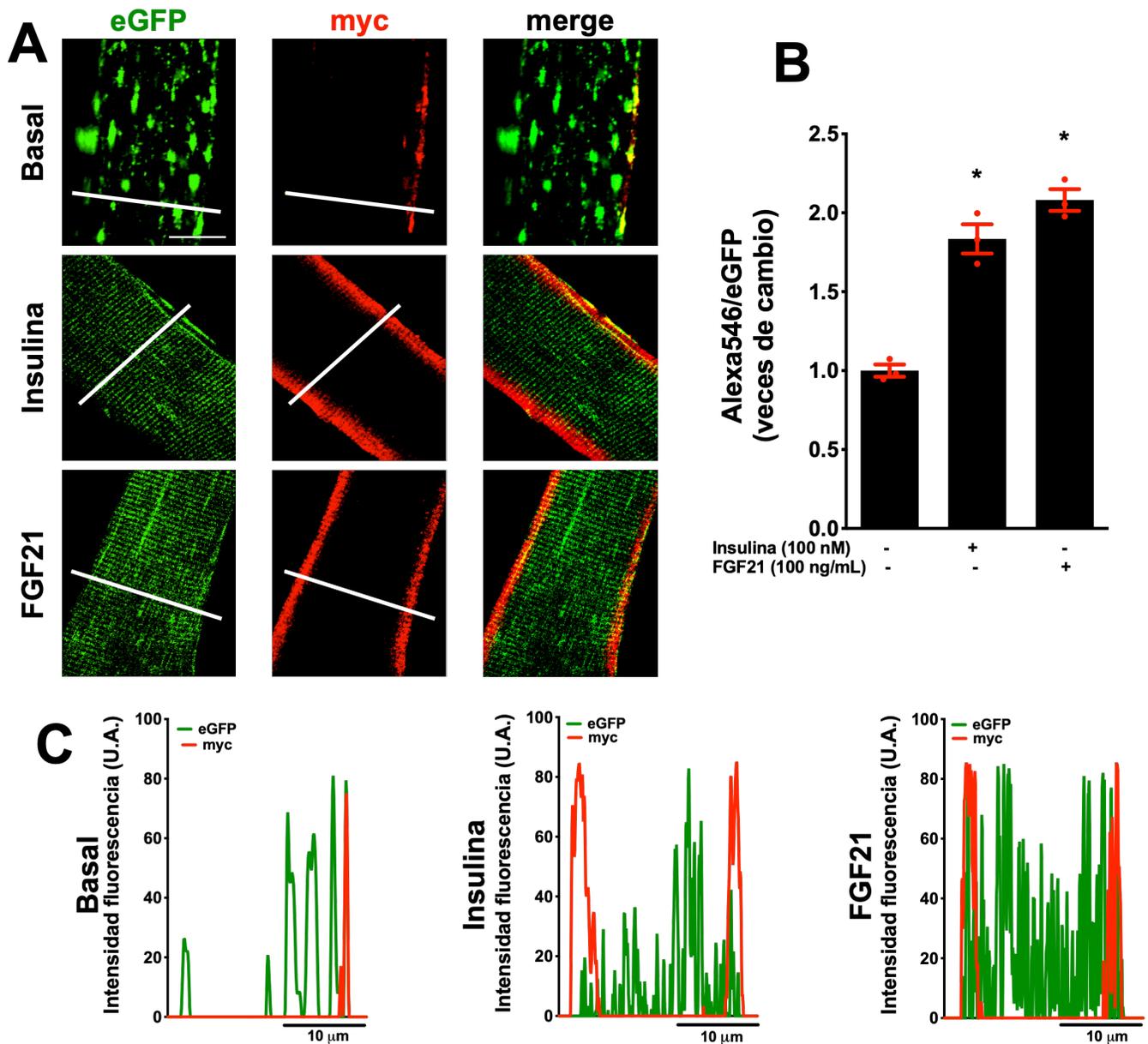


Figura 5. FGF21 promueve la translocación de GLUT4 a la superficie celular. A: Se realizaron imágenes confocales de un corte de sección medial (1 μm) en placas de cultivo de fibras de músculo FDB electroporadas con el ADNc que codifica la quimera GLUT4myc-eGFP. El epítipo *myc* se detectó con anticuerpo anti *myc* (1:300) en fibras no permeabilizadas; se utilizó Alexa Fluor anti-ratón 546 nm como anticuerpo secundario (1:600). Las fibras se estimularon con el haz láser de 546 nm y la emisión se recogió con el filtro de paso bajo de 560 nm. La sección quimera-eGFP se estimuló a 488 nm, y la luz emitida se recogió con un filtro paso bajo (500 a 530 nm). **B:** Cuantificación del panel A. **C:** Perfil de

línea del panel A. Datos de al menos 3 cultivos de fibras independientes de 3 animales separados. Escala de barra 20 μm . Los valores se muestran como la media de cultivos independientes \pm SEM. * $p < 0,05$ vs basal. Prueba de ANOVA con post hoc de Dunnet . Los datos representan cultivos de fibras independientes provenientes de 3 animales.

Baja concentración de FGF21, potencia el efecto de insulina cuando están presentes de manera simultánea.

Con la intención de determinar si existe un efecto sinérgico entre FGF21 e insulina, se incubaron placas del cultivo de fibras aisladas utilizando diferentes concentraciones (1 – 100 ng/mL) de FGF21 y se mantuvo una concentración específica de insulina (100 nM) simultáneamente (**Fig. 6**). Los resultados indican que la captación de 2-NBDG inducida por insulina, aumenta significativamente respecto a su condición basal ($1,78 \pm 0,05$) cuando se encuentra en presencia de una baja concentración (1 ng/ml) de FGF21 ($2,10 \pm 0,08$), lo que sugiere un efecto aditivo entre insulina y FGF21; sin embargo, la captación de 2-NBDG fue prevenida por completo cuando FGF21 está presente a concentraciones superiores (25 ng/ml o más).

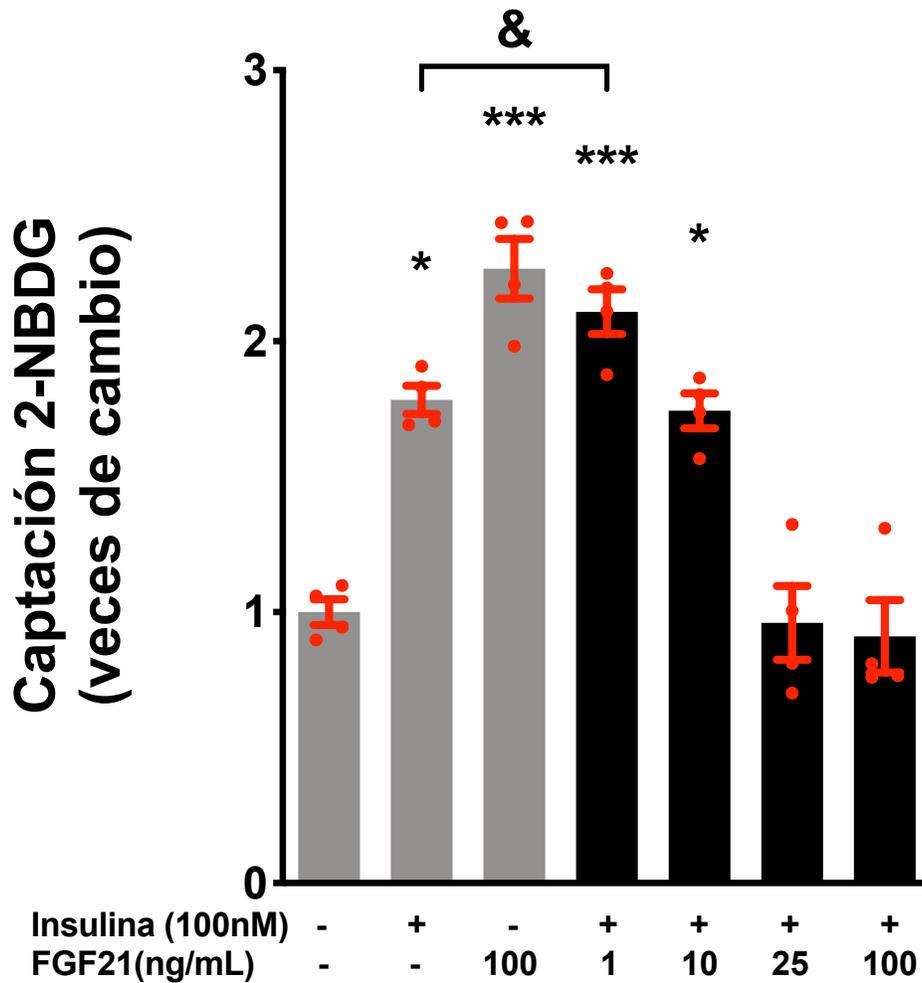


Figura 6. La captación de 2-NBDG se potencia a concentraciones bajas de FGF21 en presencia de insulina. Las placas de cultivo de fibras aisladas se incubaron durante 20 min con insulina (100 nM) o FGF21 como se indica, y posteriormente fueron cargadas durante 15 min con 2-NBDG (300 μ M). Incubación simultánea de insulina y FGF21 a las concentraciones indicadas (n = 4). Los valores son medias \pm SEM. *** p < 0,01; * p < 0,05 vs basal; & p < 0,05 vs Insulina. Prueba de ANOVA con post hoc de Dunnet . Los datos representan cultivos de fibras independientes provenientes de 4 animales.

La actividad de PI3K es requerida para aumentar la captación de 2-NBDG inducida por FGF21

Se ha establecido que la captación de glucosa inducida por insulina depende de la actividad de PI3K (Sanchez-Margalet, 1994). A su vez, esta vía de señalización ha sido implicada en funciones río abajo del receptor para FGF21 (Li et al., 2016). Para evaluar si la actividad de PI3K está involucrada en la captación de glucosa inducida por FGF21, se utilizó el inhibidor LY294002 (50 μ M). Esta herramienta farmacológica permite bloquear la actividad de la subunidad catalítica de PI3K (Gharbi et al., 2007). En nuestro caso, encontramos que la utilización de LY294002 previene la captación de 2-NBDG inducida tanto por insulina como por FGF21 (**Fig. 7A**).

Posteriormente, se evaluó la participación de Akt en la captación de 2-NBDG, mediante la utilización de un inhibidor farmacológico conocido como MK2206 (1 μ M), que evita el transporte de glucosa mediado por GLUT4 (Beg et al., 2017). Akt es una proteína se encuentran río abajo de PI3K y está involucrada en la ruta canónica de insulina, permitiendo el transporte de glucosa en las células musculares (Bryant et al., 2002). A través de esta estrategia experimental, se pudo determinar que los efectos inducidos por FGF21 sobre la captación de 2-NBDG son independientes de la participación de Akt (**Fig. 7B**).

Con la intención de corroborar los resultados anteriores, se evaluó la fosforilación de un blanco de PI3K como Akt^{Ser473}, además de la fosforilación de AS160^{Thr642}, un sustrato de Akt. Para esto, se utilizaron extractos homogeneizados de proteínas con muestras de músculo entero FDB que fueron tratados con insulina (100 nM) o FGF21 (100 ng/ml) durante 20 min. Mientras que insulina indujo la fosforilación de Akt^{Ser473}, FGF21 no mostró ningún efecto sobre este residuo ni tampoco sobre AS160^{Thr642} (**Fig. 7C-D**). Estos resultados nos permiten establecer que los efectos inducidos por FGF21 respecto a la captación de 2-NBDG son independientes de la participación de Akt.

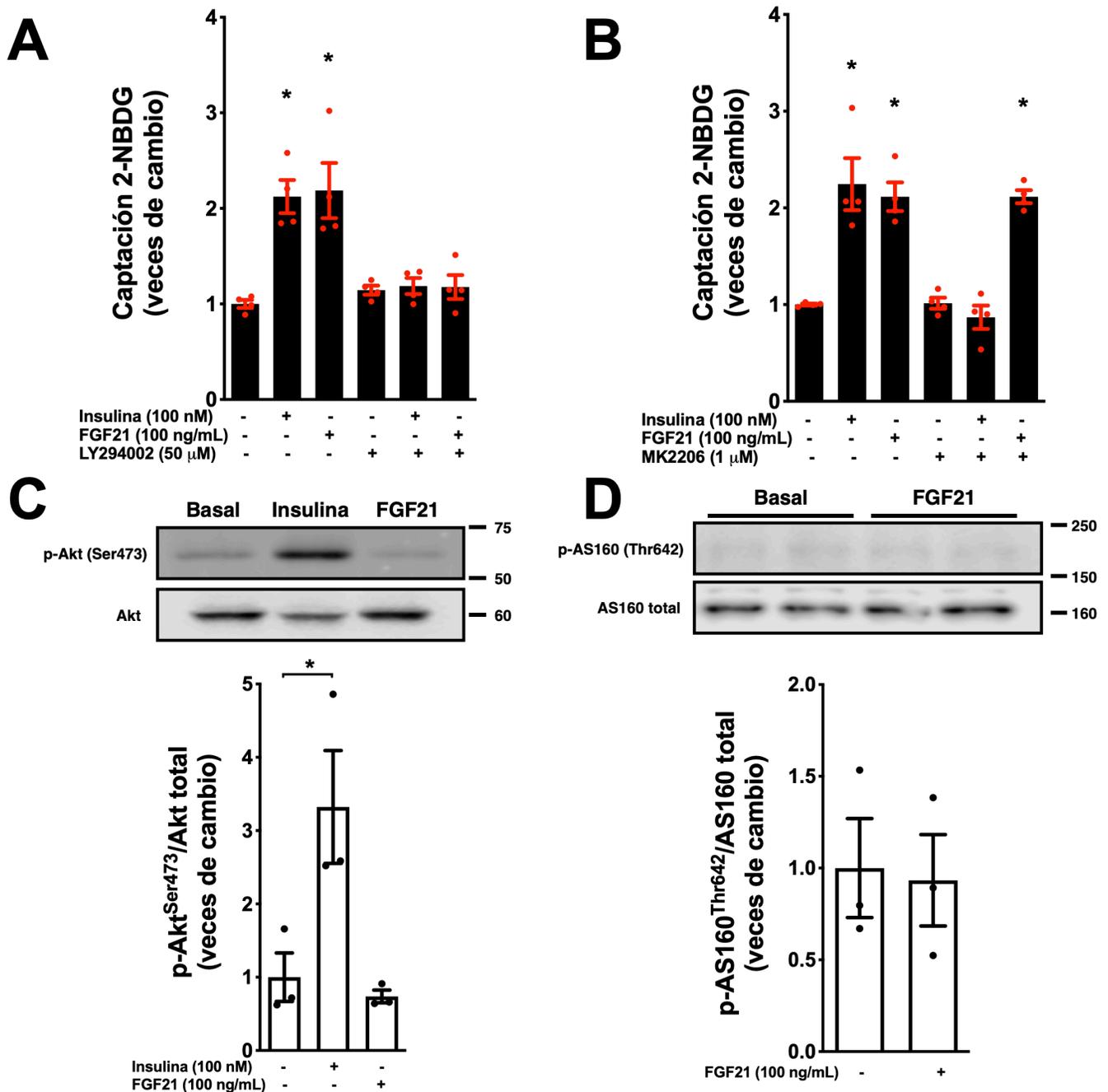


Figura 7. La captación de glucosa dependiente de FGF21 implica la actividad de PI3K, pero no de Akt. A-B: las placas de cultivo de fibras fueron previamente incubadas durante 30 min con LY294002 (50 μ M) o MK2205 (1 μ M) en presencia o ausencia de insulina o FGF21 (n = 4). C-D: *Western blot* representativo y cuantificación de p-Akt en Ser473 y p-AS160 en Thr642 en homogeneizado de muestras

de músculo FDB (n = 3). Los valores son medias \pm SEM. * $p < 0.05$ vs basal; Prueba de ANOVA con post hoc de Dunnett y *t de Welch*.

FGF21 ejerce sus efectos de manera independiente de la fosforilación de AMPK α^{Thr172}

Considerando que diversos estudios han mostrado la participación de AMPK como un importante regulador en el metabolismo de la glucosa (Kjøbsted et al., 2019; Mu et al., 2001; Sakoda et al., 2002) se decidió explorar si FGF21 podría estar promoviendo un incremento en el transporte de glucosa mediante la fosforilación de AMPK α^{Thr172} , este residuo es el principal sitio de regulación de la actividad de AMPK (Stein et al., 2000).

Se incubó FGF21 durante 20 minutos en las placas de cultivo de fibras aisladas que posteriormente fueron cargadas con 2-NBDG. Al analizar la fluorescencia relativa en las placas estimuladas, no se encontró ningún efecto respecto a la utilización de FGF21 (**Fig. 8A-B**). En función de estos resultados se descarta que una posible vía fuera mediada por AMPK; además, varios de los estudios que fueron revisados relacionaban la participación AMPK en la captación de glucosa, pero en respuesta a un estímulo contráctil o relacionado con el ejercicio físico (Hoffman et al., 2015; Jensen et al., 2014; Mu et al., 2001; Nelson et al., 2019).

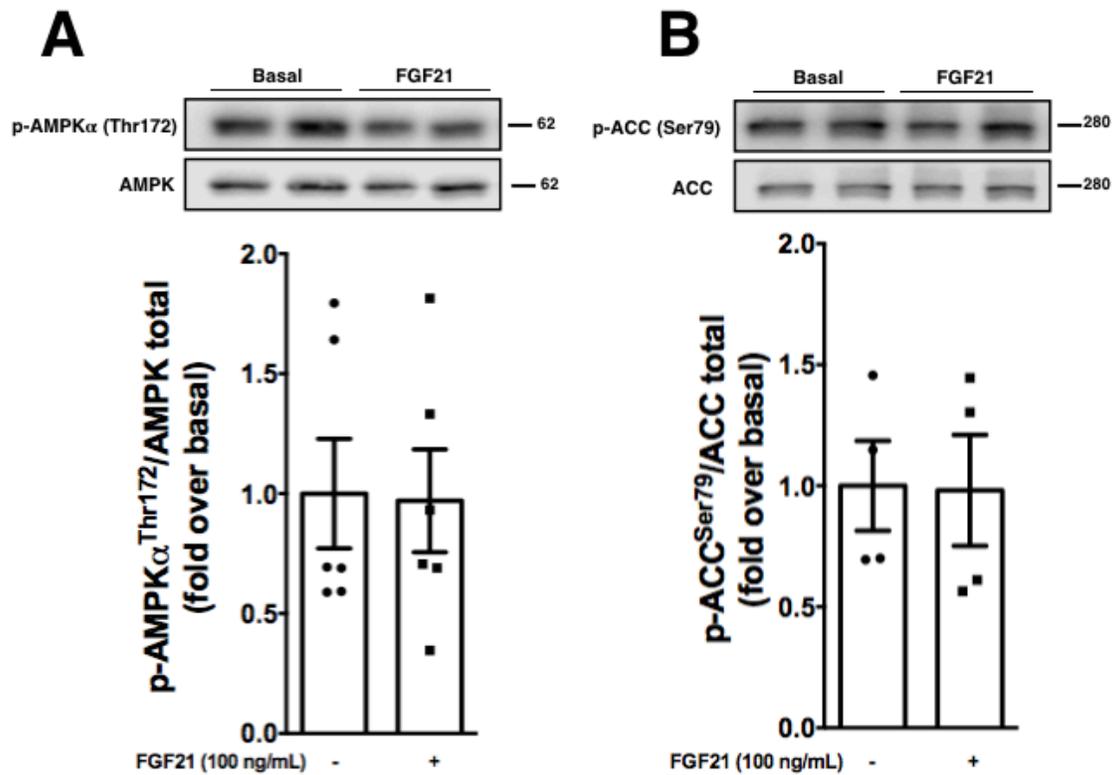


Fig. 8. La captación de glucosa inducida por FGF21 es independiente de la fosforilación de **AMPK α ^{Thr172}**. **A-B:** *Western blot* representativo y cuantificación de p-AMPK en Thr172 (n = 6) y p-ACC (n = 4) en Ser79 en homogeneizado de muestras de músculo FDB. Los valores son medias \pm SEM. Prueba de *t de Welch*.

El efecto de FGF21 sobre el transporte de 2-NBDG es independiente de la fosforilación del INSR y de quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2)

Se ha descrito que la activación de FGFR1 puede involucrar la vía proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Donate-Correa et al., 2016; Gotoh et al., 2004), la cual involucra también la señalización mediada por insulina a través de la activación de INSR (Bedinger & Adams, 2015; Boucher et al., 2014). Para determinar si el efecto de FGF21 involucra la participación de INSR, se analizó la fosforilación de IR^{Tyr1150/1151}. Utilizamos extractos proteicos de muestras de músculos FDB de ratón tratados con FGF21 (100 ng/mL). Al comparar estos resultados con nuestra condición basal, no hubo ninguna diferencia (**Fig. 9A**).

Se exploró la vía MAPK a través de la fosforilación de ERK1/2 utilizando el tratamiento con FGF21. Los resultados muestran que no hay fosforilación de ERK1/2^{Thr202/Tyr204} a través de la estimulación con FGF21 (**Fig. 9B**). Estos resultados, nos permite determinar que el efecto inducido por FGF21 sobre la captación de 2-NBDG es independiente de estas rutas de señalización.

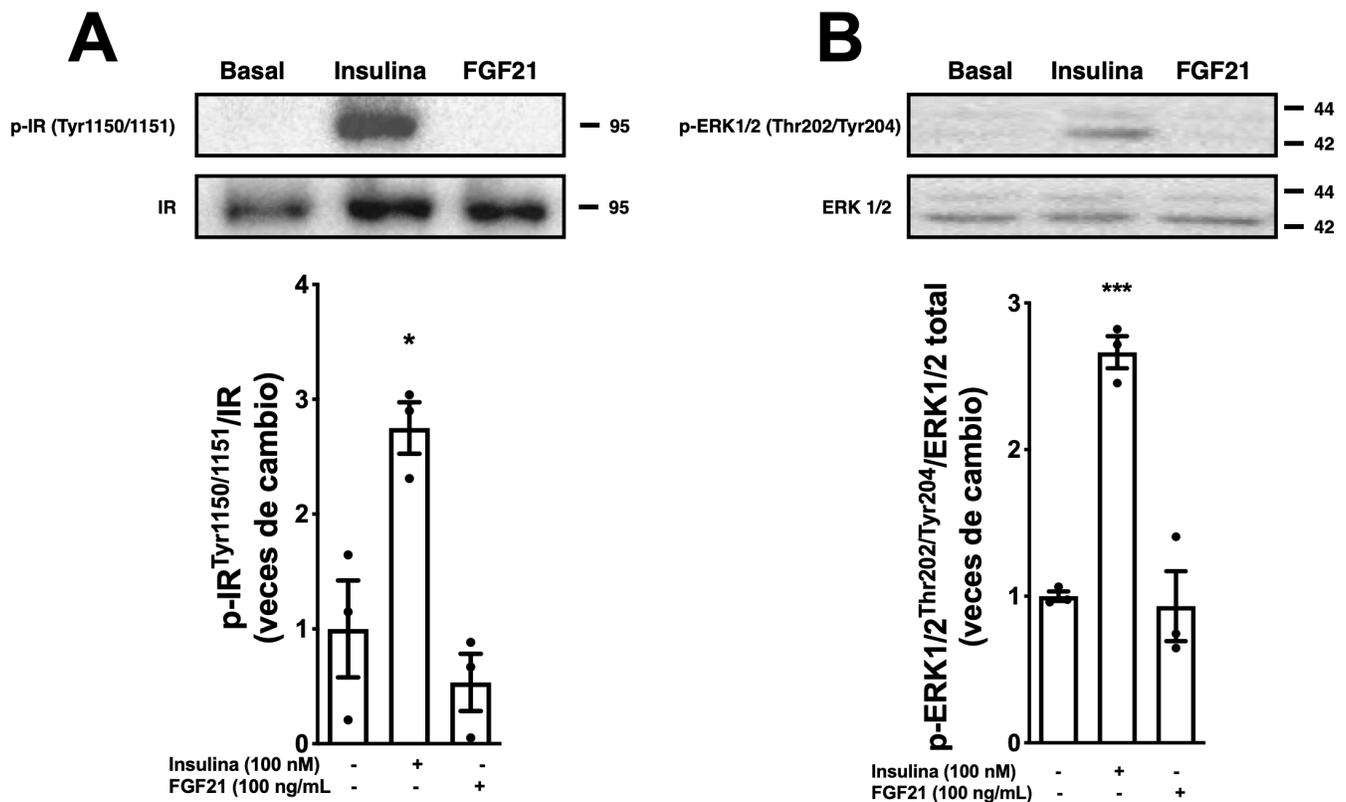


Figura 9. Los efectos de FGF21 sobre la captación de glucosa son independientes de la fosforilación de INSR y ERK1/2. **A-B:** *Western blot* representativo y cuantificación de p-IR en Tyr1150/1151 (n = 3) y p-ERK1/2 en Thr202/Tyr204 (n = 3) en homogeneizado de muestras de músculo FDB. Los valores son medias \pm SEM. *** p < 0,01; * p < 0,05 vs basal; Prueba de ANOVA con post hoc de Dunnet .

PKC- ζ está involucrada en el efecto de FGF21 sobre la captación de 2-NBDG

Se ha descrito que la familia de las proteínas quinasas C atípicas (aPKCs) que incluyen las isoformas λ y ζ participan en la captación de glucosa en el músculo esquelético (Braiman et al., 2001; Farese et al., 2007) y además, su participación es promovida por mecanismos que involucran la participación de PI3K dependiente de la acción de la insulina (Kanzaki et al., 2004).

Para determinar si la familia de PKCs está involucrada en la señalización río debajo de FGF21, se utilizó BIM I (2.5 μ M) como inhibidor de amplio espectro de las PKCs (Toullec et al., 1991) y Gö6976 (1 μ M) un inhibidor de las isoformas PKCs clásicas (Martiny-Baron et al., 1993). Los cultivos de fibras aisladas se incubaron con ambos inhibidores, BIM I o Gö6976 en ausencia o presencia de FGF21.

BIM I en presencia de FGF21 redujo la captación de 2-NBDG en un 56,8% ($1,38 \pm 0,12$) comparado con el efecto provocado por FGF21 ($1,88 \pm 0,04$) en las fibras aisladas (**Fig. 10A**). Sin embargo, Gö6976 no tuvo ningún efecto sobre la captación de 2-NBDG inducida por FGF21 (**Fig. 10B**). Este resultado, permite pensar que existe un efecto de FGF21 que es independiente de las PKC clásicas (aquellas activadas por calcio, diacilglicerol y fosfatidilserina); y que requiere una aPKC.

Para poder determinar la participación PKC- ζ en la captación de 2-NBDG, se utilizó un inhibidor específico conocido como pseudo-sustrato de PKC- ζ (pPKC- ζ) (Tocris Biosciences, Bristol, Reino Unido), que inhibe el transporte de glucosa estimulado por insulina (Bandyopadhyay et al., 1997; Kanzaki et al., 2004). La incubación con pPKC- ζ (100 nM) evitó completamente la captación de glucosa inducida por FGF21 (100 ng/mL) (**Fig. 10C**). Teniendo en cuenta lo anterior y en función de los resultados, se puede sugerir que la captación de glucosa dependiente de FGF21 requiere una PKC- ζ funcional.

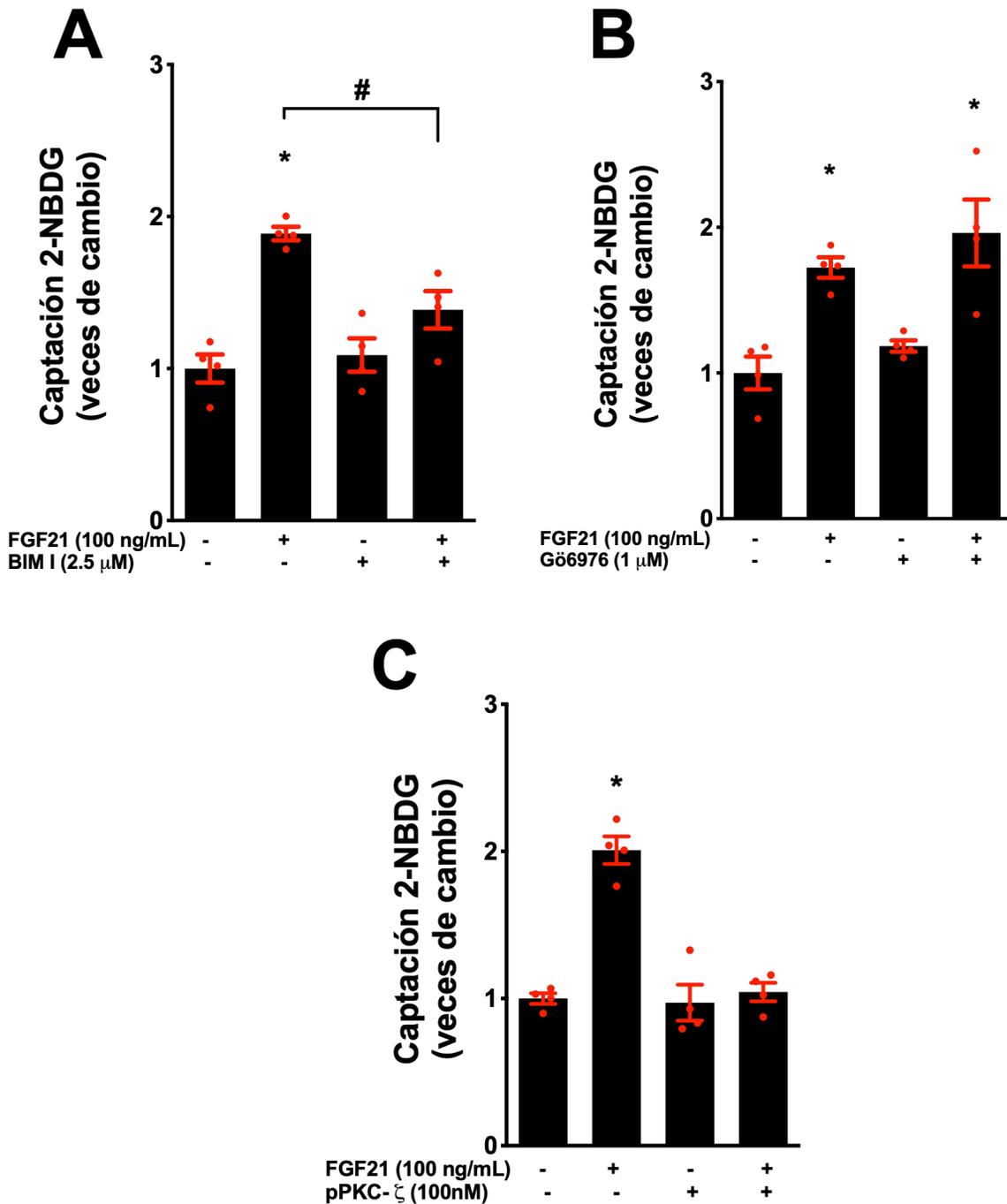


Figura 10. La captación de 2-NBDG inducida por FGF21 requiere de PKC-ζ. A-C: Las placas de cultivo de fibras aisladas fueron previamente tratadas durante 30 min con BIM I (2,5 μM), Gö6976 (1 μM) o pPKC-ζ (100 nM) en presencia o ausencia de FGF21 (n = 4). Los valores se muestran como la media de cultivos independientes ± SEM. * p < 0,05, vs basal; # p < 0,05 vs FGF21. Prueba de ANOVA con post hoc de Dunnet . Los datos representan cultivos de fibras independientes provenientes de 4 animales.

Ratones alimentados con HFD durante ocho semanas presentan resistencia a la insulina

Para poder estudiar variables relacionadas al peso y el estado metabólico en ratones, se utilizaron dos grupos de animales, uno alimentados con una dieta normal (NCD) y el otro grupo alimentados con una dieta alta en grasas (HFD) durante 8 semanas (De Wilde et al., 2010). Los animales que fueron alimentados con una dieta HFD, presentaron diferencias en el peso corporal en relación con los animales alimentados con una dieta NCD, en promedio $35,78 \pm 2,49$ y $24 \pm 0,91$ gramos respectivamente (**Fig. 10A**). Además, mostraron intolerancia a la glucosa cuando se les administró de manera intraperitoneal una carga de glucosa equivalente a 2 g/kg, reflejando un incremento de un 49% respecto al área bajo la curva en relación con los animales alimentados con NCD (**Fig. 11B**); también presentaron un incremento en la insulinemia en condiciones de ayuno $14,53 \pm 2,26$ y $4,53 \pm 0,97$ $\mu\text{U/mL}$ respectivamente (**Fig. 11C**). Por otra parte, para poder determinar si los ratones presentaban resistencia a la insulina, utilizamos el índice HOMA-IR (modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina) considerado para el modelo animal como: $\text{HOMA-IR} = [\text{glucosa (mmol/L)}] \times [\text{insulina (mU/L}^{-1})] / 14.1$ (Van Dijk et al., 2013). En este caso, los animales alimentados con HFD presentan un incremento en el valor promedio del HOMA-IR de $4,87 \pm 0,51$ veces más que los animales alimentados con NCD (**Fig. 11D**).

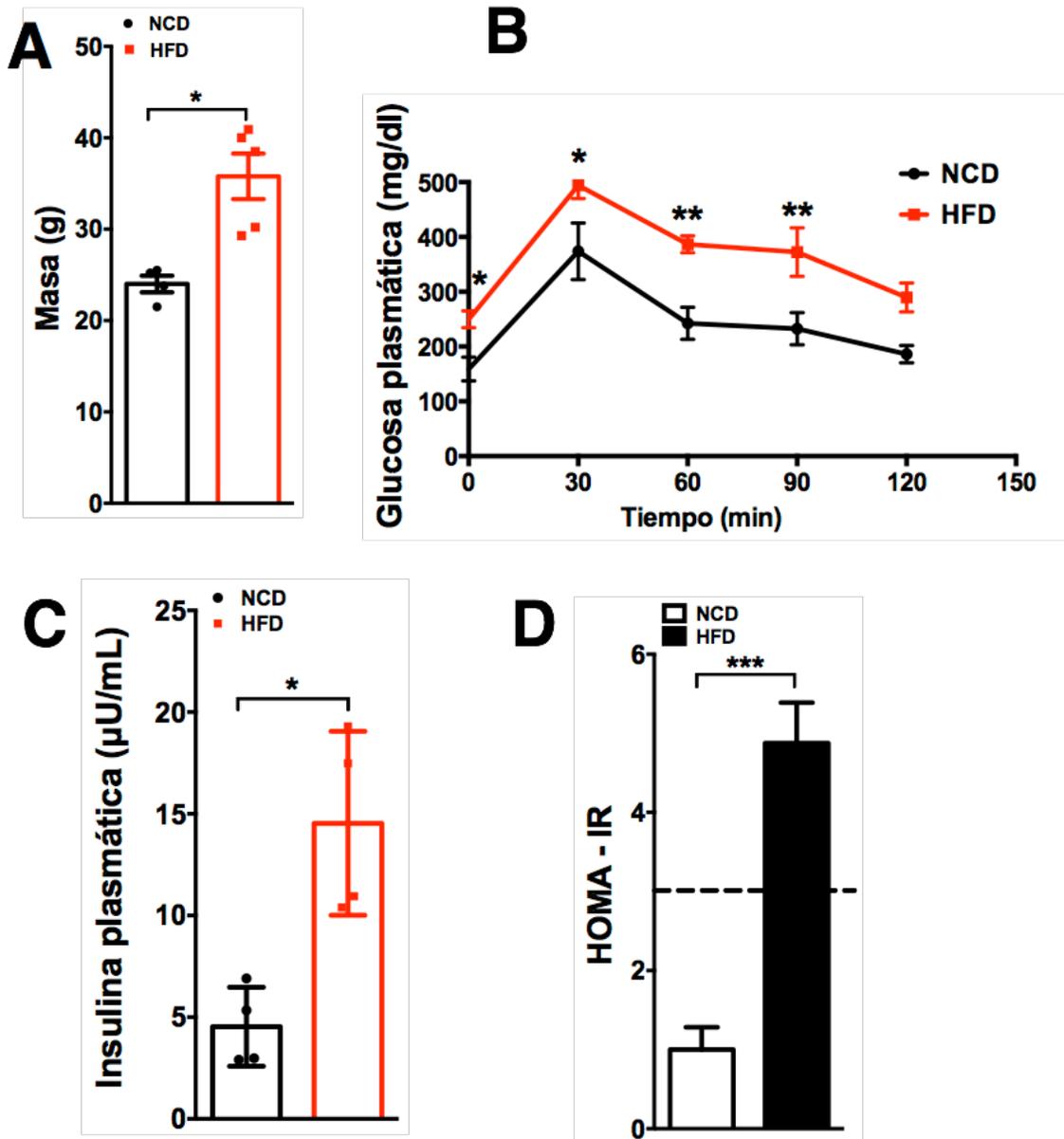


Figura 11. Alteraciones en el peso corporal y estado metabólico en ratones alimentados con HFD. **A:** Animales HFD (n= 5) muestran un incremento en el peso en relación a los NCD (n= 4). **B:** Prueba de tolerancia a la glucosa (n= 4 animales NCD – 5 animales HFD). **C:** Concentración plasmática de insulina en ayuno en NCD y HFD (n= 4 animales NCD – 4 animales HFD). **D:** HOMA-IR en animales alimentados con NCD (n = 4) y HFD (n = 4). Los valores se muestran como media \pm SEM; *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs NCD. Prueba de *t de Welch*.

FGF21 aumenta la captación de 2-NBDG en fibras aisladas provenientes de animales alimentados con HFD

Para evaluar el efecto agudo de FGF21 sobre la captación de glucosa en el modelo HFD, medimos la captación de 2-NBDG en cultivo de fibras aisladas obtenidas de ratones alimentados con dieta NCD y HFD durante 8 semanas. Las fibras fueron incubadas con insulina (100 nM) o FGF21 (100 ng/mL). En este caso, los ratones alimentados con HFD presentan insensibilidad a la insulina sin mostrar efectos sobre la captación de 2-NBDG; sin embargo, al ser estimuladas con FGF21, muestran un incremento significativo ($1,41 \pm 0,09$) en la captación de 2-NBDG respecto a su condición basal (**Fig. 12A**).

Ha sido descrito que KLB es requerido para inducir las respuestas agudas de FGF21 (Ding et al., 2012) y que en una condición de obesidad esta proteína se ve disminuida en el tejido adiposo blanco (Markan et al., 2017). Para poder comparar la abundancia relativa tanto de FGFR1 como KLB, utilizamos extractos proteicos de muestras de músculos EDL de animales alimentados con dieta NCD y HFD (**Fig. 12B-C**). Los resultados obtenidos, muestran que no existen diferencias en los niveles proteicos de FGFR1 ni de KLB en músculo esquelético de animales alimentados con dieta NCD o HFD.

En su conjunto, estos resultados sugieren que hay un incremento en la captación de 2-NBDG inducido por FGF21 en fibras musculares aisladas de animales alimentados con dieta HFD y en comparación con fibras aisladas provenientes de animales alimentados con dieta NCD se reduce este efecto en un 30,5%. Además, los mecanismos por los cuales se ve atenuada la captación de glucosa como consecuencia de una dieta HFD, son independientes de los niveles proteicos de FGFR1 o su cofactor KLB.

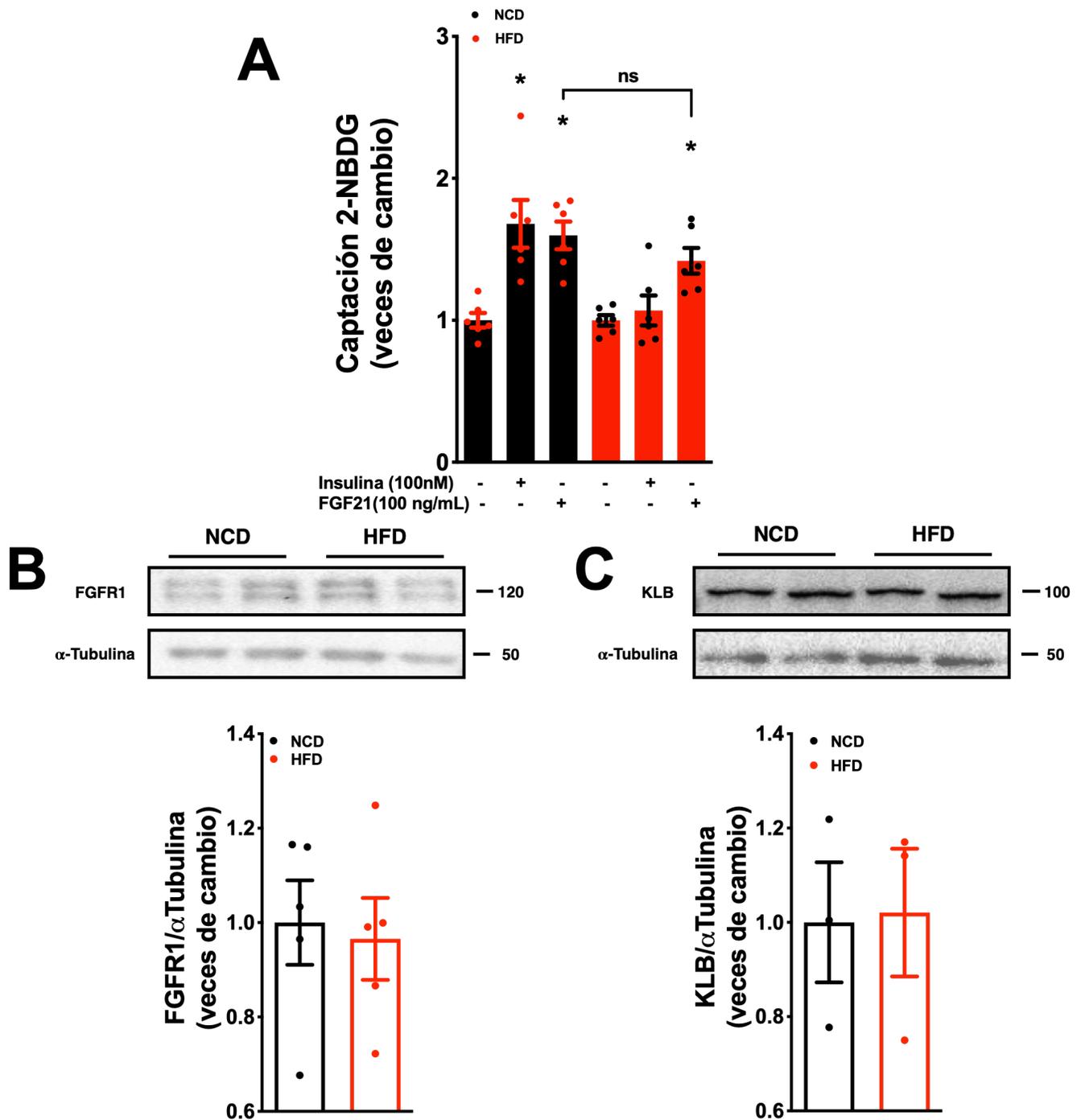


Figura 12. FGF21 promueve la captación de glucosa en fibras aisladas proveniente de animales alimentados con dieta HFD, sin presentar diferencias respecto a los niveles de FGFR1 y KLB. A: Las fibras aisladas fueron incubadas durante 20 min con insulina (100 nM) o FGF21 (100 ng/mL), y luego

cargadas 15 min con 2-NBDG (300 μ M) (n= 6 animales NCD; barras negras – 6 animales HFD; barras rojas). **B-C:** *Western blot* representativo y cuantificación de la abundancia relativa de FGFR1 (n = 5 NCD – n = 5 HFD) y KLB (n = 3 NCD – n = 3 HFD) de muestras homogeneizadas de músculo EDL recolectadas de ratones alimentados con NCD y HFD. Los valores se muestran como media \pm SEM; * $p < 0,05$ vs basal NCD; ns: no significativo. Prueba de ANOVA con post hoc de Dunnet y *t de Welch*.

DISCUSIÓN

El presente trabajo proporciona la primera evidencia de los mecanismos asociados a la captación de glucosa inducida por FGF21 en fibras musculares esqueléticas adultas. Encontramos que FGF21 promueve el transporte de glucosa mediado por GLUT4 por un mecanismo dependiente de PKC atípicas. En relación a nuestros resultados, estos efectos ocurren de manera aguda y no podemos descartar que exista un efecto que se potencia de manera aditiva cuando están presentes de manera simultánea FGF21 e insulina y que pueden estar involucrados tanto en la captación de glucosa como en la translocación de GLUT4 .

Estudios anteriores, han demostrado tanto en ratones como en humanos, un aumento en los niveles circulantes de FGF21 después del ejercicio físico continuo (≥ 1 h) (Hansen et al., 2015; Tanimura et al., 2016). La magnitud de este incremento comparado a una condición de reposo en ratones (Tanimura et al., 2016) y en humanos (Hansen et al., 2015) es de ~ 2 y ~ 4 veces, respectivamente. Otro estudio, ha mostrado que la realización de una sola serie de ejercicio físico continuo (60 min) coincide con un incremento en los niveles séricos de FGF21, acompañado de una disminución significativa de los niveles de glucosa en ratones (Kim et al., 2013). Resultados en humanos no muestran un efecto similar con la realización de ejercicio agudo, pero si se evidencia un incremento en los niveles de FGF21 en suero, luego de un programa de ejercicios realizado durante dos semanas (Cuevas-Ramos et al., 2012). Si bien el ejercicio físico o la actividad contráctil del músculo promueven la captación de glucosa, a la fecha no se le ha atribuido un papel a FGF21 sobre esta acción; no obstante, este trabajo es el primer estudio que demuestra un mecanismo asociado a FGF21 sobre el transporte de glucosa en fibras aisladas de músculo esquelético.

Por otro lado, se ha reportado en humanos que durante tres días de consumo de una dieta hipercalórica basada en hidratos de carbono (CHO, 80%), se incrementan de manera significativa los niveles plasmáticos de FGF21 comparada con una dieta control eucalórica (CON). Este aumento de FGF21 fue correlacionado con un incremento en la captación de glucosa en los músculos de las piernas, la cual se calculó en relación a la diferencia

arteriovenosa respecto a los sujetos que consumieron la dieta CHO ($r = 0,88$) (Lundsgaard et al., 2016). Es importante tener en cuenta que las concentraciones utilizadas en nuestro modelo son en su mayoría supra fisiológicas, excepto la concentración más baja (1 ng/mL), la cual en modelo murino se ha evidenciado que en condiciones de ayuno o postprandial se pueden incrementar los niveles plasmáticos de FGF21 hasta $\sim 2,5$ ng/mL (Markan et al., 2014). Sin embargo, es interesante especular que, aunque las variaciones fisiológicas podrían ser más bajas a nivel plasmático, no sabemos la concentración que puede existir de manera local, en las inmediaciones de la fibra muscular o en el espacio muy restringido de los túbulos transversales.

Estudios anteriores, han demostrado que la incubación con FGF21 (1 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h, aumenta la captación de glucosa en cultivos de miotubos humanos; sin embargo, la incubación de los músculos del ratón extensor largo de los dedos (EDL) de ratón durante 6 h no muestra diferencias respecto a una condición basal (Mashili et al., 2011). Es importante tener en cuenta que podría haber diferencias con respecto a las características intrínsecas de los músculos utilizados, las concentraciones del péptido y la inestabilidad debido a la susceptibilidad proteolítica que presenta esta molécula (Coskun et al., 2008; Kharitononkov et al., 2007). Esto hace pensar que la exposición por tiempos más breves en presencia de FGF21, permitirían detectar un efecto sobre la captación de glucosa en condiciones fisiológicas. En modelo murino, se ha descrito que posterior a una ingesta de comida los niveles de FGF21 se encuentran elevados ($\sim 2,5$ ng/mL) y coincide con un incremento en los niveles circulantes de insulina, lo que favorece la captación de glucosa en respuesta a insulina (Markan et al., 2014). Sin embargo, el mecanismo por el cual FGF21 promueve la translocación de GLUT4 a la superficie celular y el aumento posterior en el transporte de glucosa sigue siendo desconocido. Entender este mecanismo podría ayudar a explicar el efecto de FGF21 como sensibilizante de insulina en un contexto fisiológico postprandial. Nuestros resultados sugieren que FGF21 promueve el transporte de glucosa mediada por GLUT4 a través de un mecanismo dependiente de PKC atípicas.

En un modelo de adipocitos, así como en una línea celular de preadipocitos como 3T3-L1, se ha demostrado que FGF21 aumenta el transporte de glucosa mediante un mecanismo que incluye un aumento en la expresión de GLUT1 (Donate-Correa et al., 2016; Kharitonov et al., 2005). Los estudios que se han realizado en músculo esquelético respecto al efecto de FGF21 mediante una incubación prolongada (6 h), no muestran diferencias en la expresión, ni en la abundancia proteica de GLUT1 ni tampoco de GLUT4. Tampoco reflejan cambios en la señalización intracelular considerando la fosforilación de Akt^{Ser473}, TBCD1/4 o ERK1/2 comparado con el efecto provocado por insulina (Mashili et al., 2011). Estos resultados coinciden con los nuestros (Fig. 7C-D y 9B); sin embargo, no se ha descrito en el músculo esquelético una vía alternativa que converge río debajo de FGF21 y que esté involucrada en la translocación de GLUT4 y la captación de glucosa. Nosotros medimos los efectos de FGF21 sobre la actividad GLUT4 y su translocación; para esto, utilizamos inhibidores farmacológicos que nos permitieron determinar que en el músculo esquelético, la captación de glucosa depende de la actividad de GLUT4. Además, el uso de GLUT4^{myc}-eGFP nos permitió determinar que una incubación aguda de FGF21 redistribuye las vesículas que contienen GLUT4 hacia los túbulos transversales y el sarcolema.

En diversos tejidos, el transporte de glucosa está mediado por la acción de la insulina que juega un papel fisiológico importante en el metabolismo y la homeostasis de la glucosa (Olson, 2012). La señalización mediada por insulina implica principalmente el tráfico de vesículas intracelulares que contienen GLUT4 para promover su translocación a la superficie celular (He et al., 2007). Dentro de la señalización canónica río abajo de la insulina, se identificó la vía PI3K (Kanzaki & Pessin, 2003; Tengholm & Meyer, 2002), que involucra la fosforilación de proteínas del sustrato receptor de insulina (IRS) y las posteriores activaciones de la quinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK1) y Akt (He et al., 2007). Es interesante que, a pesar de que la insulina puede promover numerosas vías de señalización, parece que la activación de PI3K es suficiente para aumentar la translocación de GLUT4 hacia la superficie celular (Martin et al., 1996). Por otro lado, se ha demostrado la expresión de KLB y FGFR1 en el músculo esquelético (Benoit et al., 2017), que al activarse ejerce su señalización intracelular mediante FGFR1 y recluta una proteína adaptadora conocida como FRS2 α que promueve la participación de cascadas de

señalización intracelular; incluyendo la vía PI3K (Li et al., 2016). Experimentos realizados en miotubos coinciden en que es necesario reclutar PI3K para promover la translocación de GLUT4 (Osorio-Fuentealba et al., 2013). Nuestros resultados muestran que las vías de señalización río abajo de FGF21 también dependen de la actividad de PI3K, y que cuando se bloquea esta quinasa, se evita la captación de glucosa.

La activación de Akt es esencial para mediar la señalización de insulina y la consiguiente redistribución de GLUT4 (Welsh et al., 2005). Además, la activación de Akt depende de dos eventos de fosforilación, uno en el Thr308 y el otro en Ser473. Ambas fosforilaciones son necesarias para obtener la máxima actividad de la enzima Akt (Czech & Corvera, 1999). La proteína Akt está presente en tres isoformas y es principalmente Akt2 la que contribuye a la externalización de GLUT4 (Garofalo et al., 2003; Zhou et al., 2004). En las células del músculo esquelético, la fosforilación posterior de PI3K y de Akt en Ser473 es necesaria para la incorporación de la glucosa por mecanismos dependientes de la insulina (Bryant et al., 2002). En el presente trabajo, mostramos que puede haber una activación de PI3K, sin existir una fosforilación de Akt en el residuo Ser473 tras el tratamiento con FGF21. Esto indica, que la captación de glucosa inducida por FGF21 es independiente de la activación de Akt. Por otro lado, se ha descrito que la activación de PKC- ζ puede participar como un regulador negativo de Akt mediante la fosforilación del residuo Thr34 y puede restringir de manera importante la captación de glucosa inducida por insulina (D. Powell et al., 2003; D. J. Powell et al., 2004). Próximos estudios nos permitirán dilucidar si esta vía está involucrada en la inhibición de la captación de glucosa en el músculo esquelético en respuesta a insulina cuando están presentes de manera simultánea con FGF21.

Un posible mecanismo en el transporte de glucosa independiente de la fosforilación de Akt, involucra la participación de PKC- ζ/λ . En este caso, PKC- ζ/λ podría estar involucrada en el transporte de glucosa y ha sido descrito tanto en los adipocitos como en el músculo esquelético que su activación depende de la activación de PI3K (Kanzaki et al., 2004; Liu et al., 2006). Otros estudios, han demostrado que en presencia de insulina, la actividad de PKC es necesaria para promover la translocación de GLUT4 hacia la membrana celular (Briman et al., 2001; Farese

et al., 2007). Por otra parte, estos efectos no se han manifestado bajo condiciones en las que está presente la actividad contráctil muscular (Yu et al., 2015). Nuestros resultados han demostrado que el uso de inhibidores farmacológicos de amplio espectro de las familias de PKC previenen de manera parcial la captación de glucosa, y a su vez, esta inhibición no se observa cuando se usan inhibidores específicos para la familia clásica de PKCs. Sin embargo, cuando utilizamos un inhibidor específico para bloquear la actividad de PKC- ζ , la captación de glucosa fue inhibida.

Nuestros hallazgos sugieren un mecanismo no descrito anteriormente por el cual FGF21 estaría aumentando el transporte de glucosa por una vía independiente de la señalización canónica de insulina. Esta situación podría estar dada en un contexto de requerimiento energético, como puede ser posterior a una serie de ejercicio físico (Tanimura et al., 2016) o al pasar de una condición de ayuno a un estado postprandial (Markan et al., 2014) situación en las que se aumentan los niveles de FGF21. Al ser un mecanismo independiente de Akt, no se descarta que en presencia de insulina pueda haber un efecto aditivo sobre la captación de glucosa cuando FGF21 está presente en bajas concentraciones. En nuestro caso, FGF21 está involucrado en la translocación de GLUT4 utilizando una ruta dependiente de la actividad de PI3K a través de un efecto mediado por la activación de una α PKC. Sin embargo, cabe destacar que a altas concentraciones de FGF21 (> 25 ng/mL) aparece un efecto de bloqueo, que sugiere que existan efectos inhibitorios cruzados en ambas vías y estarían presentes en el modelo de fibras aisladas (**ver Fig. 6**). Por otro lado, hemos visto que si mantenemos las concentraciones de FGF21 (100 ng/mL) y reducimos la concentración de insulina (50 nM), el efecto en la captación de glucosa aumenta significativamente (datos no mostrados). Aunque estas concentraciones continúan siendo suprafisiológicas, parecería que, en nuestro modelo, la sensibilidad de las fibras musculares para captar glucosa aumenta cuando se reduce la concentración de insulina. Para determinar estos mecanismos, se requieren más estudios que nos permitan discriminar las vías de señalización que pueden ser redundantes para la captación de glucosa en el músculo esquelético. Otros estudios han demostrado que la participación de PKC es necesaria para incrementar el transporte de glucosa por vías independientes de la señalización de Akt (Balendran et al., 2000; Bandyopadhyay et al., 1997; Martin et al., 1996),

en este caso, la sobreexpresión de PKC- ζ en miotubos maduros ha mostrado ser un elemento importante en el transporte de glucosa, ya que incrementa la translocación de GLUT4 (Braiman et al., 2001).

Se ha propuesto que los efectos agudos de FGF21 como la captación de glucosa o la sensibilidad a insulina son dependientes del patrón de expresión de FGFR y KLB presentes principalmente en hígado y tejido adiposo (Xu et al., 2009). En este sentido, un papel importante depende de la acción directa de FGF21 sobre el tejido adiposo blanco y pardo (BonDurant et al., 2017; Ding et al., 2012; Lan et al., 2017). Sin embargo, el tejido adiposo representa una fracción menor comparado con el músculo esquelético respecto a la captación de glucosa mediada por insulina (~ 75 %) (Baron et al., 1988). En relación a esto último, nuestro trabajo se centra en la captación de glucosa específicamente en las fibras musculares; que también pueden sintetizar FGF21 y donde la captación de glucosa dependiente de la acción de la insulina tiene un papel crucial en la homeostasis de la glucosa.

Estos hallazgos, nos permiten hipotetizar los efectos auto/paracrinos de FGF21, como una molécula secretada por las fibras aisladas de músculo esquelético (Arias-Calderon, 2019) y que podría ejercer efectos sobre la captación de glucosa por mecanismos independientes de la acción de la insulina en un contexto de requerimiento energético a nivel celular como puede ser en condición postprandial o posterior a una sesión de ejercicio. Este último, ha sido reportado como un estímulo fisiológico que regula la expresión de FGF21 en el músculo esquelético (Cuevas-Ramos et al., 2012; Keihanian et al., 2019; Tanimura et al., 2016). Por otra parte, se ha podido determinar que el estímulo eléctrico en fibras aisladas de músculo esquelético incrementa los niveles de ATP extracelular (Jorquera et al., 2013) y a su vez, en cultivos de fibras aisladas la estimulación exógena con ATP (3 μ M), regula la expresión, síntesis y secreción de FGF21 a nivel muscular (Arias-Calderon, 2019). No podemos descartar, que en condiciones de ejercicio físico donde se ha demostrado que los niveles de insulina se ven reducidos a nivel plasmático (Watt et al., 2015), la secreción de FGF21 por parte de las células musculares podría ser un mecanismo para facilitar localmente la captación de glucosa por parte del músculo esquelético.

Por otra parte, en condiciones de obesidad, animales sometidos a DIO durante 22 semanas evidencian un incremento en los niveles circulantes de FGF21 (283%) comparado con animales delgados; además, muestran un deterioro en la señalización río abajo de FGF21 y una pérdida en la capacidad para reducir los niveles plasmáticos de glucosa cuando se les administra de manera exógena FGF21 (Fisher et al., 2010). Muestras obtenidas a partir de biopsias de músculo vasto lateral provenientes de pacientes con DMT2, presentan un aumento en los niveles proteicos de FGF21 (35,8%) (Chavez et al., 2009) y una reducción en la señalización intracelular (Jeon et al., 2016) comparada con muestras de pacientes delgados. La posibilidad de que el FGF21 contribuya a la reducción de la glicemia en condiciones de resistencia a la insulina debe ser considerada. Nuestros resultados, de mediciones en animales que fueron sometidos a una dieta HFD, muestran que FGF21 activa la captación de glucosa de manera significativa en fibras musculares de animales resistentes a la insulina, respecto a la captación de glucosa en las fibras musculares de animales controles. El incremento de los niveles de FGF21 en condiciones de obesidad puede deberse a una desregulación en los efectos mediados por FGF21, generando un estado de resistencia a este ligando (Fisher et al., 2010). Se requieren más estudios que pudieran dar cuenta de los mecanismos que podrían estar afectando la señalización río abajo del receptor para FGF21 independientemente de su origen y demostrar la importancia de este efecto en la regulación de la glicemia en un contexto de requerimiento energético celular.

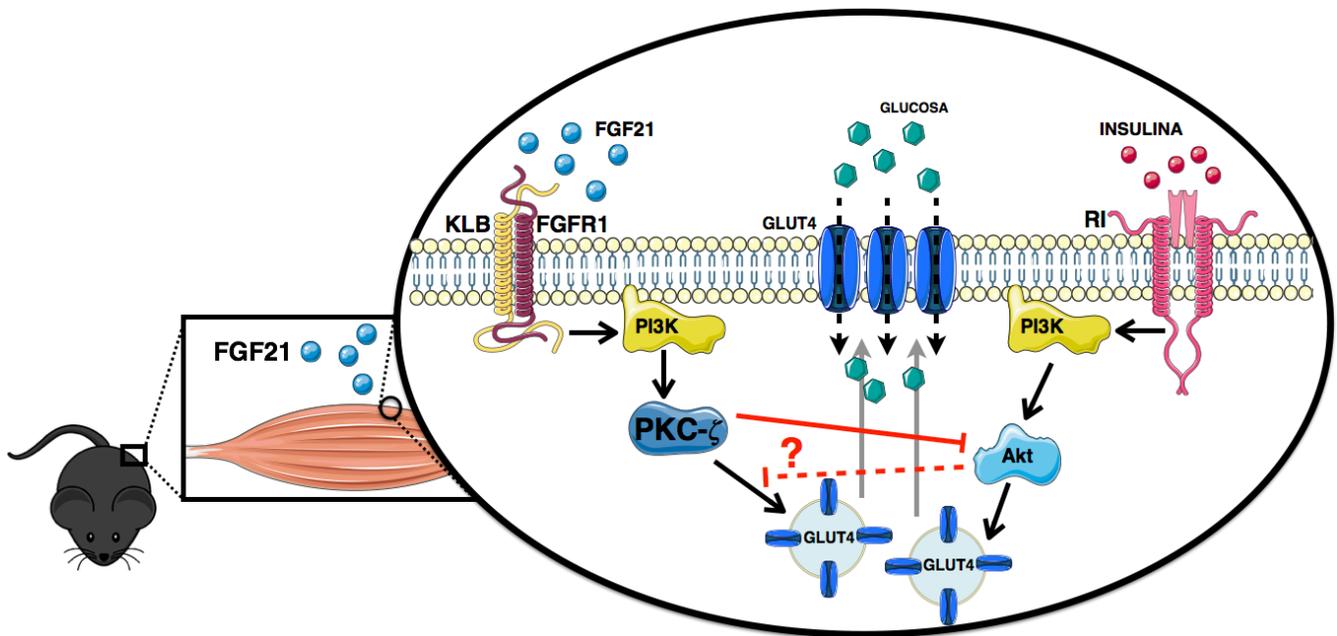


Figura 13. Modelo propuesto. FGF21 promueve la captación de glucosa en fibras aisladas de músculo esquelético por un mecanismo dependiente de la participación de PI3K y PKC- ζ , que permite la translocación de vesículas que contienen GLUT4 hacia el sarcolema. Este efecto se mantiene en presencia de insulina, cuando FGF21 está a concentraciones bajas (1-10 ng/mL); sin embargo, el efecto mediado por insulina involucra a Akt. Este mecanismo probablemente involucra una inhibición recíproca (barras rojas) en la que participan PKC- ζ y Akt cuando están presnetes de manera simultánea FGF1 e insulina.

CONCLUSIÓN

Este trabajo describe por primera vez los mecanismos moleculares río abajo de FGF21 en el músculo esquelético. Nuestros hallazgos demuestran que FGF21 promueve la captación de glucosa mediante la translocación de GLUT4 hacia la superficie celular.

Nuestra evidencia apunta a que los mecanismos moleculares que promueven el transporte de glucosa mediado por FGF21 en las fibras musculares dependen de la actividad de PI3K y PKC- ζ . Además, los mecanismos que regulan la translocación de vesículas que contienen GLUT4 hacia la membrana celular en respuesta a FGF21 son independientes de la participación de Akt.

Observamos también, que FGF21 promueve la captación de glucosa en fibras aisladas de músculo esquelético proveniente de animales alimentados con HFD, lo que pudiese constituir una función protectora de esta molécula. Este efecto no presenta diferencias en comparación con el efecto de FGF21 en cultivo de fibras aisladas provenientes de animales alimentados con NCD.

Considerando las direcciones futuras de este trabajo, pensamos que el conocimiento relacionado con los mecanismos moleculares en la captación de glucosa puede permitir un avance hacia un blanco terapéutico importante para el tratamiento de patologías como la resistencia a la insulina o la DMT2.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A. C., Halstead, C. A., Hansen, B. C., Irizarry, A. R., Martin, J. A., Myers, S. R., Reynolds, V. L., Smith, H. W., Wroblewski, V. J., & Kharitonov, A. (2013). LY2405319, an Engineered FGF21 Variant, Improves the Metabolic Status of Diabetic Monkeys. *PLoS ONE*, 8(6), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065763>
- Arias-Calderon, M. (2019). *Rol del estímulo eléctrico en la regulación de la expresión y secreción del factor de crecimiento de fibroblastos-21 en músculo esquelético*. [Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas]. Universidad de Chile.
- Badman, M. K., Pissios, P., Kennedy, A. R., Koukos, G., Flier, J. S., & Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism*, 5(6), 426–437. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.002>
- Balendran, A., Biondi, R. M., Cheung, P. C. F., Casamayor, A., Deak, M., & Alessi, D. R. (2000). A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase C ζ (PKC ζ) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20806–20813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000421200>
- Bandyopadhyay, G., Sajan, M. P., Kanoh, Y., Standaert, M. L., Quon, M. J., Lea-Currie, R., Sen, A., & Farese, R. V. (2002). PKC- ζ mediates insulin effects on glucose transport in cultured preadipocyte-derived human adipocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(2), 716–723. <https://doi.org/10.1210/jc.87.2.716>
- Bandyopadhyay, G., Standaert, M. L., Galloway, L., Moscat, J., & Farese, R. V. (1997). Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)- ζ and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology*, 138(11), 4721–4731. <https://doi.org/10.1210/endo.138.11.5473>
- Baron, A., Brechtel, G., Wallace, P., & Edelman, S. (1988). Rates and tissue sites of noninsulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol*, 255, 769–774. <https://doi.org/10.3181/00379727-199-43333>
- Bedinger, D. H., & Adams, S. H. (2015). Metabolic, anabolic, and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Molecular and Cellular*

Endocrinology, 415, 143–156. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.013>

- Beg, M., Abdullah, N., Thowfeik, F. S., Altorki, N. K., & McGraw, T. E. (2017). Distinct Akt phosphorylation states are required for insulin regulated Glut4 and Glut1-mediated glucose uptake. *ELife*, 6, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.26896>
- Benoit, B., Meugnier, E., Castelli, M., Chanon, S., Vieille-Marchiset, A., Durand, C., Bendridi, N., Pesenti, S., Monternier, P.-A., Durieux, A.-C., Freyssenet, D., Rieusset, J., Lefai, E., Vidal, H., & Ruzzin, J. (2017). Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice. *Nature Medicine*, 23, 990–996. <https://doi.org/10.1038/nm.4363>
- Berglund, E. D., Li, C. Y., Bina, H. A., Lynes, S. E., Michael, M. D., Shanafelt, A. B., Kharitonov, A., & Wasserman, D. H. (2009). Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology*, 150(9), 4084–4093. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0221>
- BonDurant, L. D., Ameka, M., Naber, M. C., Markan, K. R., Idiga, S. O., Acevedo, M. R., Walsh, S. A., Ornitz, D. M., & Potthoff, M. J. (2017). FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metabolism*, 25(4), 935-944.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.005>
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant State. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, 6, a009191. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>
- Braiman, L., Alt, A., Kuroki, T., Ohba, M., Tennenbaum, T., & Sampson, S. R. (2001). Activation of Protein Kinase C-zeta Induces Serine Phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 Compartment and Increases Glucose Transport in Skeletal Muscle. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22), 7852–7861. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.22.7852-7861.2001>
- Bryant, N. J., Govers, R., & James, D. E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(4), 267–277. <https://doi.org/10.1038/nrm782>
- Camacho, R. C., Zafian, P. T., Achanfuo-Yeboah, J., Manibusan, A., & Berger, J. P. (2013). Pegylated Fgf21 rapidly normalizes insulin-stimulated glucose utilization in diet-induced insulin resistant mice. *European Journal of Pharmacology*, 715(1–3), 41–45.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.06.023>

- Carnagarin, R., Dharmarajan, A. M., & Dass, C. R. (2015). Molecular aspects of glucose homeostasis in skeletal muscle - A focus on the molecular mechanisms of insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 417, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.004>
- Casas, M., Figueroa, R., Jorquera, G., Escobar, M., Molgó, J., & Jaimovich, E. (2010). IP3-dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *The Journal of General Physiology*, 136(4), 455–467. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910397>
- Chavez, A., Molina-Carrion, M., Abdul-Ghani, M. A., Folli, F., DeFronzo, R. A., & Tripathy, D. (2009). Circulating Fibroblast Growth Factor-21 Is Elevated in Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes and Correlates With muscle and hepatic insulin resistance. *Diabetes Care*, 32(8), 1542–1546. <https://doi.org/10.2337/dc09-0684>.
- Contreras-Ferrat, A. E., Toro, B., Bravo, R., Parra, V., Vásquez, C., Ibarra, C., Mears, D., Chiong, M., Jaimovich, E., Klip, A., & Lavandero, S. (2010). An inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-IP3 receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology*, 151(10), 4665–4677. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0116>
- Coskun, T., Bina, H. A., Schneider, M. A., Dunbar, J. D., Hu, C. C., Chen, Y., Moller, D. E., & Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*, 149(12), 6018–6027. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0816>
- Cuevas-Ramos, D., Brito-Córdova, G., Almeda-Valdés, P., Meza-Arana, C. E., Oseguera-Moguel, J., Gómez-Pérez, F. J., & Aguilar-Salinas, C. A. (2012). Exercise Increases Serum Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Levels. *PLoS ONE*, 7(5), e38022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038022>
- Cusi, K., Maezono, K., Osman, A., Pendergrass, M., Patti, M. E., Pratipanawatr, T., DeFronzo, R. A., Kahn, C. R., & Mandarino, L. J. (2000). Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *Journal of Clinical Investigation*, 105(3), 311–320. <https://doi.org/10.1172/JCI7535>
- Czech, M. P., & Corvera, S. (1999). Regulate Glucose Transport. *Biochemistry*, 274(4), 1865–

1868.

- De Wilde, J., Smit, E., Mohren, R., Boekschoten, M. V., De Groot, P., Van Den Berg, S. A. A., Bijland, S., Voshol, P. J., Van Dijk, K. W., De Wit, N. W. J., Bunschoten, A., Schaart, G., Hulshof, M. F. M., & Mariman, E. C. M. (2010). An 8-Week high-fat diet induces obesity and insulin resistance with small changes in the muscle transcriptome of C57BL/6J mice. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 2(6), 280–291. <https://doi.org/10.1159/000308466>
- DeFronzo, R. A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America*, 88(4), 787–835. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2004.04.013>
- DeFronzo, R. A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., & Felber, J. P. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. *Diabetes*, 30(December), 1000–1007.
- DiFranco, M., Quinonez, M., Capote, J., & Vergara, J. (2009). DNA transfection of mammalian skeletal muscles using in vivo electroporation. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 32, 1–7. <https://doi.org/10.3791/1520>
- Dimitriadis, G., Mitron, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93(SUPPL. 1), 52–59. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(11\)70014-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(11)70014-6)
- Ding, X., Boney-Montoya, J., Owen, B. M., Bookout, A. L., Coate, K. C., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2012). β Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor 21 Effects on Growth and Metabolism. *Cell Metabolism*, 16(3), 387–393. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.002>
- Donate-Correa, J., Martín-Núñez, E., Delgado, N. P., de Fuentes, M. M., Arduan, A. O., Mora-Fernández, C., & Navarro González, J. F. (2016). Implications of Fibroblast growth factor/Klotho system in glucose metabolism and diabetes. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 28, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.12.003>
- Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M. E., Dufour, S., Cline, G. W., Slezak, L. A., Andersen, D. K., Hundal, R. S., Rothman, D. L., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Journal of Clinical Investigation*, 103(2), 253–259. <https://doi.org/10.1172/JCI5001>

- Emanuelli, B., Vienberg, S. G., Smyth, G., Cheng, C., Stanford, K. I., Arumugam, M., Michael, M. D., Adams, A. C., Kharitonov, A., & Kahn, C. R. (2014). Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(2), 515–527. <https://doi.org/10.1172/JCI67353>
- Estensen, R. D., & Plagemann, P. G. (1972). Cytochalasin B: inhibition of glucose and glucosamine transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*(6), 1430–1434. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1430>
- Farese, R. V., Sajan, M. P., Yang, H., Li, P., Mastorides, S., Jr, W. R. G., Nimal, S., Choi, C. S., Kim, S., Shulman, G. I., Kahn, C. R., Braun, U., & Leitges, M. (2007). *Muscle-specific knockout of PKC-λ impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes*. *117*(8), 2289–2301. <https://doi.org/10.1172/JCI31408>.lethal
- Fazeli, P. K., Zhang, Y., Wright, S., Kim, S. M., Klibanski, A., Patwari, P., Lee, H., Steinhauser, M. L., Bredella, M. A., & Lun, M. (2015). FGF21 and the late adaptive response to starvation in humans. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(12), 4601–4611. <https://doi.org/10.1172/jci83349>
- Fisher, F. M., & Maratos-flier, E. (2015). *Understanding the Physiology of FGF21*. *Annu. Rev. Physiol.* *78*, 223–41. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105339>
- Fisher, M., Chui, P. C., Antonellis, P. J., Bina, H. A., Kharitonov, A., Flier, J. S., & Maratos-flier, E. (2010). Obesity Is a Fibroblast Growth Factor 21 Resistant State. *Diabetes*, *59*, 2781–2789. <https://doi.org/10.2337/db10-0193>.
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behavior Genetics*, *45*(2), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Gaich, G., Chien, J. Y., Fu, H., Glass, L. C., Deeg, M. A., Holland, W. L., Kharitonov, A., Bumol, T., Schilske, H. K., & Moller, D. E. (2013). The effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metabolism*, *18*(3), 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.005>
- Galgani, J. E., & Ravussin, E. (2012). Postprandial whole-body glycolysis is similar in insulin-resistant and insulin-sensitive non-diabetic humans. *Diabetologia*, *55*(3), 737–742. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2413-0>

- Garofalo, R. S., Torchia, A. J., Brees, D. J., Wicks, J. R., Orena, S. J., Coleman, K. G., Hildebrandt, A. L., McNeish, J. D., Stock, J. L., Coskran, T., Black, S. C., & Rafidi, K. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *Journal of Clinical Investigation*, 112(2), 197–208. <https://doi.org/10.1172/jci200316885>
- Gastaldelli, A., Baldi, S., Pettiti, M., Toschi, E., Camastra, S., Natali, A., Landau, B. R., & Ferrannini, E. (2000). Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output humans. A quantitative study. *Diabetes*, 49(8), 1367–1373. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.8.1367>
- Gastaldelli, A., Casolaro, A., Pettiti, M., Nannipieri, M., Ciociaro, D., Frascerra, S., Buzzigoli, E., Baldi, S., Mari, A., & Ferrannini, E. (2007). Effect of pioglitazone on the metabolic and hormonal response to a mixed meal in type II diabetes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81(2), 205–212. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100034>
- Geng, L., Lam, K. S. L., & Xu, A. (2020). The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0386-0>
- Gharbi, S. I., Zvelebil, M. J., Shuttleworth, S. J., Hancox, T., Saghir, N., Timms, J. F., & Waterfield, M. D. (2007). Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochemical Journal*, 404(1), 15–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20061489>
- Gimeno, R. E., & Moller, D. E. (2014). FGF21-based pharmacotherapy - potential utility for metabolic disorders. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(6), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.001>
- Goetz, R., Beenken, A., Ibrahimi, O. A., Kalinina, J., Olsen, S. K., Eliseenkova, A. V., Xu, C., Neubert, T. A., Zhang, F., Linhardt, R. J., Yu, X., White, Kenneth E., Inagaki, T., Kliwer, S. A., Yamamoto, M., Kurosu, H., Ogawa, Y., Kuro-o, M., Lanske, B., Mohammadi, M. (2007). Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Molecular and Cellular Biology*, 27(9), 3417–3428. <https://doi.org/10.1128/MCB.02249-06>
- Goldstein, M. S. (1961). Humoral nature of the hypoglycemic factor of muscular work. *Diabetes*, 10(3), 232–234.

- Gotoh, N., Laks, S., Nakashima, M., Lax, I., & Schlessinger, J. (2004). FRS2 family docking proteins with overlapping roles in activation of MAP kinase have distinct spatial-temporal patterns of expression of their transcripts. *FEBS Letters*, *564*(1–2), 14–18. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00287-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00287-X)
- Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A., & Hardie, D. G. (2013). AMP is a true physiological regulator of amp-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metabolism*, *18*(4), 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.019>
- Gundersen, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: The molecular pathways of exercise. *Biological Reviews*, *86*(3), 564–600. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00161.x>
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Metabolic Signalling: Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Hansen, J. S., Clemmesen, J. O., Secher, N. H., Hoene, M., Drescher, A., Weigert, C., Pedersen, B. K., & Plomgaard, P. (2015). Glucagon-to-insulin ratio is pivotal for splanchnic regulation of FGF-21 in humans. *Molecular Metabolism*, *4*(8), 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.06.001>
- Hardie, D. G. (2014). AMPK - Sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metabolism*, *20*(6), 939–952. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.013>
- He, A., Liu, X., Liu, L., Chang, Y., & Fang, F. (2007). How many signals impinge on GLUT4 activation by insulin? *Cellular Signalling*, *19*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.05.018>
- Himsworth, H. P. (1936). Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *The Lancet*, *227*, 127–130. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt203>
- Hoffman, N. J., Parker, B. L., Chaudhuri, R., Fisher-Wellman, K. H., Kleinert, M., Humphrey, S. J., Yang, P., Holliday, M., Trefely, S., Fazakerley, D. J., Stöckli, J., Burchfield, J. G., Jensen, T. E., Jothi, R., Kiens, B., Wojtaszewski, J. F. P., Richter, E. A., & James, D. E. (2015). Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. *Cell Metabolism*, *22*(5), 922–935.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.001>

- Hoffmann, C., & Weigert, C. (2017). Skeletal muscle as an endocrine organ: The role of myokines in exercise adaptations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029793>
- Hojman, P., & Pedersen, M. (2009). Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. *Diabetes*, 58, 2797–2801. <https://doi.org/10.2337/db09-0713>.
- Hruz, P. W., & Mueckler, M. M. (2001). Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter. *Molecular Membrane Biology*, 18(3), 183–193. <https://doi.org/10.1080/09687680110072>
- Huang, S., & Czech, M. P. (2007). The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237–252. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.03.006>
- Hubbard, S. R. (2013). The insulin receptor: Both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008946>
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., Elmquist, J. K., Gerard, R. D., Burgess, S. C., Hammer, R. E., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metabolism*, 5(6), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.003>
- Itoh, N. (2014). FGF21 as a hepatokine, adipokine, and myokine in metabolism and diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 4–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00107>
- Izumiya, Y., Bina, H. A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitononkov, A., & Walsh, K. (2008). FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Letters*, 582(27), 3805–3810. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.10.021>
- Jensen, T. E., Sylow, L., Rose, A. J., Madsen, A. B., Angin, Y., Maarbjerg, S. J., & Richter, E. A. (2014). Contraction-stimulated glucose transport in muscle is controlled by AMPK and mechanical stress but not sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Molecular Metabolism*, 3(7), 742–753. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.005>
- Jeon, J. Y., Choi, S.-E., Ha, E. S., Kim, T. H., Jung, J. G., Han, S. J., Kim, H. J., Kim, D. J., Kang, Y., & Lee, K.-W. (2016). Association between insulin resistance and impairment of FGF21

- signal transduction in skeletal muscles. *Endocrine*, 53, 97–106.
<https://doi.org/10.1007/s12020-015-0845-x>
- Johnson, C. L., Weston, J. Y., Chadi, S. A., Fazio, E. N., Huff, M. W., Kharitonenkov, A., Köester, A., & Pin, C. L. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Reduces the Severity of Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology*, 137(5), 1795–1804.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.064>
- Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras-Ferrat, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., Jaimovich, E., & Casas, M. (2013). Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of Cell Science*, 126(5), 1189–1198.
<https://doi.org/10.1242/jcs.116855>
- Kahn, B., & Flier, J. (2000). On diabetes : insulin resistance Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 473–481.
- Kang, J. H., Park, J. E., Dagoon, J., Masson, S. W. C., Merry, T. L., Bremner, S. N., Dent, J. R., & Schenk, S. (2021). Sirtuin 1 is not required for contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 130(6), 1893–1902.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00065.2021>
- Kanzaki, M., Mora, S., Hwang, J. B., Saltiel, A. R., & Pessin, J. E. (2004). Atypical protein kinase C (PKC ζ/λ) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *Journal of Cell Biology*, 164(2), 279–290.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200306152>
- Kanzaki, M., & Pessin, J. E. (2003). Insulin signaling: GLUT4 vesicles exit via the exocyst. *Current Biology*, 13(14), 574–576. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00478-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00478-0)
- Keihanian, A., Arazi, H., & Kargarfard, M. (2019). Effects of aerobic versus resistance training on serum fetuin-A, fetuin-B, and fibroblast growth factor-21 levels in male diabetic patients. *Physiology International*, 106(1), 70–80. <https://doi.org/10.1556/2060.106.2019.01>
- Keipert, S., Keijer, J., Ost, M., Klaus, S., Johann, K., Jastroch, M., & Imber, F. (2014). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling drives endocrine cross-talk through the induction of FGF21 as a myokine. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 306(5), 469–482. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00330.2013>
- Kharitonenkov, A., Dunbar, J. D., Bina, H. A., Bright, S., Moyers, J. S., Zhang, C., Ding, L.,

- Micanovic, R., Mehrbod, S. F., Knierman, M. D., Hale, J. E., Coskun, T., & Shanafelt, A. B. (2008). FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by β Klotho. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/jcp.21357>
- Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., Sandusky, G. E., Hammond, L. J., Moyers, J. S., Owens, R. A., Gromada, J., Brozinick, J. T., Hawkins, E. D., Wroblewski, V. J., Li, D. S., Mehrbod, F., Jaskunas, S. R., & Shanafelt, A. B. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *Journal of Clinical Investigation*, 115(6), 1627–1635. <https://doi.org/10.1172/JCI23606>
- Kharitonov, A., Wroblewski, V. J., Koester, A., Chen, Y. F., Clutinger, C. K., Tigno, X. T., Hansen, B. C., Shanafelt, A. B., & Etgen, G. J. (2007). The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*, 148(2), 774–781. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1168>
- Kilkenny, D. M., & Rocheleau, J. V. (2016). The FGF21 Receptor Signaling Complex : Klotho β , FGFR1c , and Other Regulatory Interactions. In *Klotho* (1st ed.). Elsevier Inc. *Vitamines and Hormones*, (pp.17 - 58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.02.008>
- Kim, H. W., Lee, J. E., Cha, J. J., Hyun, Y. Y., Kim, J. E., Lee, M. H., Song, H. K., Nam, D. H., Han, J. Y., Han, S. Y., Han, K. H., Kang, Y. S., & Cha, D. R. (2013). Fibroblast growth factor 21 improves insulin resistance and ameliorates renal injury in db/db mice. *Endocrinology*, 154(9), 3366–3376. <https://doi.org/10.1210/en.2012-2276>
- Kim, K. H., Kim, S. H., Min, Y. K., Yang, H. M., Lee, J. B., & Lee, M. S. (2013). Acute Exercise Induces FGF21 Expression in Mice and in Healthy Humans. *PLoS ONE*, 8(5), 2–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063517>
- Kjøbsted, R., Roll, J. L. W., Jørgensen, N. O., Birk, J. B., Foretz, M., Viollet, B., Chadt, A., Al-Hasani, H., & Wojtaszewski, J. F. P. (2019). AMPK and TBC1D1 regulate muscle glucose uptake after, but not during, exercise and contraction. *Diabetes*, 68(7), 1427–1440. <https://doi.org/10.2337/db19-0050>
- Klein, S., Gastaldelli, A., Yki-Järvinen, H., & Scherer, P. E. (2022). Why does obesity cause diabetes? *Cell Metabolism*, 34(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.012>
- Kong, L. J., Feng, W., Wright, M., Chen, Y., Dallas-Yang, Q., Zhou, Y. P., & Berger, J. P. (2013). FGF21 suppresses hepatic glucose production through the activation of atypical protein

- kinase Cιλ. *European Journal of Pharmacology*, 702(1–3), 302–308. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.065>
- Krook, A., Roth, R. A., Jiang, X. J., Zierath, J. R., & Wallberg-Henriksson, H. (1998). Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes*, 47(8), 1281–1286. <https://doi.org/10.2337/diab.47.8.1281>
- Kruse, R., Vienberg, S. G., Vind, B. F., Andersen, B., & Højlund, K. (2017). Effects of insulin and exercise training on FGF21, its receptors and target genes in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 60(10), 2042–2051. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4373-5>
- Kurosu, H., Choi, M., Ogawa, Y., Dickson, A. S., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., Rosenblatt, K. P., Kliewer, S. A., & Kuro-O, M. (2007). Tissue-specific expression of klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 26687–26695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704165200>
- Lan, T., Morgan, D. A., Rahmouni, K., Sonoda, J., Fu, X., Burgess, S. C., Holland, W. L., Kliewer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2017). FGF19, FGF21, and an FGFR1/β-Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia. *Cell Metabolism*, 26(5), 709-718.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.005>
- Lauritzen, H. P. M. M. (2013). Insulin- and contraction-induced glucose transporter 4 traffic in muscle: Insights from a novel imaging approach. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 41(2), 77–86. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e318275574c>
- Lax, I., Wong, A., Lamothe, B., Lee, A., Frost, A., Hawes, J., & Schlessinger, J. (2002). The docking protein FRS2α controls a MAP kinase-mediated negative feedback mechanism for signaling by FGF receptors. *Molecular Cell*, 10(4), 709–719. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00689-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00689-5)
- Lee, M. S., Choi, S. E., Ha, E. S., An, S. Y., Kim, T. H., Han, S. J., Kim, H. J., Kim, D. J., Kang, Y., & Lee, K. W. (2012). Fibroblast growth factor-21 protects human skeletal muscle myotubes from palmitate-induced insulin resistance by inhibiting stress kinase and NF-κB. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(8), 1142–1151. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.01.012>
- Leto, D., & Saltiel, A. R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: Traffic control of

- GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(6), 383–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3351>
- Lever, J. E. (1979). *Modulation of Glucose Uptake in Animal*. 254(9), 2961–2967.
- Li, Hongshuai, Sun, H., Qian, B., Feng, W., Carney, D., Miller, J., Hogan, M. C. V., & Wang, L. (2020). Increased Expression of FGF-21 Negatively Affects Bone Homeostasis in Dystrophin/Utrophin Double Knockout Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 35(4), 738–752. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3932>
- Li, Huating, Wu, G., Fang, Q., Zhang, M., Hui, X., Sheng, B., Wu, L., Bao, Y., Li, P., Xu, A., & Jia, W. (2018). Fibroblast growth factor 21 increases insulin sensitivity through specific expansion of subcutaneous fat. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02677-9>
- Li, X., Wang, C., Xiao, J., McKeenan, W. L., & Wang, F. (2016). Fibroblast growth factors, Old kids on the new block. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 53, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.12.014>
- Liang, Q., Zhong, L., Zhang, J., Wang, Y., Bornstein, S. R., Triggle, C. R., Ding, H., Lam, K. S. L., & Xu, A. (2014). FGF21 maintains glucose homeostasis by mediating the cross talk between liver and brain during prolonged fasting. *Diabetes*, 63(12), 4064–4075. <https://doi.org/10.2337/db14-0541>
- Liu, L.-Z., Zhao, H.-L., Zuo, J., Ho, S. K. S., Chan, J. C. N., Meng, Y., Fang, F.-D., & Tong, P. C. Y. (2006). Protein Kinase C Mediates Insulin-induced Glucose Transport through Actin Remodeling in L6 Muscle Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 2322–2330. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05>
- Llanos, P., Contreras-Ferrat, A., Georgiev, T., Osorio-Fuentealba, C., Espinosa, A., Hidalgo, J., Hidalgo, C., & Jaimovich, E. (2015). The cholesterol-lowering agent methyl- β -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 308(4), 294–305. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00189.2014>
- Lundåsen, T., Hunt, M. C., Nilsson, L. M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S. E. H., & Rudling, M. (2007). PPAR α is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 360(2), 437–440. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.068>

- Lundsgaard, A.-M., Fritzen, A. M., Sjøberg, K. A., Myrmel, L. S., Madsen, L., Wojtaszewski, J. F. P., Richter, E. A., & Kiens, B. (2016). Circulating FGF21 in humans is potently induced by short term overfeeding of carbohydrates. *Molecular Metabolism*, *November*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.11.001>
- Markan, K. R., Naber, M. C., Ameka, M. K., Anderegg, M. D., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A., Mohammadi, M., & Potthoff, M. J. (2014). Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes*, *63*(12), 4057–4063. <https://doi.org/10.2337/db14-0595>
- Markan, K. R., Naber, M. C., Small, S. M., Peltekian, L., Kessler, R. L., & Potthoff, M. J. (2017). FGF21 resistance is not mediated by downregulation of beta-klotho expression in white adipose tissue. *Molecular Metabolism*, *6*(6), 602–610. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.03.009>
- Martin, S. S., Haruta, T., Morris, A. J., Klippel, A., Williams, L. T., & Olefsk, J. M. (1996). Activated phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to mediate actin rearrangement and GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(30), 17605–17608. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.17605>
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M. G., Mischak, H., Blumberg, P. M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D., & Schachtele, C. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö6976. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(13), 9194–9197.
- Mashili, F., Austin, R., Deshmukh, A., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J., Chibalin, A., Moller, D., Kharitonov, A., & Krook, A. (2011). Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, *32*(30), 96–102. <https://doi.org/10.1002/dmrr>
- McConell, G. K., Sjøberg, K. A., Ceutz, F., Gliemann, L., Nyberg, M., Hellsten, Y., Frøsig, C., Kiens, B., Wojtaszewski, J. F. P., & Richter, E. A. (2020). Insulin-induced membrane permeability to glucose in human muscles at rest and following exercise. *J Physiol*, *598*(2), 303–315. <https://doi.org/10.1113/jp278600>
- Meyer, C., Woerle, H. J., Dostou, J. M., Welle, S. L., & Gerich, J. E. (2004). Abnormal renal, hepatic, and muscle glucose metabolism following glucose ingestion in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *287*(10), 1049–1056.

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00041.2004>

- Miinea, C. P., Sano, H., Kane, S., Sano, E., Fukuda, M., Peränen, J., Lane, W. S., & Lienhard, G. E. (2005). AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochemical Journal*, *391*(1), 87–93. <https://doi.org/10.1042/BJ20050887>
- Minard, A. Y., Tan, S.-X., Yang, P., Fazakerley, D. J., Domanova, W., Parker, B. L., Humphrey, S. J., Jothi, R., Stöckli, J., & James, D. E. (2016). mTORC1 Is a Major Regulatory Node in the FGF21 Signaling Network in Adipocytes. *Cell Reports*, *17*(1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.086>
- Moyers, J., Shiyanova, T. L., Mehrbod, F., Dunbar, J. D., Noblitt, T., Otto, K., Reifel-Miller, A., & Kharitonov, A. (2007). Molecular Determinants of FGF-21 Activity—Synergy and Cross-Talk With PPAR γ Signaling. *Journal Cellular Physiology*, *210*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Mraz, M., Bartlova, M., Lacinova, Z., Michalsky, D., Kasalicky, M., Haluzikova, D., Matoulek, M., Dostalova, I., Humenanska, V., & Haluzik, M. (2009). Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clinical Endocrinology*, *71*(3), 369–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03502.x>
- Mu, J., Brozinick, J. T., Valladares, O., Bucan, M., & Birnbaum, M. J. (2001). A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Molecular Cell*, *7*(5), 1085–1094. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00251-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00251-9)
- Muise, E. S., Azzolina, B., Kuo, D. W., El-Sherbeini, M., Tan, Y., Yuan, X., Mu, J., Thompson, J. R., Berger, J. P., & Wong, K. K. (2008). Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor γ and altered metabolic states. *Molecular Pharmacology*, *74*(2), 403–412. <https://doi.org/10.1124/mol.108.044826>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2019). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, *12*(1), 1–46. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Najjar, S. M., & Perdomo, G. (2019). Hepatic Insulin Clearance: Mechanism and Physiology. *Physiology*, *34*(3), 198–215. <https://doi.org/10.1152/physiol.00048.2018>

- Nelson, M. E., Parker, B. L., Burchfield, J. G., Hoffman, N. J., Needham, E. J., Cooke, K. C., Naim, T., Sylow, L., Ling, N. X., Francis, D., Norris, D. M., Chaudhuri, R., Oakhill, J. S., Richter, E. A., Lynch, G. S., Stöckli, J., & James, D. E. (2019). Phosphoproteomics reveals conserved exercise-stimulated signaling and AMPK regulation of store-operated calcium entry. *The EMBO Journal*, *38*(24), 1–20. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102578>
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., & Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, *1492*(1), 203–206. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00067-1)
- Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., Goetz, R., Eliseenkova, A. V., Mohammadi, M., & Kuro-o, M. (2007). β Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(18), 7432–7437. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701600104>
- Olson, A. L. (2012). Regulation of GLUT4 and Insulin-Dependent Glucose Flux. *Molecular Biology*, *2012*, 1–12. <https://doi.org/10.5402/2012/856987>
- Oost, L. J., Kustermann, M., Armani, A., Blaauw, B., & Romanello, V. (2019). Fibroblast growth factor 21 controls mitophagy and muscle mass. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *10*(3), 630–642. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12409>
- Osorio-Fuentealba, C., Contreras-Ferrat, A. E., Altamirano, F., Espinosa, A., Li, Q., Niu, W., Lavandero, S., Klip, A., & Jaimovich, E. (2013). Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3K γ -Akt-AS160 in skeletal muscle cells. *Diabetes*, *62*(5), 1519–1526. <https://doi.org/10.2337/db12-1066>
- Pedersen, B. K. (2011). Muscles and their myokines. *The Journal of Experimental Biology*, *214*(2), 337–346. <https://doi.org/10.1242/jeb.048074>
- Pedersen, B. K. (2013). Muscle as a secretory organ. *Comprehensive Physiology*, *3*(3), 1337–1362. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120033>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, *98*(4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Planavila, A., Redondo, I., Hondares, E., Vinciguerra, M., Munts, C., Iglesias, R., Gabrielli, L. A., Sitges, M., Giralt, M., Van Bilsen, M., & Villarroya, F. (2013). Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice. *Nature Communications*, *6*:133, 1–12.

<https://doi.org/10.1038/ncomms3019>

- Powell, D., Hajdуч, E., Kular, G., & Hundal, H. (2003). Ceramide Disables 3-Phosphoinositide Binding To the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B (PKB)/Akt by a PKC?-Dependent Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7794–7808. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7794>
- Powell, D. J., Turban, S., Gray, A., Hajdуч, E., & Hundal, H. S. (2004). Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C ζ activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochemical Journal*, 382(2), 619–629. <https://doi.org/10.1042/BJ20040139>
- Richter, E. A., Garetto, L. P., Goodman, M. N., & Ruderman, N. B. (1982). Muscle glucose metabolism following exercise in the rat. Increased sensitivity to insulin. *Journal of Clinical Investigation*, 69(4), 785–793. <https://doi.org/10.1172/JCI110517>
- Richter, E. A., & Hargreaves, M. (2013). Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiological Reviews*, 93(3), 993–1017. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2012>
- Richter, E. A., Sylow, L., & Hargreaves, M. (2021). Interactions between insulin and exercise. *Biochemical Journal*, 478(21), 3827–3846. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210185>
- Roach, W. G., Chavez, J. A., Míinea, C. P., & Lienhard, G. E. (2007). Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1. *Biochemical Journal*, 403(2), 353–358. <https://doi.org/10.1042/BJ20061798>
- Rodríguez-Nuevo, A., Díaz-Ramos, A., Noguera, E., Díaz-Sáez, F., Duran, X., Muñoz, J. P., Romero, M., Plana, N., Sebastián, D., Tezze, C., Romanello, V., Ribas, F., Seco, J., Planet, E., Doctrow, S. R., González, J., Borràs, M., Liesa, M., Palacín, M., ... Zorzano, A. (2018). Mitochondrial DNA and TLR9 drive muscle inflammation upon Opa1 deficiency. *The EMBO Journal*, 37(10), 1–18. <https://doi.org/10.15252/embj.201796553>
- Ronald Kahn, C. (1978). Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: A necessary distinction. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 27(12), 1893–1902. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(78\)80007-9](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(78)80007-9)
- Rose, A. J., & Richter, E. A. (2005). Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology*, 20, 260–270. <https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2005>
- Rudich, a, Konrad, D., Török, D., Ben-Romano, R., Huang, C., Niu, W., Garg, R. R., Wijesekara,

- N., Germinario, R. J., Bilan, P. J., & Klip, a. (2003). Indinavir uncovers different contributions of GLUT4 and GLUT1 towards glucose uptake in muscle and fat cells and tissues. *Diabetologia*, *46*(5), 649–658. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1080-1>
- Sakamoto, K., McCarthy, A., Smith, D., Green, K. A., Hardie, D. G., Ashworth, A., & Alessi, D. R. (2005). Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO Journal*, *24*(10), 1810–1820. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600667>
- Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Fujishiro, M., Ono, H., Onishi, Y., Katagiri, H., Abe, M., Fukushima, Y., Shojima, N., Inukai, K., Kikuchi, M., Oka, Y., & Asano, T. (2002). Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *282*(6), E1239–E1244. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00455.2001>
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, *414*(6865), 799–806. <https://doi.org/10.1038/414799a>
- Sanchez-Margalet, V. (1994). Role of PI3K in insulin receptor signaling - LY294002. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *204*(2), 446–452.
- Sanford, J. A., Nogiec, C. D., Lindholm, M. E., Adkins, J. N., Amar, D., Dasari, S., Drugan, J. K., Fernández, F. M., Radom-Aizik, S., Schenk, S., Snyder, M. P., Tracy, R. P., Vanderboom, P., Trappe, S., Walsh, M. J., Evans, C. R., Fernandez, F. M., Li, Y., Tomlinson, L., ... Rivas, M. A. (2020). Molecular Transducers of Physical Activity Consortium (MoTrPAC): Mapping the Dynamic Responses to Exercise. *Cell*, *181*(7), 1464–1474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.004>
- Schenk, S., McCurdy, C. E., Philp, A., Chen, M. Z., Holliday, M. J., Bandyopadhyay, G. K., Osborn, O., Baar, K., & Olefsky, J. M. (2011). Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(11), 4281–4288. <https://doi.org/10.1172/JCI58554>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2011). Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, *91*(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
- Smith, G. I., Polidori, D. C., Yoshino, M., Kearney, M. L., Patterson, B. W., Mittendorfer, B., & Klein, S. (2020). Influence of adiposity, insulin resistance, and intrahepatic triglyceride

- content on insulin kinetics. *Journal of Clinical Investigation*, 130(6), 3305–3314. <https://doi.org/10.1172/JCI136756>
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě De Angelis, M., & Häring, H.-U. (2017). *Fibroblast Growth Factor 21-Metabolic Role in Mice and Men*. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00016>
- Stein, S. C., Woods, A., Jones, N. A., Davison, M. D., & Cabling, D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochemical Journal*, 345(3), 437–443. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3450437>
- Suomalainen, A., Elo, J. M., Pietiläinen, K. H., Hakonen, A. H., Sevastianova, K., Korpela, M., Isohanni, P., Marjavaara, S. K., Tyni, T., Kiuru-Enari, S., Pihko, H., Darin, N., Öunap, K., Kluijtmans, L. A. J., Paetau, A., Buzkova, J., Bindoff, L. A., Annunen-Rasila, J., Uusimaa, J., Tynismaa, H. (2011). FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: A diagnostic study. *The Lancet Neurology*, 10(9), 806–818. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70155-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70155-7)
- Suzuki, M., Uehara, Y., Motomura-Matsuzaka, K., Oki, J., Koyama, Y., Kimura, M., Asada, M., Komi-Kuramochi, A., Oka, S., & Imamura, T. (2008). BKlotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Molecular Endocrinology*, 22(4), 1006–1014. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0313>
- Sylow, L., Tokarz, V. L., Richter, E. A., & Klip, A. (2021). The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia. *Cell Metabolism*, 33(4), 758–780. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.020>
- Talukdar, S., Zhou, Y., Li, D., Rossulek, M., Dong, J., Somayaji, V., Weng, Y., Clark, R., Lanba, A., Owen, B. M., Brenner, M. B., Trimmer, J. K., Gropp, K. E., Chabot, J. R., Erion, D. M., Rolph, T. P., Goodwin, B., & Calle, R. A. (2016). A long-acting FGF21 molecule, PF-05231023, decreases body weight and improves lipid profile in non-human primates and type 2 diabetic subjects. *Cell Metabolism*, 23(3), 427–440. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.02.001>
- Tanimura, Y., Aoi, W., Takanami, Y., Kawai, Y., Mizushima, K., Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2016). Acute exercise increases fibroblast growth factor 21 in metabolic organs and circulation. *Physiological Reports*, 4(12), 426–437. <https://doi.org/10.14814/phy2.12828>
- Tengholm, A., & Meyer, T. (2002). A PI3-Kinase signaling code for insulin-triggered insertion of

- glucose transporters into the plasma membrane. *Current Biology*, 12(21), 1871–1876. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01223-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01223-X)
- Tezze, C., Romanello, V., Desbats, M. A., Fadini, G. P., Albiero, M., Favaro, G., Ciciliot, S., Soriano, M. E., Morbidoni, V., Cerqua, C., Loeffler, S., Kern, H., Franceschi, C., Salvioli, S., Conte, M., Blaauw, B., Zampieri, S., Salviati, L., Scorrano, L., & Sandri, M. (2017). Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell Metabolism*, 25(6), 1374-1389. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.04.021>
- Thong, F. S. L., Bilan, P. J., & Klip, A. (2007). The Rab GTPase-activating protein AS160 integrates Akt, protein kinase C, and AMP-activated protein kinase signals regulating GLUT4 traffic. *Diabetes*, 56(2), 414–423. <https://doi.org/10.2337/db06-0900>
- Tonks, K. T., Ng, Y., Miller, S., Coster, A. C. F., Samocha-Bonet, D., Iseli, T. J., Xu, A., Patrick, E., Yang, J. Y. H., Junutula, J. R., Modrusan, Z., Kolumam, G., Stöckli, J., Chisholm, D. J., James, D. E., & Greenfield, J. R. (2013). Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects. *Diabetologia*, 56(4), 875–885. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2811-y>
- Toullec, D., Pianetti, P., Bellevergue, P., Grand-perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D., & Kirilovskyski, J. (1991). The Bisindolylmaleimide GF 109203X Is a Potent and Selective Inhibitor of Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 266(24), 15771–15781.
- Van Dijk, T. H., Laskewitz, A. J., Grefhorst, A., Boer, T. S., Bloks, V. W., Kuipers, F., Groen, A. K., & Reijngoud, D. J. (2013). A novel approach to monitor glucose metabolism using stable isotopically labelled glucose in longitudinal studies in mice. *Laboratory Animals*, 47(2), 79–88. <https://doi.org/10.1177/0023677212473714>
- Vandanmagsar, B., Warfel, J. D., Wicks, S. E., Ghosh, S., Salbaum, J. M., Burk, D., Dubuisson, O. S., Mendoza, T. M., Zhang, J., Noland, R. C., & Mynatt, R. L. (2016). Impaired Mitochondrial Fat Oxidation Induces FGF21 in Muscle. *Cell Reports*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.057>
- Vernia, S., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Tournier, C., & Davis, R. J. (2016). Fibroblast Growth Factor 21 Mediates Glycemic Regulation by Hepatic JNK. *Cell Reports*, 14(10), 2273–2280.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.026>

- Wang, L., Mazagova, M., Pan, C., Yang, S., Brandl, K., Liu, J., Reilly, S. M., Wang, Y., Miao, Z., Loomba, R., Lu, N., Guo, Q., Liu, J., Yu, R. T., Downes, M., Evans, R. M., Brenner, D. A., Saltiel, A. R., Beutler, B., & Schnabl, B. (2019). YIPF6 controls sorting of FGF21 into COPII vesicles and promotes obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(30), 15184–15193. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904360116>
- Watt, M. J., Heigenhauser, G. J. F., O'Neill, M., & Spriet, L. L. (2015). Hormone-sensitive lipase activity and fatty acyl-CoA content in human skeletal muscle during prolonged exercise. *Journal of Applied Physiology*, *95*(1), 314–321. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01181.2002>
- Wei, W., Dutchak, P. a., Wang, X., Ding, X., Wang, X., Bookout, a. L., Goetz, R., Mohammadi, M., Gerard, R. D., Dechow, P. C., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. a., & Wan, Y. (2012). Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(8), 3143–3148. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200797109>
- Welsh, G. I., Hers, I., Berwick, D. C., Dell, G., Wherlock, M., Birkin, R., Leney, S., & Tavaré, J. M. (2005). Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochemical Society Transactions*, *33*(2), 346–349. <https://doi.org/10.1042/bst0330346>
- Woerle, H. J., Meyer, C., Dostou, J. M., Gosmanov, N. R., Islam, N., Popa, E., Wittlin, S. D., Welle, S. L., & Gerich, J. E. (2003). Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *284*(4 47-4), 716–725. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00365.2002>
- Woerle, H. J., Szoke, E., Meyer, C., Dostou, J. M., Wittlin, S. D., Gosmanov, N. R., Welle, S. L., & Gerich, J. E. (2006). Mechanisms for abnormal postprandial glucose metabolism in type 2 diabetes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *290*(1), 67–77. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00529.2004>
- Xu, J., Stanislaus, S., Chinookoswong, N., Lau, Y. Y., Hager, T., Patel, J., Ge, H., Weiszmann, J., Lu, S.-C., Graham, M., Busby, J., Hecht, R., Li, Y.-S., Li, Y., Lindberg, R., & Véniant, M. M. (2009). Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-

resistant mouse models—association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 297(5), 1105–1114. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00348.2009>

Yu, H., Fujii, N. L., Toyoda, T., An, D., Farese, R. V., Leitges, M., Hirshman, M. F., Mul, J. D., & Goodyear, L. J. (2015). Contraction stimulates muscle glucose uptake independent of atypical PKC. *Physiological Reports*, 3(11), 1–9. <https://doi.org/10.14814/phy2.12565>

Zhang, M., & Schekman, R. (2013). Unconventional secretion, unconventional solutions. *Science*, 340(6132), 559–561. <https://doi.org/10.1126/science.1234740>

Zhang, X., Yeung, D., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z., Liu, F., Wong, R., Chow, W., Tso, A., Lam, K., & Xu, A. (2008). Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*, 57(5), 1246–1253. <https://doi.org/10.2337/db07-1476>

Zhang, Xinmei, Yeung, D. C. Y., Karpisek, M., Stejskal, D., Zhou, Z., Liu, F., Wong, R. L. C., Chow, W., Tso, A. W. K., & Lam, K. S. L. (2008). *Serum FGF21 levels are increased in obesity independently metabolic syndrome in humans*. 57(5), 1246-1253. <https://doi.org/10.2337/db07-1476>.Additional

Zhou, Q. L., Park, J. G., Jiang, Z. Y., Holik, J. J., Mitra, P., Semiz, S., Guilherme, A., Powelka, A. M., Tang, X., Virbasius, J., & Czech, M. P. (2004). Analysis of insulin signalling by RNAi-based gene silencing. *Biochemical Society Transactions*, 32(5), 817–821. <https://doi.org/10.1042/bst0320817>

ANEXO 1: Premios, Congresos y Publicaciones

Premios y reconocimientos:

- Proyecto de Consolidación de la Internacionalización de la Investigación y Postgrado de la Universidad de Chile, 2019. Beca de asistencia a congreso para estudiantes de Doctorado, UCH-1566.
- Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), 2018. Beca de asistencia a congreso para estudiantes de Doctorado.
- Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), 2017. Beca de Doctorado Nacional para la formación de capital humano avanzado, N° 21171449.

Participación en Congresos Internacionales:

- Cell Symposia – Exercise Metabolism (2019), Sitges, España. *Fibroblast growth factor 21 promotes glucose uptake by a GLUT4-dependent and Akt-independent mechanism in isolated fibers of skeletal muscle.* Giovanni Rosales-Soto, Alexis Díaz-Vegas, Paola Llanos, Mariana Casas, Enrique Jaimovich, Ariel Contreras-Ferrat.
- Experimental Biology (2018), San Diego, USA. *Fibroblast Growth Factor 21 Promotes Glucose Uptake in Adult Skeletal Muscle Fibers from Mice.* Giovanni Rosales-Soto, Alexis Díaz-Vegas, Paola Llanos, Enrique Jaimovich, Ariel Contreras-Ferrat.

Presentaciones en Congresos Nacionales

- XXXI Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology (2018), Puerto Varas, Chile. *Fibroblast Growth Factor-21 Regulates Glucose Uptake by a GLUT4-dependent and Akt-independent mechanism in Skeletal Muscle Fibers.* Giovanni Rosales-Soto, Alexis Díaz-Vegas, Paola Llanos, Enrique Jaimovich, Ariel Contreras-Ferrat.

- VII Congreso Internacional de Ciencias del Ejercicio (2017), Santiago, Chile. *FGF21 Promotes Glucose Uptake in Adult Skeletal Muscle Fibers from Mice*. Giovanni Rosales-Soto, Alexis Díaz-Vegas, Paola Llanos, Enrique Jaimovich, Ariel Contreras-Ferrat.
- XXXI Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology (2017), Puerto Varas, Chile. *FGF21 Promotes Glucose Uptake in Adult Skeletal Muscle Fibers from Mice*. Giovanni Rosales-Soto, Alexis Díaz-Vegas, Paola Llanos, Enrique Jaimovich, Ariel Contreras-Ferrat.
- XXXI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (2016), Huilo-Huilo, Chile. *FGF21 increases GLUT4-mediated glucose uptake in adult muscle fibers*. Giovanni Rosales-Soto, Alexis Díaz-Vegas, Paola Llanos, Enrique Jaimovich, Ariel Contreras-Ferrat.
- XXIX Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology (2015), Puerto Varas, Chile. *Role of intracellular calcium channels in mitochondrial Ca²⁺ uptake after muscle fiber depolarization: Excitation-metabolism coupling*. Alexis Díaz, Alex Cordova, Giovanni Rosales-Soto, Paola Llanos, Cecilia Hidalgo, Manuel Arias, Mariana Casas, Enrique Jaimovich, Ariel Contreras-Ferrat.
- XXIX Annual Meeting Chilean Society for Cell Biology (2015), Puerto Varas, Chile. *Retrograde regulation of insulin-dependent glucose uptake by mitochondria Ca²⁺ handling in skeletal muscle fibers*. Ariel Contreras-Ferrat, Alexis Díaz, Cristián Campos, Yildy Utreras, Denisse Valladares, Giovanni Rosales-Soto, Paola Llanos, Manuel Arias, Enrique Jaimovich.

Publicaciones generadas durante esta tesis:

- Rosales-Soto G., Diaz-Vegas A., Casas M., Contreras-Ferrat A., Jaimovich E. (2020) Fibroblast growth factor-21 potentiates glucose transport in skeletal muscle fibers. *J. Mol. Endocrinol.* (65:3) 85-95

ANEXO 2: Financiamiento

Esta tesis fue financiada por los siguientes proyectos de investigación:

1. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT); 1151293; Enrique Jaimovich.
2. Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID); Universidad de Chile; ENL09/19; Enrique Jaimovich.
3. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT); 11130267; Ariel Contreras.
4. Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF); IDeA ID16I10101; Mariana Casas.
5. Beca de Doctorado Nacional para la Formación de Capital Humano Avanzado (CONICYT); 21171449, Giovanni Rosales.