

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***ROL DE LA PROTEÍNA HERPUD1 EN LA RESPUESTA A  
INSULINA EN CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Doctor en Farmacología por:**

***MARIO FILIDOR NAVARRO MARQUEZ***

**Directores de Tesis: Dr. Sergio Lavandero González  
Dr. Enrique Jaimovich Pérez**

**Santiago, Chile**

**Noviembre 2018**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**MARIO FILIDOR NAVARRO MARQUEZ**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Farmacología, en el examen público rendido el día

---

**Directores de Tesis:**

**Dr. Sergio Lavandero G.**

---

**Dr. Enrique Jaimovich P.**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Felipe Barros O.**

---

**Dra. Sonya Bunivic R.**

---

**Dra. Yenny Fiedler T.**

---

**Dr. Claudio Hetz F.**

---

*A Jimena,*

*gracias por bancarme todos estos años.*

Esta tesis de Doctorado se realizó en los Laboratorios de Transducción de Señales dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, y de Fisiología Muscular dirigido por el Dr. Enrique Jaimovich. Los estudios en el modelo animal se desarrollaron en el Laboratorio de Trombosis, Departamento de Patogénesis Molecular del Centro Nacional Cerebral y Cardiovascular de Osaka, Japón, bajo la dirección del Dr. Koichi Kokame.

Este trabajo contó con el financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT 2011-2015 (MN)
- Beca de apoyo a la realización de Tesis Doctoral 2013-2014 (MN)
- Proyecto FONDAP 15010006 (SL-EJ)
- Proyecto FONDECYT 1161156 (SL)
- Proyecto FONDAP 15130011 (SL)

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados y presentados en congresos. Las publicaciones y presentaciones más importantes se citan a continuación:

#### A. Publicaciones:

- Troncoso R, Díaz-Elizondo J, Espinoza SP, **Navarro-Márquez M**, Oyarzún AP, Riquelme JA, Garcia-Carvajal I, Díaz-Araya G, García L, Hill JA, Lavandero S. Regulation of cardiac autophagy by insulin-like growth factor 1. *IUBMB Life*. 65:593-60, 2013.
- del Campo A, Parra V, Vásquez-Trincado C, Gutiérrez T, Morales PE, López-Crisosto C, Bravo-Sagua R, **Navarro-Márquez M**, Verdejo HE, Contreras-Ferrat A, Troncoso R, Chiong M, Lavandero S. Mitochondrial fragmentation impairs insulin-dependent glucose uptake by modulating Akt activity through mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 306: E1-E13, 2014.
- Westermeier F, **Navarro-Márquez M**, López-Crisosto C, Bravo-Sagua R, Quiroga C, Bustamante M, Verdejo HE, Zalaquett R, Ibacache M, Parra V, Castro PF, Rothermel BA, Hill JA, Lavandero S. Defective insulin signaling and mitochondrial dynamics in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*. 1853:1113-8, 2015.
- Paredes F, Parra V, Torrealba N, **Navarro-Márquez M**, Gatica D, Bravo-Sagua R, Troncoso R, Pennanen C, Quiroga C, Chiong M, Caesar C, Taylor WR, Molgó J, San Martín A, Jaimovich E, Lavandero S. HERPUD1 protects against oxidative stress-induced apoptosis through downregulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Free Radic Biol Med*. 90:206-18, 2016.
- Torrealba N, **Navarro-Marquez M**, Garrido V, Pedrozo Z, Romero D, Eura Y, Villalobos E, Roa JC, Chiong M, Kokame K, Lavandero S. Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP<sub>3</sub> receptor degradation. *Sci Rep* 7: 13402, 2017.

- Bernal-Sore I, **Navarro-Marquez M**, Osorio-Fuentealba C, Díaz-Castro F, Del Campo A, Donoso-Barraza C, Porrás O, Lavandero S, Troncoso R. Mifepistone enhances insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake in skeletal muscle cells. *Mol Cell Endocrinol.* 461: 277-283, 2018.
- **Navarro-Marquez M**, Torrealba N, Troncoso T, Vásquez-Trincado C, Rodríguez M, Morales PE, Villalobos E, Eura Y, Klip A, Hill JA, Jaimovich E, Kokame K, Lavandero S. Herpud1 impacts insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle cells by controlling the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-Akt axis. *Biochim Biophys Acta.* 1864:1653-1662, 2018.

## B. Congresos:

- Paredes F, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Torrealba N, **Navarro-Márquez M**, Jaimovich E, Lavandero S. Herp cytoprotective effect against oxidative stress. XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Valdivia, Chile (2011).
- Paredes F, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Torrealba N, **Navarro-Márquez M**, Jaimovich E, Lavandero S. Herp cytoprotective effect against oxidative stress through regulation of the inositol trisphosphate receptor (IP3R). XXXV Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile (2012).
- **Navarro-Márquez M**, Paredes F, Vásquez-Trincado C, Jaimovich E, Lavandero, S. Herp regulates insulin response in skeletal muscle cells. XII Congreso PABMB. Puerto Varas, Chile (2013).
- Espinoza S, **Navarro-Márquez M**, Díaz A, Troncoso R, García L. Crosstalk between Toll-like receptor 4 and autophagy in L6 myotubes. XII Congreso PABMB. Puerto Varas, Chile (2013).
- Paredes F, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Torrealba N, **Navarro-Márquez M**, Pennanen C, Troncoso R, Jaimovich E, Lavandero S. Herp protects HeLa cells from oxidative stress-induced cell death. XII Congreso PABMB. Puerto Varas, Chile (2013).
- Paredes F, Gatica D, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Troncoso R, Torrealba N, **Navarro-Márquez M**, Jaimovich E, Lavandero S. Herp cytoprotective effect against oxidative stress through regulation of the inositol trisphosphate receptor (IP3R). Reunión Anual Sociedad Americana de Biología Celular. New Orleans, EE. UU. (2013).

- **Navarro-Márquez M**, Paredes F, Troncoso R, Vásquez-Trincado C, Espinoza S, Jaimovich E, Lavandero S. Herp regulates calcium signals in skeletal muscle cells. XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile (2014).
- Bernal I, Farías M, Vásquez-Trincado C, **Navarro-Márquez M**, Mellado R, Troncoso R. Mifepristone-induced metabolic changes in skeletal muscle cells. XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile (2014).
- Paredes F, Gatica D, Troncoso R, Quiroga C, Parra V, Bravo R, Torrealba N, **Navarro-Márquez M**, Pennanen C, San Martín A, Jaimovich E, Lavandero S. Herp protects Hela cells from oxidative stress-induced death by regulating the IP3 receptor. XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile (2014).
- **Navarro-Márquez M**, Rivera-Mejías P, Vásquez-Trincado C, Morales P, Jaimovich E, Lavandero S. Phosphatase calcineurin regulates insulin/Akt-dependent glucose uptake in skeletal muscle cells. XXXIX Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile (2016).
- Vásquez-Trincado C, **Navarro-Márquez M**, Westermeier F, Rivera-Mejías P, Espinoza A, Lavandero S. Lipotoxic stress-dependent E3 ligase Mul1 regulates cardiac mitochondrial dynamics and insulin signaling. XXXIX Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile (2016).
- **Navarro-Márquez M**, Bustos S, Vásquez-Trincado C, Rodríguez M, Jaimovich E, Lavandero S. Herpud1 regulates insulin response in skeletal muscle cells. XL Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile (2017).
- Norambuena-Soto I, **Navarro-Márquez M**, Cartes-Saavedra B, Sanhueza-Olivares F, Nuñez-Soto C, Cancino-Arenas N, Mondaca-Ruff D, Mellado R, Chiong M. Atorvastatin inhibits basal autophagy in skeletal muscle cells. XL Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas, Chile (2017).

## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis ha sido posible gracias al apoyo y a la colaboración de una gran cantidad de personas, con las cuales estoy eternamente agradecido. Inicialmente agradezco al Dr. Sergio Lavandero, por permitirme realizar este trabajo bajo su tutela, por su confianza y por darme la libertad para enfrentar los desafíos que planteó este trabajo. Del mismo modo agradezco al Dr. Enrique Jaimovich, por poner toda su sabiduría y conocimientos al servicio de esta tesis. También quisiera agradecer a Fidel Albornoz y Gindra Latorre, por su colaboración continua y por hacer más alegre y ameno el día a día en el laboratorio. A todos los integrantes del LTSM, por participar en la discusión de mis resultados, por aportar con sus ideas y por hacer más agradable la convivencia diaria.

Gracias a la organización delictual conocida como “la célula”, por ser la válvula de escape en el difícil y muchas veces frustrante camino de ser científico. En especial quisiera agradecer a César, Pablo y Marcelo, por creer en mi trabajo cuando ni yo mismo lo hacía. Por otra parte, quisiera agradecer a mi familia por su apoyo, cariño y comprensión irrestrictos. También a la familia Canales Urriola, por acogerme como un integrante más. Finalmente quiero agradecer a Jimena, por estar siempre ahí, escucharme, apoyarme y permitirme ser su compañero en este camino.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	23
1.1 Músculo esquelético .....	23
1.1.1 Estructura muscular .....	24
1.1.2 Metabolismo en el músculo esquelético.....	26
1.2 Insulina .....	27
1.2.1 Señalización de insulina en el músculo esquelético.....	28
1.2.2 Transporte de glucosa dependiente de insulina en el músculo esquelético .....	32
1.3 Señalización de Ca <sup>2+</sup> intracelular en el músculo esquelético.....	37
1.3.1 Rol del Ca <sup>2+</sup> intracelular en la respuesta a insulina en células musculares.....	40
1.3.2 Calcineurina: Enlace potencial entre el Ca <sup>2+</sup> intracelular y la señalización de insulina .....	42
1.4 Homocysteine inducible ER Protein with Ubiquitin like Domain 1 (HERPUD1 o HERP) .....	44
1.4.1 HERPUD1 y degradación de proteínas.....	46
1.4.2 HERPUD1: Ca <sup>2+</sup> y citoprotección .....	48
1.4.3 HERPUD1 e insulina .....	50
1.5 Resumen de antecedentes .....	51
2. HIPÓTESIS .....	53
3. OBJETIVO GENERAL.....	53
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	54
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	55
5.1 Reactivos .....	55
5.2 Cultivo celular .....	56
5.3 Muestra de ratones KO Herpud1 .....	57
5.4 Captación de <sup>3</sup> H-2-Deoxi-glucosa.....	57

5.5	Captación de 2-NBDG .....	58
5.6	Detección de GLUT4-myc en superficie .....	59
5.7	Determinaciones de Ca <sup>2+</sup> citosólico .....	60
5.8	Determinaciones de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial .....	61
5.9	Determinación del área de los miotubos y del índice de fusión .....	62
5.10	Determinación de la viabilidad celular mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI) .....	63
5.11	Preparación de extractos celulares totales .....	64
5.12	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	65
5.13	Electrotransferencia de proteínas .....	65
5.14	Western blot.....	65
5.15	Transfección con ARN interferente pequeño .....	66
5.16	Transfección de plásmidos .....	67
5.17	Transducción adenoviral.....	67
5.18	Expresión de resultados y análisis estadístico.....	68
6.	RESULTADOS .....	69
6.1	Evaluar el rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas .....	69
6.2	Determinar el papel de Herpud1 en la regulación de la vía transduccional Ca <sup>2+</sup> -calcineurina en células musculares esqueléticas.....	97
7.	DISCUSIÓN .....	123
7.1	Consideraciones generales sobre el modelo celular .....	125
7.2	Rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas.....	128
7.3	Papel de Herpud1 en la homeostasis del Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	140
7.4	Papel de Herpud1 en la regulación de la actividad de calcineurina...	147
7.5	Calcineurina regula la vía de señalización de insulina en el músculo esquelético. ....	148
7.6	La inhibición de calcineurina revierte las alteraciones en la vía de señalización de insulina causadas por el silenciamiento de Herpud1. ....	149
8.	CONCLUSIONES.....	153
9.	BIBLIOGRAFÍA .....	157

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Acciones metabólicas de insulina.....	31
Figura 2: Señalización de insulina en el músculo esquelético.....	32
Figura 3: Efecto de insulina en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática.....	36
Figura 4: Homeostasis del Ca <sup>2+</sup> intracelular.....	40
Figura 5: Herpud1.....	46
Figura 6: Efecto de distintas concentraciones de insulina en su cascada de señalización intracelular en miotubos L6.....	70
Figura 7: Efecto de distintas concentraciones de insulina en la captación de glucosa en miotubos L6.....	71
Figura 8: Efecto del estrés de RE en los niveles proteicos de Herpud1 en los miotubos L6.....	72
Figura 9: Efecto del ARN interferente pequeño específico para Herpud1 en los niveles de la proteína en los miotubos L6.....	74
Figura 10: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la diferenciación y la viabilidad celular en los miotubos L6.....	75
Figura 11: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles proteicos de LC3 y p62 en los miotubos L6.....	77
Figura 12: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en el flujo autofágico en los miotubos L6.....	78

Figura 13: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la fosforilación de JNK en los miotubos L6.....	80
Figura 14: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la fosforilación de AMPK en los miotubos L6.....	81
Figura 15: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la captación de glucosa en los miotubos L6.....	84
Figura 16: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles de GLUT4 en la membrana plasmática en los miotubos L6.....	85
Figura 17: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la fosforilación del RI (Tyr-1361) y de Akt en los residuos Ser-473 y Thr-308 en los miotubos L6.....	86
Figura 18: Efecto del knockdown de Herpud1 en la activación de proteínas blanco de Akt en los miotubos L6.....	88
Figura 19: Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la fosforilación del RI (Tyr-1361) en los miotubos L6.....	91
Figura 20: Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la fosforilación de Akt (Ser-473) y S6 (Ser-235/236) en los miotubos L6.....	92
Figura 21: Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la captación de glucosa en los miotubos L6.....	93
Figura 22: Fosforilación de Akt (Ser-473) en el músculo esquelético de ratones KO para Herpud1.....	95
Figura 23: Fosforilación del RI (Tyr-1361) en el músculo esquelético de ratones KO para Herpud1.....	96

Figura 24: Respuesta de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por insulina en los miotubos L6.....	99
Figura 25: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico en los miotubos L6.....	100
Figura 26: Respuesta de $\text{Ca}^{2+}$ citosólica dependiente de $\text{IP}_3\text{R}$ en los miotubos L6 siControl y siHerpud1.....	101
Figura 27: Rol de Herpud1 en los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial en miotubos L6.....	102
Figura 28: Rol de Herpud1 en los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial en miotubos L6.....	104
Figura 29: Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico en los miotubos L6.....	105
Figura 30: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles de las isoformas del $\text{IP}_3\text{R}$ en los miotubos L6.....	107
Figura 31: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles totales de $\text{IP}_3\text{R}$ en los miotubos L6.....	108
Figura 32: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles proteicos de RCAN1.4 y de la subunidad alfa de calcineurina (CnA-alfa) en miotubos L6.....	110
Figura 33: Niveles proteicos de RCAN1.4 en el músculo esquelético de ratones KO para Herpud1.....	111

Figura 34: Efecto de la inhibición de calcineurina en la captación de glucosa dependiente de insulina en los miotubos L6.....	113
Figura 35: Efecto de la inhibición de calcineurina en la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6.....	115
Figura 36: Evaluación del efecto de calcineurina constitutivamente activa (CN-CA) en la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6.....	116
Figura 37: Rol de calcineurina en la disminución en la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6 siHerpud1.....	117
Figura 38: Efecto de tacrolimus (FK506) en la captación de glucosa inducida por insulina en miotubos L6 control y knockdown para Herpud1.....	118
Figura 39: Efecto de la inhibición de calcineurina en la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6 siHerpud1.....	120
Figura 40: Efecto de la sobreexpresión de la proteína inhibidora de calcineurina (CAIN) en la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6 siHerpud1.....	121
Figura 41: Modelo propuesto.....	151

## ABREVIATURAS

A/BA	: Acrilamida/bisacrilamida
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
AGC	: Familia de serina/treonina quinasas
Akt	: Proteína serina/treonina quinasa B (PKB)
AMP	: Monofosfato de adenosina
AMPK	: Proteína quinasa activada por AMP
ANOVA	: Análisis de la varianza
ARN	: Ácido ribonucleico
Arp2/3	: Proteína relacionada a actina 2/3
AS160	: Quinasa sustrato de Akt de 160 kDa
BCA	: Ácido bicinconínico
BSA	: Albúmina de suero bovino
C-terminal	: Extremo carboxilo terminal
Ca <sup>2+</sup>	: Ión calcio
CAIN	: Proteína inhibidora de calcineurina
CN-CA	: Calcineurina constitutivamente activa
CsA	: Ciclosporina A
Drp-1	: Proteína relacionada a la familia de las dinaminas 1
CypD	: Ciclofilina D
DAG	: Diacilglicerol
DNA-PK	: Proteína quinasa dependiente de ADN
EF-hand	: Dominio estructural mano EF
ERAD	: Degradación de proteínas asociada al RE
ERCQ	: Control de calidad del RE

ERSE	: Elemento de respuesta a estrés de RE
E2	: Enzima que se conjuga con ubiquitina 2
E3	: Enzima ligasa de ubiquitina 3
FBS	: Suero fetal bovino
FKPB12	: Proteína de unión a FK506
FK506	: Tacrolimus
FOXO	: Factor transcripcional <i>forkhead box</i>
GAP	: Proteína activadora de GTPasa
GLUT	: Proteína transportadora de glucosa
Grp75	: Proteína regulada por glucosa de 75 kDa
GSVs	: Vesículas enriquecidas en transportadores de glucosa GLUT4
GTPasa	: Trifosfatasa de guanosina
Herpud1	: Proteína del RE inducida por homocisteína
IGF-1	: Factor de crecimiento tipo insulina 1
IP <sub>3</sub> R	: Receptor de inositol 1, 4, 5 trifosfato
IRS	: Sustrato del receptor de insulina
KO	: Ratón genéticamente modificado <i>knockout</i>
LacZ	: Gen de beta-galactosidasa
MCU	: Uniporter de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial
Mfn-2	: Mitofusina-2
Mif1	: Fragmento inducible por MMS 1
MME	: Membrana mitocondrial externa
MMI	: Membrana mitocondrial interna
MMS	: Metil-metanosulfonato
MPP <sup>+</sup>	: 1-metil-4-fenilpiridinio
mTOR	: Proteína <i>mammalian target of rapamycin</i>

mTORC2	: Complejo 2 de mTOR
MOI	: Multiplicidad de infección viral
NFAT	: Factor nuclear de las células T activadas
NNT	: Nicotinamida nucleótido transhidrogenasa
OPD	: O-fenilendiamina
PBS	: Tampón fosfato salino
PDK1	: Quinasa dependiente de PIP <sub>3</sub> 1
PFA	: Paraformaldehído
PH	: Dominio de homología a pleckstrina
PHB	: Dominio de homología a prohibitina
PIP <sub>2</sub>	: Fosfatidilinositol bifosfato
PIP <sub>3</sub>	: Fosfatidilinositol trifosfato
PI3K	: Proteína fosfatidilinositol-3 quinasa
p-Akt	: Proteína Akt fosforilada
p-mTOR	: Proteína mTOR fosforilada
PVDF	: Fluoruro de polivinilideno
p85	: Subunidad regulatoria de la PI3K
p110	: Subunidad catalítica de la PI3K
Rab	: Familia de GTPasas <i>ras-related in brain</i>
Rac1	: Proteína <i>ras-related C3 botulin toxin substrate 1</i>
RCAN1	: Proteína reguladora de calcineurina 1
RCAN1.4	: Proteína reguladora de calcineurina 1 isoforma 4
RE	: Retículo endoplasmático
Rho	: GTPasas pequeñas de la familia Rho
RI	: Receptor de insulina
ROI	: Región óptica de interés

RuRed	: Rojo rutenio
RyR	: Receptor de rianodina
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SEM	: Error estándar del promedio
Ser	: Aminoácido serina
SERCA	: ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarco/endoplasmático
SH2	: Dominio de homología a Src 2
siControl	: ARN interferente pequeño de secuencia aleatoria
siHerpud1	: ARN interferente pequeño específico para Herpud1
SNAP23	: Proteína <i>synaptosomal-associated protein 23</i>
TBS	: Tampón tris salino
Thr	: Aminoácido treonina
Tyr	: Aminoácido tirosina
ULD	: Dominio tipo ubiquitina
VAMP2	: Proteína <i>vesicle associated membrane protein 2</i>
VDAC1	: Canal iónico dependiente de voltaje 1
WT	: Cepa silvestre o <i>wild type</i>
XeB	: Xestospongina B
XeC	: Xestospongina C
2-NBDG	: 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose

## RESUMEN

El músculo esquelético es un tejido esencial en la mantención de la homeostasis de la glucosa en el organismo. Alteraciones en la respuesta a la hormona insulina en este tejido se relacionan directamente con el desarrollo de resistencia a insulina y diabetes tipo 2. Los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de resistencia a insulina en el músculo esquelético no se conocen con claridad. En este sentido, trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que las alteraciones en la homeostasis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular disminuyen la respuesta a insulina en el músculo esquelético y cardíaco.

HERPUD1 es una proteína ubicada en la membrana del retículo endoplasmático (RE), involucrada en la mantención de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en condiciones de estrés celular. Se ha descrito que el ratón *knockout* general para la proteína Herpud1 es intolerante a la glucosa, sin mostrar alteraciones en la secreción de insulina. Dado que el músculo esquelético es principal encargado de la incorporación de glucosa dependiente de insulina en condiciones postprandiales, en esta tesis proponemos que la proteína Herpud1 es necesaria para la adecuada respuesta a insulina en el músculo esquelético. Proponemos además que Herpud1 regula la respuesta a insulina a través de la mantención de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y su efecto sobre la actividad de la serina-treonina fosfatasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$  calcineurina. Previamente se ha

descrito que esta fosfatasa interactúa con Akt, disminuyendo la señalización de insulina en cardiomiocitos.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el silenciamiento de la proteína Herpud1 disminuye la captación de glucosa, la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática y la señalización inducida por insulina en la línea celular de músculo esquelético de rata L6 (miotubos). También observamos una disminución en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en el músculo sóleo del ratón *knockout* general para la proteína Herpud1. El silenciamiento de Herpud1 también se asocia a un aumento en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y a una disminución en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial dependientes del  $\text{IP}_3\text{R}$  en los miotubos L6. Este desbalance en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fue acompañado de un aumento en la actividad de calcineurina. Demostramos además que calcineurina regula la respuesta a insulina en los miotubos L6, y que la inhibición de calcineurina restablece la respuesta a insulina en las células L6 *knockdown* para Herpud1. Basado en estos resultados, concluimos que la proteína Herpud1 es necesaria para la respuesta a insulina en los miotubos L6 a través de la regulación del eje  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina.

## SUMMARY

Skeletal muscle is an essential tissue in the maintenance of glucose homeostasis in the body. Alterations in the response to insulin in skeletal muscle are directly related to the development of insulin resistance and type 2 diabetes. The molecular mechanisms involved in the development of insulin resistance in this tissue are incompletely understood. In this sense, previous works from our laboratory show that alterations in intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) homeostasis decreases the insulin response in skeletal and cardiac muscle.

Herpud1 is a protein located in the membrane of endoplasmic reticulum (ER), involved in the maintenance of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis under stress conditions. It has been reported that the general Herpud1 knockout mice display intolerance to a glucose load without showing altered insulin secretion. Given that skeletal muscle is primarily responsible for insulin-dependent glucose incorporation in postprandial conditions, in this thesis we propose that Herpud1 is necessary for the adequate insulin response in this tissue. We also propose that Herpud1 regulates the insulin response through maintenance of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and its effect on the activity of the serine-threonine phosphatase activated by  $\text{Ca}^{2+}$  calcineurin. Previously it has been described that calcineurin interacts with Akt, decreasing insulin signaling in cardiomyocytes.

The results obtained in this work show that the silencing of Herpud1 decreases glucose uptake, GLUT4 translocation to plasma membrane and insulin-dependent intracellular signaling in rat derived skeletal muscle cell line L6 (myotubes). We also observed a decrease in insulin-induced Akt (Ser-473) phosphorylation in soleus muscle from general Herpud1-knockout mice. The silencing of Herpud1 is also associated with an increase in the cytosolic  $Ca^{2+}$  response and a decrease in the mitochondrial  $Ca^{2+}$  response induced by IP<sub>3</sub>R agonist histamine in L6 myotubes. This imbalance in the intracellular  $Ca^{2+}$  response was accompanied by an increase in calcineurin activity. We also show that calcineurin regulates insulin response in L6 myotubes, and that the inhibition of calcineurin restores the insulin response in Herpud1-depleted L6 myotubes. Based on these findings, we conclude that Herpud1 is necessary for the insulin response in L6 myotubes through its role in the regulation of  $Ca^{2+}$ -calcineurin axis.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Músculo esquelético

El músculo esquelético es el tejido más extenso del organismo, dando cuenta de aproximadamente un 40% del peso corporal en humanos (**Zurlo y cols., 1990**). Este tejido está compuesto principalmente por agua (75%), proteínas (20%) y otras sustancias como sales inorgánicas, lípidos y carbohidratos (5%) (**Frontera y Ochala, 2014**). Una característica esencial del músculo esquelético es su gran plasticidad, evidenciada por el equilibrio constante entre los procesos de síntesis y degradación de proteínas, además de la heterogeneidad de los tipos de fibras presentes en cada músculo (**Schiaffino y Reggiani, 2011**). Estos procesos son regulados por diversos factores como el estado nutricional, el balance hormonal, la actividad física y la presencia de diversos estados patológicos (**Frontera y Ochala, 2014**). La función principal del músculo esquelético es la conversión de energía química en fuerza mecánica para generar la contracción muscular, necesaria para mantener la postura y permitir el movimiento corporal (**Frontera y Ochala, 2014**). La contracción de la musculatura esquelética es de control voluntario, y depende de la inervación de las fibras musculares por neuronas motoras (**Schiaffino y Reggiani, 2011**).

Además de su función motora, el músculo esquelético participa en la regulación de la temperatura corporal y cumple importantes funciones metabólicas (**trovato y cols., 2016**). Este tejido presenta una arquitectura

altamente compleja y organizada, la cual está íntimamente relacionada con sus funciones.

### **1.1.1 Estructura muscular**

El músculo se encuentra rodeado por una capa de tejido conectivo, llamada epimisio, la cual está conectada al tendón, la estructura responsable de la inserción del músculo al hueso **(Trovato y cols., 2016)**. Cada músculo está formado por fibras musculares agrupadas en haces, cada uno rodeado por una segunda capa de tejido conectivo, el perimisio **(Trovato y cols., 2016)**. Además, cada fibra muscular, correspondiente a una célula muscular, está cubierta con una tercera capa de tejido conectivo llamada endomisio **(Fortin y cols., 2014)**. Estas tres capas de tejido conectivo le aportan la vascularización y la inervación nerviosa al músculo. Cada fibra muscular se forma a partir de la fusión de varios mioblastos monocleados, formando células multinucleadas de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1 cm de largo **(Fortin y cols., 2014)**. La membrana plasmática de la célula muscular (el sarcolema) posee invaginaciones conocidas como túbulos transversos (túbulos T), importantes en la transmisión de los potenciales de acción desde la neurona motora hacia la célula muscular **(Frontera y Ochala, 2014)**. Entre el sarcolema y la membrana basal se encuentran una serie de células satélite, que participan en los procesos de crecimiento, reparación y regeneración muscular **(Trovato y cols., 2016)**. Cada célula muscular es recorrida por millones de miofilamentos de actina y miosina,

los cuales se organizan de manera ordenada formando los sarcómeros, la unidad contráctil del músculo esquelético **(Frontera y Ochala, 2014)**. Estas proteínas, actina y miosina, representan aproximadamente un 80% del contenido proteico de la fibra muscular **(Frontera y Ochala, 2014)**. El retículo sarcoplásmico de la célula muscular es el principal lugar de almacenamiento, liberación y recaptación de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), necesario para la contracción muscular **(Schiaffino y Reggiani, 2011)**. El  $\text{Ca}^{2+}$  se almacena mayoritariamente en las vesículas terminales, las cuales se localizan en la cercanía de los túbulos T **(Schiaffino y Reggiani, 2011)**. La energía necesaria para la contracción muscular se genera mayoritariamente a partir de la respiración mitocondrial. Las mitocondrias forman una red tridimensional a través de la célula muscular, localizándose principalmente en las cercanías del sarcolema y en el espacio intermiofibrilar **(Schiaffino y Reggiani, 2011)**.

La complejidad de la estructura muscular se ve reflejada en la presencia de fibras musculares con diferentes características estructurales y funcionales en un mismo músculo. De modo general, las fibras musculares se pueden dividir en fibras tipo 1 y tipo 2. Las fibras tipo 1 posee una mayor cantidad de mitocondrias y de mioglobina (que le otorga su apariencia de color rojo), su metabolismo es oxidativo y su velocidad de contracción es comparativamente más lenta, además de ser resistentes a la fatiga **(Schiaffino y Reggiani, 2011)**. Estas fibras predominan en músculos posturales, como el músculo sóleo en la pierna **(Lieberman y Marks, 2008)**. Por otro lado, las fibras tipo 2 poseen un menor

número de mitocondrias, una mayor expresión de enzimas glicolíticas y su contracción es rápida, con baja resistencia a la fatiga. Estas fibras predominan en músculos largos de las extremidades, de movimientos rápidos, como el extensor largo de los dedos (EDL) **(Lieberman y Marks, 2008)**. Se ha demostrado la existencia de fibras con características intermedias entre los tipos de fibras antes mencionados, agregando mayores niveles de complejidad y especialización a la función muscular **(Botinelli y cols., 1994; Pette y Staron, 1990)**.

### **1.1.2 Metabolismo en el músculo esquelético**

Como se mencionó previamente, el músculo esquelético cumple un rol importante en la regulación del metabolismo energético del organismo. En condiciones de reposo, el músculo esquelético da cuenta de un 30% de la tasa metabólica en adultos **(Zurlo y cols., 1990)**. La producción de ATP en el músculo esquelético ocurre a partir de diversos sustratos. En presencia de nutrientes (especialmente glucosa) en la sangre, aumenta la secreción de la hormona insulina desde las células  $\beta$  del páncreas. Insulina estimula la captación de glucosa, su almacenamiento como glicógeno y su utilización como sustrato metabólico para la producción de ATP en el músculo esquelético **(Lieberman y Marks, 2008)**. Por otro lado, en condiciones de ayuno los niveles de insulina se mantienen bajos y se favorece la utilización de ácidos grasos como sustrato energético **(Stump y cols., 2006)**. En condiciones de ejercicio, la demanda de

ATP del músculo esquelético se incrementa considerablemente, lo que estimula la captación y utilización tanto de glucosa como de ácidos grasos (**Lieberman y Marks, 2008**). Las reservas de ATP en el músculo esquelético sólo permiten suplir las necesidades energéticas por algunos segundos (**Lieberman y Marks, 2008**). La hidrólisis de creatina fosfato por la enzima creatina quinasa aporta ATP de manera rápida, pero también por un periodo corto de tiempo (**Lieberman y Marks, 2008**). La producción de ATP a través de la glicólisis es de duración limitada, debido a la acumulación de lactato y la consiguiente disminución del pH intracelular (**Lieberman y Marks, 2008**). La generación de ATP a largo plazo depende de la fosforilación oxidativa, la cual requiere de un aporte adecuado de oxígeno (**Lieberman y Marks, 2008**).

Como ya mencionamos, insulina regula la captación y el metabolismo de la glucosa en diversos tejidos. Del *clearance* total de glucosa plasmática inducido por insulina, aproximadamente un 80% es dependiente del ingreso de glucosa al músculo esquelético. Debido a la importancia cuantitativa de este fenómeno, alteraciones en la respuesta a insulina en el músculo esquelético afectan no solo a la flexibilidad metabólica muscular, sino también al control glicémico y a la homeostasis energética global (**De Fronzo y cols., 1981**).

## **1.2 Insulina**

La insulina es una hormona peptídica secretada desde las células  $\beta$  pancreáticas en respuesta a un incremento en la glicemia (**Poloz y Stambolic,**

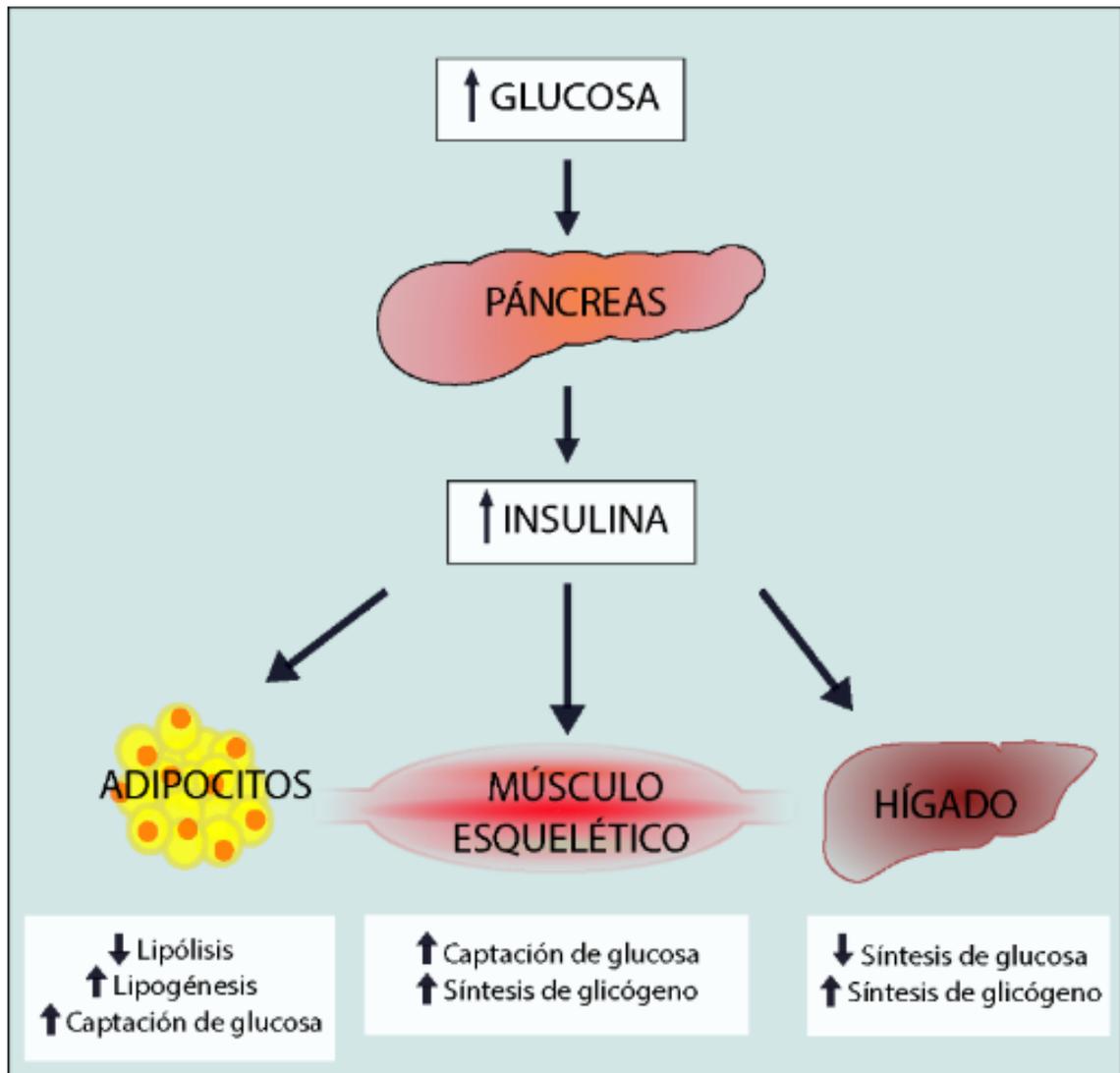
**2015).** Esta hormona cumple un rol esencial en la regulación del metabolismo energético del organismo, siendo la principal señal anabólica en condiciones de abundancia de nutrientes **(Poloz y Stambolic, 2015)**. Insulina estimula la captación de glucosa en tejido adiposo y músculo esquelético, además de inhibir la producción de glucosa hepática **(Poloz y Stambolic, 2015)**. Esta hormona también favorece el almacenamiento del exceso de glucosa en forma de glicógeno en hígado y músculo esquelético **(Poloz y Stambolic, 2015)**. Insulina no sólo regula la homeostasis de la glucosa, sino también modula el transporte y almacenamiento de lípidos. En adipocitos, insulina inhibe la lipólisis de triglicéridos e induce la lipogénesis y la captación de ácidos grasos **(Poloz y Stambolic, 2015) (Figura 1)**. Los efectos biológicos de esta hormona son mediados por vías de señalización intracelular que se encuentran bien definidas en los diferentes tejidos.

### **1.2.1 Señalización de insulina en el músculo esquelético**

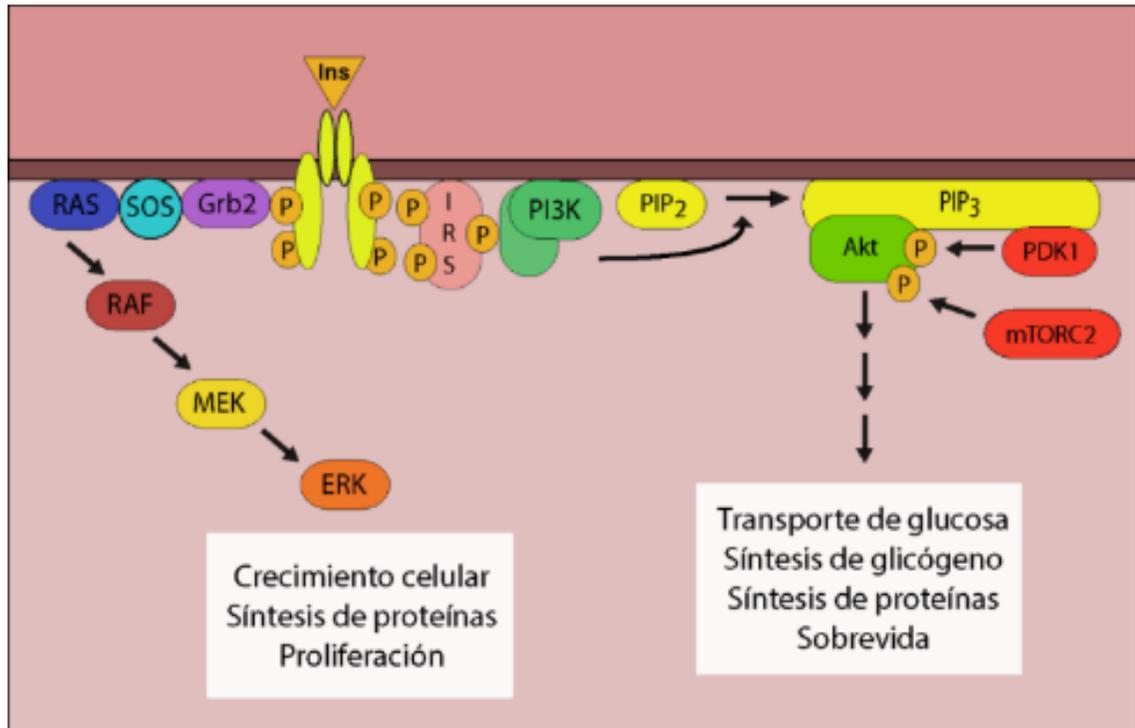
Insulina ejerce sus acciones a través de la unión a receptores de membrana plasmática específicos, los cuales pertenecen a la superfamilia de los receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca **(Yip y Ottensmeyer, 2003)**. Estructuralmente, el receptor de insulina (RI) es un heterodímero de la forma  $(\alpha\beta)_2$ , con ambos dímeros unidos mediante puentes disulfuro **(Yip y Ottensmeyer, 2003)**. La unión de insulina a las subunidades  $\alpha$  (extracelulares) genera un cambio conformacional en las subunidades  $\beta$

(transmembrana), lo que induce su actividad tirosina quinasa (**Boucher y cols., 2014**). Esto lleva a la transfosforilación de las subunidades  $\beta$ , lo que incrementa su actividad catalítica y permite el reclutamiento de proteínas sustrato del RI (**Boucher y cols., 2014**) (**Figura 2**). Los sustratos del receptor de insulina mejor caracterizados pertenecen a la familia IRS (*insulin receptor substrate*), los cuales actúan como proteínas de andamiaje para organizar y localizar la respuesta a insulina. Las proteínas IRS son reclutadas a la membrana plasmática a través de sus dominios de unión a residuos fosfotirosina (PHB) y sus dominios de unión a membrana plasmática (PH) (**Taniguchi y cols., 2006**). Posteriormente, estas proteínas son fosforiladas en múltiples residuos tirosina por el RI activo, generando lugares de interacción para proteínas con dominios SH2 (**Taniguchi y cols., 2006**). Una de estas proteínas es la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) clase 1A, que es un heterodímero formado por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad regulatoria (p85) (**Vadas y cols., 2011**). La subunidad regulatoria de PI3K posee 2 dominios SH2 (**Vadas y cols., 2011**). La unión de la subunidad regulatoria a los residuos fosforilados en IRS activa la subunidad catalítica, lo que gatilla la fosforilación del fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>), un lípido abundante en la membrana plasmática, generando el mensajero lipídico fosfatidilinositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>) (**Boucher y cols., 2014**). La quinasa PDK1 posee un dominio PH (de unión a PIP<sub>3</sub>) y es reclutada a la membrana plasmática por la activación de PI3K (**Pearce y cols., 2010**). Uno de los blancos de PDK1 es la proteína AKT, la cual representa un nodo central en la vía de señalización de insulina (**Taniguchi**

**y cols., 2006).** La activación de AKT es dependiente de su fosforilación en el residuo Thr-308, mediada por PDK1, y de una segunda fosforilación en el residuo Ser-473, la cual es dependiente del complejo 2 de MTOR (**Alessi y cols., 1997; Sarbassov y cols, 2005**). Se conocen 3 isoformas de AKT, siendo AKT2 la isoforma más importante para las funciones metabólicas de insulina (**Boucher y cols., 2014**). Una vez activa, AKT regula una serie de procesos intracelulares, dentro de los que se encuentran el transporte de glucosa, la síntesis de glicógeno, la síntesis de proteínas y la supervivencia celular (**Manning y Cantley, 2007**). De forma paralela a esta vía funciona el sistema transduccional RAS-ERK, el cual es independiente de PI3K (**Taniguchi y cols., 2006**). La vía RAS-ERK es la responsable de los procesos de proliferación, diferenciación e hipertrofia inducidos por insulina (**Taniguchi y cols., 2006**) (**Figura 2**). De todos los procesos dependientes de insulina en el músculo esquelético, la captación de glucosa es el paso limitante en el metabolismo de esta hexosa a nivel muscular (**Manning y Cantley, 2007**).



**Figura 1: Acciones metabólicas de insulina.** En respuesta a un incremento en los niveles de glucosa en la sangre, el páncreas secreta insulina al torrente sanguíneo. Esta hormona regula el metabolismo de la glucosa y los lípidos en diversos tejidos, favoreciendo las reacciones anabólicas (**adaptado de Poloz y Stambolic, 2015**).



**Figura 2: Señalización de insulina en el músculo esquelético.** La unión de insulina a su receptor transmembrana gatilla una cascada de señalización que posee 2 ramas principales: La vía Ras-ERK (asociada principalmente a proliferación) y la vía PI3K-Akt (relacionada a supervivencia y metabolismo). (Adaptado de Poloz y Stambolic, 2015).

### 1.2.2 Transporte de glucosa dependiente de insulina en el músculo esquelético

El primer antecedente de la captación de glucosa inducida por insulina en el músculo esquelético se remonta al trabajo de Einar Lundsgaard en 1939 (Lundsgaard, 1939). Utilizando un sistema de perfusión para pata posterior de gato aislada, Lundsgaard describió la captación dosis-dependiente de glucosa en presencia de insulina (Lundsgaard, 1939). Desde ese momento, diversos

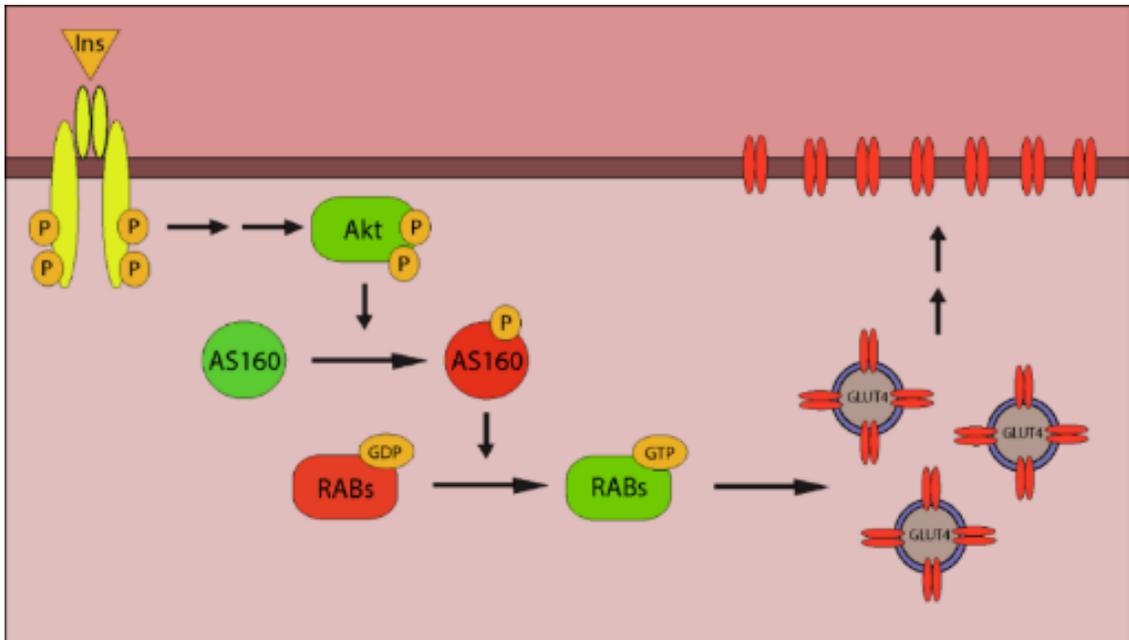
trabajos han profundizado en los mecanismos moleculares involucrados en este proceso. La evidencia existente a la fecha demuestra que la entrada de glucosa a la célula muscular ocurre mediante un proceso de difusión facilitada, mediado por transportadores de la familia GLUT/SLC2A. Los transportadores de la familia GLUT son glicoproteínas con 12 segmentos transmembrana, caracterizados por no estar acoplados a ningún sistema de generación de energía, favoreciendo el transporte bidireccional de sustratos de acuerdo a su gradiente de concentración **(Yamamoto y Ashida, 2012)**. Estos transportadores son altamente estereoselectivos, presentan afinidad diferencial por sustratos, y se han descrito 14 miembros de esta familia a la fecha **(Yamamoto y cols., 2011)**. En el músculo esquelético en particular se ha descrito la expresión de GLUT1, 3, 4, 5 y 12 **(Klip y cols., 1996; Stuart y cols., 2000; Stuart y cols., 2006)**. A excepción del GLUT4, todos se expresan basalmente en la membrana plasmática de la célula muscular **(Klip y cols., 1996)**. Por otro lado, el transportador de glucosa GLUT4 se encuentra mayoritariamente en compartimentos intracelulares específicos, conocidos como vesículas enriquecidas en GLUT4 (GSVs), y es rápidamente redistribuido a la membrana plasmática en presencia de insulina, siendo el efector final de la cascada de señalización activada por esta hormona **(Klip y cols., 2014)**.

Como se mencionó con anterioridad, la serina/treonina quinasa AKT es uno de los nodos centrales en la cascada de señalización activada por insulina. Uno de los blancos de AKT es la proteína AS160, la cual es una GAP (proteína

activadora de GTPasa) de proteínas G pequeñas de la familia RAB (**Miinea y cols., 2005**) (**Figura 3**). En condiciones basales, AS160 se encuentra activa, funcionando como un freno constitutivo de la actividad de sus sustratos. La fosforilación de AS160, mediada por AKT, inhibe su actividad GTPasa, permitiendo la activación de diversos sustratos (**Peck y cols., 2009**). Las proteínas de la familia RAB son reguladoras esenciales del tráfico vesicular, permitiendo la formación, movilización y fusión de vesículas (**Seabra y Wasmeier, 2004**). En particular, se ha descrito la participación esencial de RAB8 y RAB14 en la translocación del transportador GLUT4 hacia la membrana plasmática en la línea celular derivada de músculo esquelético L6 (**Ishikura y cols., 2007**). Trabajos posteriores también han demostrado la participación de RAB13 en este proceso (**Sun y cols., 2010**). Por otro lado, en adipocitos se ha descrito que RAB10 es necesaria para la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la superficie celular, con una contribución menor de RAB8A y RAB14 (**Sano y cols., 2008**). El tránsito vesicular desde el citoplasma hacia la membrana plasmática requiere de la participación de motores moleculares, los cuales median el desplazamiento de cargos a través de los filamentos de actina. Recientemente, Roland y cols. han descrito la interacción de RAB8A y RAB10 con miosina V (a, b, y c), la cual forma homodímeros que interactúan con filamentos de actina y con GTPasas pequeñas mediante su cola C terminal (**Roland y cols., 2009**). En el músculo esquelético intacto se expresa exclusivamente miosina Va, la cual permite el tráfico hacia la superficie de las

GSVs previa interacción con RAB8A, fenómeno que es favorecido por insulina **(Sun y cols., 2014)**. Otro motor molecular relacionado con la translocación de GLUT4 hacia la superficie celular es miosina 1c, la cual está presente en la interacción de las GSVs con los filamentos de actina corticales en las cercanías de la superficie celular **(Boguslavsky y cols., 2012)**. También se ha descrito la participación de la proteína  $\alpha$ -actinina4, la cual favorece la retención de las GSVs en la zona cortical **(Talior-Volodarsky y cols., 2008)**. El proceso finaliza con la fusión de las GSVs con la membrana plasmática, la cual requiere la participación de las proteínas VAMP2 (ubicadas en las GSVs), STX4 y SNAP23 (ubicadas en la membrana plasmática) **(Kawaguchi y cols., 2010; Randhawa y cols., 2004)**. De manera paralela a la vía dependiente de AKT, se ha descrito la activación (dependiente de PI3K) de la GTPasa pequeña de la familia Rho RAC1 **(JeBailey y cols., 2007)**. La activación de RAC1, dependiente de insulina, lleva a la formación de filamentos de actina corticales, mediada por el complejo ARP2/3, proceso que se intercala con ciclos de despolimerización dependientes de CFL1 **(Chiu y cols., 2010)**. Estos ciclos iterativos son necesarios para la correcta inserción del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana plasmática **(Chiu y cols., 2010)**. Diversos trabajos proponen que, en paralelo a la cascada de señalización clásica gatillada por insulina, esta hormona induce señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula muscular **(Contreras-Ferrat y cols., 2014a)**. Por otro lado, se ha descrito que alteraciones en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular disminuyen la respuesta inducida por insulina en células musculares cardíacas y esqueléticas

(Contreras-Ferrat y cols., 2010; del Campo y cols., 2013; Gutiérrez y cols., 2014; Contreras-Ferrat y cols., 2014) . Estos antecedentes dan cuenta de la posible participación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados con las acciones de insulina en el músculo esquelético.



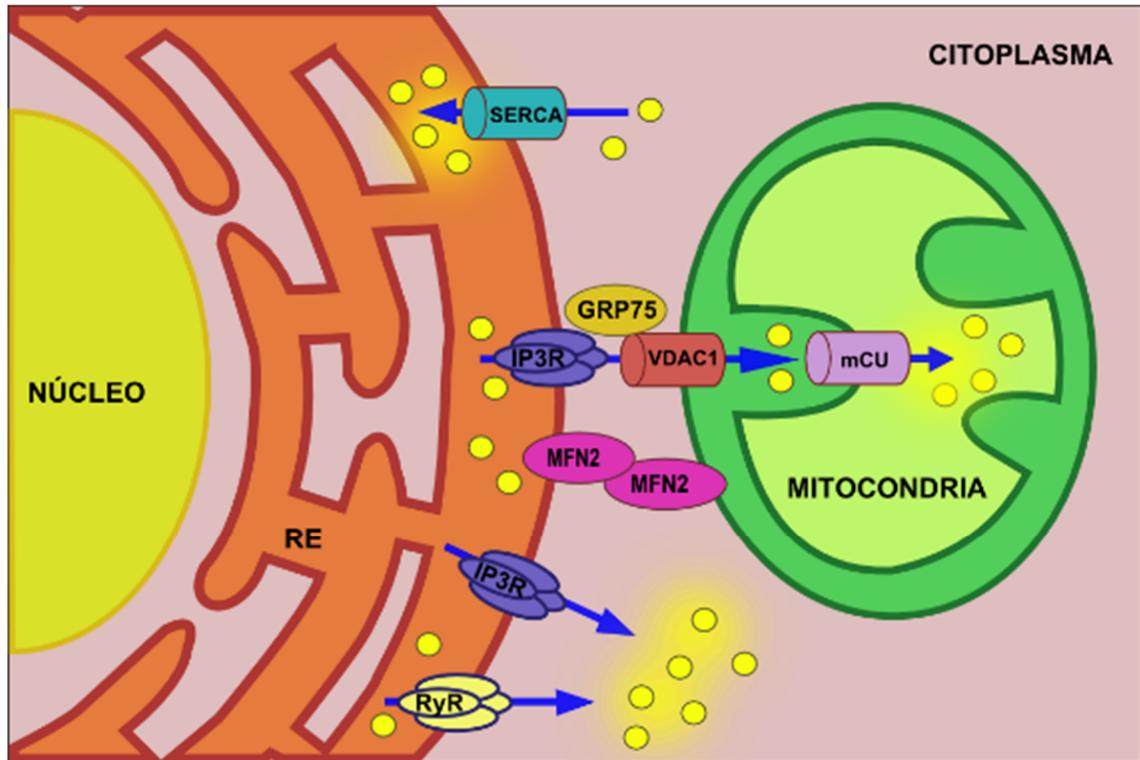
**Figura 3: Efecto de insulina en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática.** La activación de la cascada de señalización de insulina lleva a la activación de Akt (ver Figura 2). Akt fosforila a AS160, inhibiendo su actividad GTPasa. Esto favorece la activación de diversas proteínas de la familia Rab, las cuales median el tráfico de las GSVs hacia la membrana plasmática. El rápido incremento de la presencia de GLUT4 en la membrana plasmática se traduce en un aumento en la incorporación de glucosa a las células musculares.

### 1.3 Señalización de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en el músculo esquelético

El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es un mediador central en el acoplamiento excitación-contracción en las células musculares (**Kuo y Ehrlich, 2015**). Además de su rol en la contracción, cambios locales y regulados en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular median una serie de señales importantes en la regulación del metabolismo, transcripción génica, hipertrofia, diferenciación, vías de muerte y sobrevivencia celular, organización del citoesqueleto y tráfico vesicular (**Contreras-Ferrat y cols., 2014a**). Los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma son finamente regulados, manteniendo una concentración en equilibrio de entre 100 y 200 nM en la mayoría de los tipos celulares (**Contreras-Ferrat y cols., 2014a**). La mantención de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de rangos fisiológicos requiere de la participación de una serie de tampones, canales, transportadores y bombas ubicados tanto membrana plasmática como en los diversos compartimentos intracelulares (**Gehlert y cols., 2015**). El retículo endoplasmático (RE) es el principal reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, con una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el rango micromolar, lo que lo convierte en una importante fuente para la generación rápida y regulada de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de la apertura de canales activados por diversos estímulos (**Contreras-Ferrat y cols., 2014a**). En el músculo esquelético, estos canales son el receptor de inositol 1, 4, 5 trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y el receptor de rianodina (RYR) (**Figura 4**). El  $\text{IP}_3\text{R}$  responde al incremento en los niveles de  $\text{IP}_3$  intracelulares, producto de la activación de receptores acoplados a proteína Gq en la membrana plasmática. La activación

de estos receptores causa la activación de fosfolipasa C, la cual genera  $IP_3$  y diacilglicerol (DAG) a partir de lípidos presentes en la membrana plasmática **(Mikoshiba, 2007)**. Se ha demostrado que la señal de  $Ca^{2+}$  dependiente de  $IP_3R$  tiene impacto en el metabolismo y en la expresión génica **(Contreras-Ferrat y cols., 2014a)**. Por otro lado, la activación del RYR es mediada por la depolarización de la membrana plasmática y está asociada al acoplamiento excitación-contracción **(Capes y cols., 2011)**. También se ha ligado al RYR al eflujo pasivo de  $Ca^{2+}$  desde el RE **(Eltit y cols., 2010)**. El ingreso de  $Ca^{2+}$  hacia el RE desde el citoplasma es mediado por la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del RE (SERCA) **(Gehlert y cols., 2015)**. La mitocondria también juega un rol importante en la mantención de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular. En células musculares esqueléticas, este organelo regula tanto la amplitud como la duración de las señales de  $Ca^{2+}$  en el citosol **(Eisner y cols., 2010)**. El ingreso de  $Ca^{2+}$  a la matriz mitocondrial involucra el paso del ion a través de la membrana mitocondrial externa (MME) y la membrana mitocondrial interna (MMI). La MME es permeable a solutos de tamaño menor a 5 kDa **(Rizzuto y cols., 2012)**. El paso de  $Ca^{2+}$  a través de la MME ocurre a través de VDAC1 **(Rizzuto y cols., 2012)**. Por otro lado, el paso de  $Ca^{2+}$  a través de la MMI ocurre a través del uniporter de  $Ca^{2+}$  mitocondrial (MCU), el cual es un canal altamente selectivo y de baja conductancia **(Kirichok y cols., 2004)**. Dada la baja afinidad del MCU por  $Ca^{2+}$ , el ingreso de este ion a la mitocondria ocurre en microdominios de alta concentración, los que se generan en los lugares de proximidad entre la

mitocondria y los canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la membrana del RE (**Csordás y cols., 1999; Rizzuto y cols., 1998**). En este contexto, se ha observado la interacción física entre IP3R y VDAC1 a través de la chaperona GRP75, lo que favorece la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ambos organelos (**Szabadkai y cols., 2006**). Otra proteína relacionada con la interacción entre el RE y la mitocondria es MFN2, la cual se ubica en ambos organelos, pudiendo dimerizar (**de Brito y Scorrano, 2008**). El silenciamiento de MFN2 disminuye el acercamiento entre RE y mitocondria, lo que funcionalmente se traduce en una disminución en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (**de Brito y Scorrano, 2008; Ainbinder y cols., 2014; Naon y cols., 2016**). Sin embargo, recientemente se ha descrito que el silenciamiento de MFN2 tendría un efecto totalmente opuesto al descrito inicialmente, por lo que su papel en la comunicación ER-mitocondria es controversial (**Filadi y cols., 2015; Leal y cols., 2016; Harmon y cols., 2017**) (**Figura 4**).



**Figura 4: Homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.** El RE es el principal reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE es mediada por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  IP<sub>3</sub>R y RYR. Se ha descrito la participación de diversas proteínas en la interacción entre el RE y la mitocondria, lo que favorece la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  entre ambos organelos (GRP75, MFN2). El ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la MMI ocurre vía MCU. Por otro lado, la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE ocurre mediante la ATPasa SERCA.

### 1.3.1 Rol del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular en la respuesta a insulina en células musculares

Diversos trabajos demuestran la importancia de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas y cardíacas. Previamente, nuestro laboratorio ha demostrado que la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria disminuye la respuesta a insulina en diversos

modelos celulares (**Del Campo y cols., 2013; Contreras-Ferrat y 2014b; Gutierrez y cols., 2014**). En miotubos L6, la inhibición del IP<sub>3</sub>R mediante el uso de xestospongina B (XeB) disminuye la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática inducida por insulina (**Contreras-Ferrat y cols., 2014b**). En el mismo trabajo, se observa que la inhibición de MCU mediante el uso de rojo rutenio (RuRed) disminuye la translocación del transportador GLUT4 a la superficie celular y la captación de glucosa inducidas por insulina (**Contreras-Ferrat y cols., 2014b**). Por otro lado, el uso de RuRed disminuye la fosforilación de Akt (Ser-473) y la translocación del transportador GLUT4 inducidas por insulina en mioblastos L6 (**Del Campo y cols., 2013**). Además, en cardiomiocitos de rata neonata se ha descrito que xestospongina C (XeC), RuRed y el silenciamiento del MCU mediante un ARN interferente disminuyen la fosforilación de Akt (Ser-473) y la captación de glucosa inducidas por insulina (**Contreras-Ferrat y cols., 2010; Gutiérrez y cols., 2014**). Antecedentes en células hepáticas van en la misma dirección: Tubbs y cols. han demostrado que el silenciamiento de proteínas relacionadas a la interacción física entre el RE y la mitocondria (GRP75, IP<sub>3</sub>R1, VDAC1, CYPD) disminuyen la respuesta a insulina en células HuH7 (**Tubbs y cols., 2014**). Recientemente, el mismo grupo ha relacionado directamente las alteraciones en la respuesta a insulina en este modelo con alteraciones en la transferencia de Ca<sup>2+</sup> desde el RE hacia la mitocondria (**Rieusset y cols., 2015**). El mecanismo por el cual la inhibición de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la mitocondria afecta la vía de señalización de

insulina se desconoce. Dada la importancia de la mitocondria en la modulación de la amplitud y la duración de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicas, nosotros proponemos que la disminución en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria podría asociarse a un incremento en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol, con la consiguiente activación de vías de señalización dependientes de este catión que pudiesen impactar directamente sobre la cascada de señalización activada por insulina (**Eisner y cols., 2010**).

### **1.3.2 Calcineurina: Enlace potencial entre el $\text{Ca}^{2+}$ intracelular y la señalización de insulina**

Calcineurina es una serina/treonina fosfatasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, altamente conservada desde levaduras hasta mamíferos (**Li y cols., 2011**). Se ha demostrado que, en cardiomiocitos de rata neonata, calcineurina interactúa físicamente con la serina/treonina quinasa Akt, disminuyendo su estado de fosforilación y alterando la cascada de señalización río debajo de insulina (**Ni y cols., 2007**). Este antecedente plantea la posibilidad de que calcineurina pueda participar en la disminución en la respuesta a insulina causada por las alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. La relación entre calcineurina y la respuesta a insulina en el músculo esquelético se desconoce.

Calcineurina es un efector importante en la transducción de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, regulando procesos a corto y largo plazo (**Li y cols., 2011**). Esta

fosfatasa está formada por una subunidad catalítica (calcineurina A, de aproximadamente 60 kDa) y una subunidad regulatoria (calcineurina B, de aproximadamente 19 kDa). Calcineurina A está compuesta por un dominio catalítico (en el extremo N terminal), un dominio de interacción con calcineurina B, un dominio de interacción con calmodulina y un péptido autoinhibitorio. Por otro lado, calcineurina B consta de 4 dominios “*EF hands*” de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (**Li y cols., 2011**). Los fármacos inmunosupresores ciclosporina A (CsA) y tacrolimus (FK506) actúan inhibiendo a calcineurina, mediante su interacción con las inmunofilinas ciclofilina A y FKBP12, respectivamente (**Liu y cols., 1991**). Las respuestas celulares inducidas por calcineurina varían según el estímulo que las induce y el tipo celular. En el músculo esquelético, diversos trabajos describen la participación de calcineurina en el proceso de hipertrofia. En líneas celulares derivadas de músculo esquelético (L6 y C2C12), la inhibición de calcineurina previene el desarrollo de hipertrofia inducida por IGF-1 (**Musarò y cols., 1999; Semsarian y cols., 1999**). Además, el tratamiento con CsA durante 4 semanas evita el desarrollo de hipertrofia muscular inducida por sobrecarga de trabajo en ratones (**Dunn y cols., 1999**). Un trabajo reciente otorga a calcineurina un rol en la regulación del metabolismo energético del organismo. Pfluger y cols. demostraron que los ratones KO para calcineurina en el músculo esquelético están protegidos del desarrollo de la obesidad y las alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa (**Pfluger y cols., 2015**). Esto se relaciona con un incremento en la tasa de respiración mitocondrial y elongación de las

mitocondrias en el ratón KO (**Pfluger y cols., 2015**). Se observa además un estado de hiperfosforilación de la proteína DRP1 (sustrato de calcineurina), proteína esencial en el proceso de fisión mitocondrial, lo cual explicaría el cambio morfológico observado en las mitocondrias (**Pfluger y cols., 2015**).

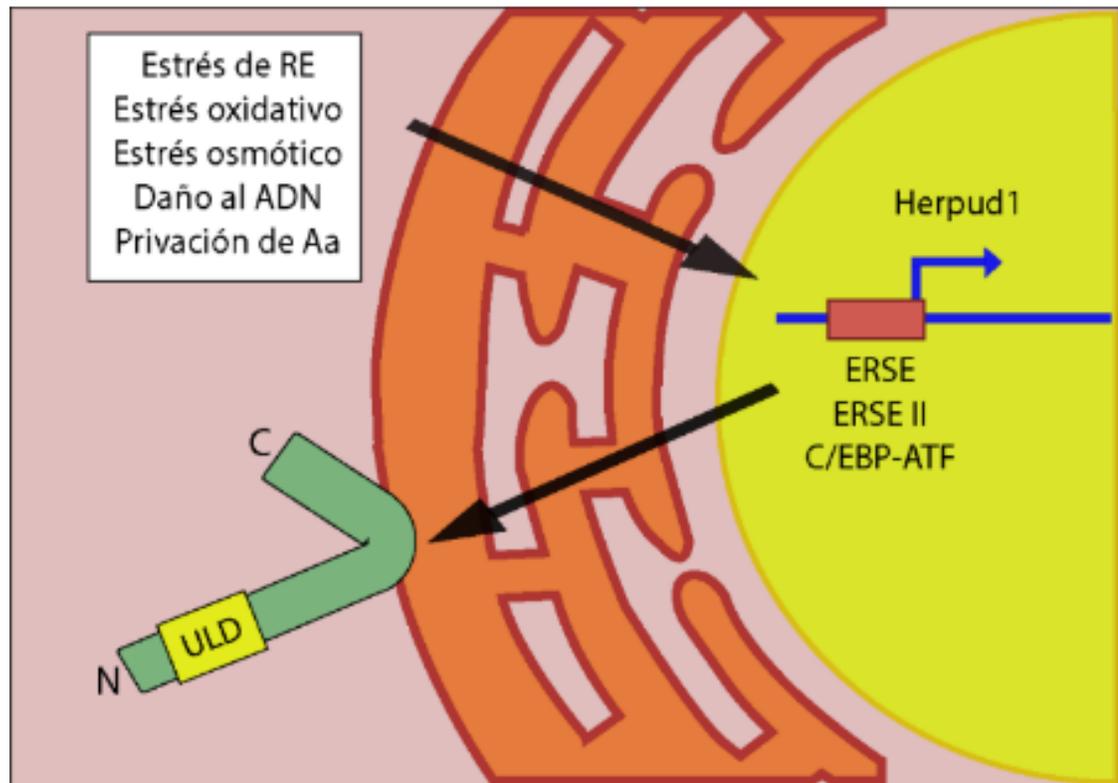
En base a lo planteado en este apartado, podemos hipotetizar que cualquier condición que afecte la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular podría generar la activación de calcineurina, alterando a través de esta fosfatasa la fosforilación de AKT y su señalización río abajo.

#### **1.4 Homocysteine inducible ER Protein with Ubiquitin like Domain 1 (HERPUD1 o HERP)**

HERPUD1 es una proteína integral de la membrana del RE, inducible ante condiciones de estrés celular (**Figura 5**). Esta proteína fue descrita por 2 grupos de forma independiente en el año 2000: Van Laar y cols., en la búsqueda de nuevos genes inducibles por daño al ADN, identificaron una proteína inducible por el agente alquilante metil-metanosulfonato (MMS), la cual fue bautizada como MIF1 (*MMS-inducible fragment 1*) (**Van Laar y cols., 2000**). En este trabajo se describe la inducción de la proteína por MMS, estrés osmótico y tunicamicina (**Van Laar y cols., 2000**). El incremento de MIF1 inducido por tunicamicina requiere la presencia del elemento de respuesta ERSE (*ER stress response element*) en su promotor (**Van Laar y cols., 2000**). Paralelamente, Kokame y cols. describieron una proteína de 54 kDa inducible por homocisteína, la cual

llamaron HERP (*homocysteine inducible ER protein*) (**Kokame y cols., 2000**). Esta proteína, inducible por agentes que generan estrés de RE (tunicamicina, tapsigargina y A23187), es una proteína integral de la membrana del RE, con sus extremos N y C terminal ubicados hacia el citoplasma (**Kokame y cols., 2000**). Además, se describe la presencia de un dominio tipo ubiquitina (ULD) hacia el extremo N-terminal (**Kokame y cols., 2000**). El mismo grupo describió la presencia de un nuevo elemento de respuesta a estrés de RE en el promotor de HERPUD1, llamado ERSE II (**Kokame y cols., 2001**). Además de su inducción por vías activadas exclusivamente por estrés de RE, la expresión de HERPUD1 es inducida por vías compartidas con otras señales de estrés celular, como privación de aminoácidos, estrés oxidativo, infecciones virales y daño al ADN (**Ma y Hendershot, 2004**). HERPUD1 es una proteína de recambio rápido, con un tiempo de vida medio en células HeLa de 4 h (**Hori y cols., 2004**). La degradación de HERPUD1 ocurre vía proteosoma, en un proceso que requiere la presencia del dominio ULD de la proteína (**Sai y cols., 2003**). Se ha descrito la participación del sistema E2-E3 ubiquitin ligasa Ube2g2-gp78 en este proceso (**Yan y cols., 2014**).

Las funciones de HERPUD1 aún no se conocen con claridad, aunque existen evidencias sobre su participación en la degradación de proteínas, la regulación de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular y el metabolismo de la glucosa.



**Figura 5: Herpud1.** Esta proteína de 54 kDa se ubica en la membrana del RE, con sus extremos N y C terminal ubicados hacia el citoplasma. Posee un dominio de unión a ubiquitina (ULD) cerca del extremo N terminal, el cual es importante para las funciones de la proteína. Herpud1 es inducible en distintas condiciones de estrés celular.

#### 1.4.1 HERPUD1 y degradación de proteínas

Diversos trabajos demuestran la presencia de HERPUD1 en complejos ERAD (*ER associated protein degradation*), los cuales median la dislocación y ubiquitinación de proteínas no plegadas o mal plegadas desde el lumen del RE hacia el citoplasma, para su posterior degradación vía proteosoma (**Schulze y cols., 2005**). El silenciamiento de HERPUD1 estabiliza los niveles proteicos de diversos sustratos ERAD como conexina 43 (**Hori y cols., 2004**), CD3 delta

(Schulze y cols., 2005), LC kappa (Okuda-Shimizu y Hendershot, 2007), policistina-2 (Liang y cols., 2008), NHK (Kny y cols., 2011), nicastrina (Marutani y cols., 2011) y SHH (Huang y cols., 2014). La función de HERPUD1 en estos complejos aún no está definida con claridad, aunque se postula que HERPUD1 podría permitir el acercamiento entre los sustratos ERAD y el proteosoma (Okuda-Shimizu y Hendershot, 2007), regular la ubiquitinación de los sustratos ERAD mediante su interacción con la E3 ubiquitin-ligasa HRD1 (Okuda-Shimizu y Hendershot, 2007), permitir la interacción de DERL1 con el complejo formado por HRD1-SEL1L (Huang y cols., 2014) o localizar a los sustratos ERAD y a los componentes de la maquinaria ERAD en el ERCQ (*ER-derived quality control compartment*), región pericentriolar especializada en este proceso (Leitman y cols., 2014).

Se ha descrito que HERPUD1 también regula la degradación de proteínas en el citoplasma. Miura y cols. mostraron que el silenciamiento de Herpud1 en células HEK293T favorece la degradación de las proteínas citoplasmáticas alfa-sinucleína y alfa-sinfilina, además de proteger de la muerte celular inducida por inhibición del proteosoma (Miura y cols., 2010). En relación a este hallazgo, nuestro laboratorio demostró posteriormente que el silenciamiento de Herpud1 genera un incremento en los niveles de autofagia en células HeLa sometidas a privación de glucosa (Quiroga y cols., 2013). Este aumento en la autofagia protege de la acumulación de agregados poliubiquitinados y la muerte celular

inducida por privación de glucosa o por inhibición del proteosoma **(Quiroga y cols., 2013)**.

#### **1.4.2 HERPUD1: Ca<sup>2+</sup> y citoprotección**

Inicialmente, las funciones de HERPUD1 fueron estudiadas en modelos neuronales. Chan y cols. mostraron que la sobreexpresión de Herpud1 disminuye la muerte celular inducida por estrés de RE en células PC12 **(Chan y cols., 2004)**. En este trabajo se observa que la sobreexpresión de Herpud1 previene la caída del potencial mitocondrial, la salida de citocromo C desde la mitocondria y la activación de caspasas inducida por tunicamicina **(Chan y cols., 2004)**. Además, Herpud1 evita la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> intracelular inducida por tapsigargina **(Chan y cols., 2004)**. Un trabajo posterior describió que la sobreexpresión de Herpud1 protege de la muerte celular inducida por MPP<sup>+</sup>, un agente neurotóxico utilizado *in vitro* como modelo de la enfermedad de Parkinson **(Chigurupati y cols., 2009)**. En este modelo Herpud1 estabiliza la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular, evitando la depleción de Ca<sup>2+</sup> en el RE y la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial inducidas por MPP<sup>+</sup> **(Chigurupati y cols., 2009)**. En este trabajo se plantea que la citoprotección conferida por Herpud1 requiere de la presencia del dominio ULD de la proteína, y de la actividad del proteosoma **(Chigurupati y cols., 2009)**. Posteriormente, Belal y cols. demostraron la citoprotección conferida por la sobreexpresión de Herpud1 en células PC12 que expresan una isoforma mutante de la proteína  $\alpha$ -sinucleína (PC12 A53T $\alpha$ -syn)

**(Belal y cols., 2012)**. Las células PC12 A53T $\alpha$ -syn presentan un incremento en los marcadores de estrés de RE, aumento en la respuesta de Ca<sup>2+</sup> citosólica inducida por bradiquinina y acumulación de los canales de Ca<sup>2+</sup> presentes en la membrana del RE, IP<sub>3</sub>R y RyR **(Belal y cols., 2012)**. En este trabajo, la sobreexpresión de Herpud1 disminuye los niveles de los canales de Ca<sup>2+</sup> del RE, reestablece la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular y disminuye los niveles de los marcadores de estrés de RE **(Belal y cols., 2012)**. Además, el uso de BAPTA-AM (un quelante de Ca<sup>2+</sup> intracelular), XeC, o el silenciamiento de IP<sub>3</sub>R son suficientes para prevenir la muerte celular inducida por A53T $\alpha$ -syn, demostrando la importancia del Ca<sup>2+</sup> intracelular en este proceso **(Belal y cols., 2012)**. Por otro lado, un trabajo reciente de nuestro laboratorio ha mostrado que el silenciamiento de Herpud1 incrementa la apoptosis inducida por estrés oxidativo en células HeLa, en un proceso dependiente del incremento de Ca<sup>2+</sup> citosólico y la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial **(Paredes y cols., 2016)**. En su conjunto, estos antecedentes dejan de manifiesto que la presencia de la proteína HERPUD1 protege de la muerte celular en condiciones de estrés mediante la mantención de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular. La participación de Herpud1 en la modulación de los niveles basales de Ca<sup>2+</sup> intracelular y su potencial implicancia en procesos celulares se desconoce.

### 1.4.3 HERPUD1 e insulina

Como se mencionó con anterioridad, la hormona insulina cumple un rol central en la homeostasis energética del organismo. Wong y cols. han relacionado a HERPUD1 con alteraciones en la secreción de insulina desde el páncreas (**Wong y cols., 2013**). En ratones que presentan un fenotipo caracterizado por la hipersecreción de insulina (debido a un incremento en los niveles totales y en la actividad de la enzima nicotinamida nucleótido transhidrogenasa, NNT), se encontró de manera consistente una disminución en la expresión génica y los niveles proteicos de Herpud1 (**Wong y cols., 2013**). Se necesitan nuevos ensayos para demostrar la relación directa entre ambos fenómenos. Por otro lado, Eura y cols. han descrito la generación de un ratón KO para la proteína Herpud1 (**Eura y cols., 2012**). La delección del gen de Herpud1 no altera el desarrollo embrionario ni genera ningún fenotipo patológico en ratones (**Eura y cols., 2012**). Sin embargo, el ratón KO para Herpud1 presenta algunas alteraciones cuando es sometido a determinadas condiciones de estrés. En este contexto, se describe que el ratón KO para Herpud1 presenta niveles elevados de glicemia cuando es sometido a un test de tolerancia a la glucosa, sin diferencias en la glicemia de ayuno (**Eura y cols., 2012**). Además, no se observaron diferencias en la secreción de insulina en el ratón genéticamente modificado para Herpud1 (**Eura y cols., 2012**). En base a los hallazgos de este trabajo, nos preguntamos por los posibles mecanismos involucrados en la alteración en la tolerancia a la glucosa en el ratón KO para Herpud1. Dado que

el músculo esquelético es el principal encargado de la captación de glucosa dependiente de insulina en condiciones postprandiales, nos enfocamos en estudiar la participación de HERPUD1 en la respuesta a insulina en este tejido. Considerando además la importancia de HERPUD1 en la mantención de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, proponemos que la ausencia de HERPUD1 generaría un incremento en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, lo que llevaría a activación de la serina/treonina fosfatasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$  calcineurina y a inhibición de la señalización de insulina, producto de la acción inhibitoria de esta fosfatasa sobre AKT.

### 1.5 Resumen de antecedentes

Recapitulando, los antecedentes más importantes para el planteamiento de nuestra hipótesis son:

- *In vivo*, se ha observado que el ratón KO general para Herpud1 presenta una disminución en la tolerancia a la glucosa, sin detectarse diferencias en los niveles plasmáticos de insulina. Considerando que el músculo esquelético es el principal encargado de la captación de glucosa inducida por insulina, proponemos que **la ausencia de Herpud1 disminuye la respuesta a insulina en este tejido.**
- Por otro lado, antecedentes de la literatura describen que el silenciamiento de HERPUD1 incrementa la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico dependiente de  $\text{IP}_3\text{R}$  en células PC12, cardiomiocitos y células HeLa. Nosotros proponemos

que **la ausencia de HERPUD1 aumenta la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico dependiente de  $\text{IP}_3\text{R}$  en células musculares esqueléticas.** El desbalance en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular altera directamente la respuesta a insulina en células musculares, según datos previamente publicados.

- Finalmente, proponemos que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico observado en las células *knockdown* para HERPUD1 genera un **aumento en la actividad de calcineurina.** Esta última es una serina-treonina fosfatasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual se ha demostrado es capaz de interactuar con AKT y disminuir su estado de fosforilación. De este modo, proponemos que **el silenciamiento de HERPUD1 genera un aumento de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, lo que causa un aumento en la activación de calcineurina, la cual a su vez disminuye la fosforilación de AKT y la respuesta río abajo en la señalización de insulina.**

## **2. HIPÓTESIS**

“La proteína Herpud1 es necesaria para la adecuada respuesta a insulina en células musculares esqueléticas a través de la regulación del eje  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina-Akt”

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el posible rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas a través de la regulación del eje  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina-Akt

#### 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas.
2. Determinar el papel de Herpud1 en la regulación del eje  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina-Akt en células musculares esqueléticas.
3. Examinar la participación de calcineurina en los efectos de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.): Insulina (I0516), CsA (30024), histamina (H7250), FBS (F2442), O-fenilendiamina (P5412), inhibidores de fosfatasas (P2726) y proteasas (11836170001), siHerpud1 (SASI\_Hs01\_00185592), siControl (SIC001), además de los anticuerpos anti-RCAN1 (SAB2101967) y anti-c-myc (3956). En ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.) se adquirió:  $\alpha$ -MEM (11900024), Opti-MEM (31985070), Oligofectamina (12252-011), Lipofectamina 2000 (11668019), 2-NBDG (N13195), Fura-2 AM (F1201), Fluo-4 AM (F14201), Rhod-FF AM (R23983) y el kit para determinación de proteínas por el método BCA (23225). En Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.) fueron obtenidos los siguientes anticuerpos: p-IR (#3023), IR (#3020), p-Akt (#4060), Akt (#2966), p-S6 (#4858), p-AMPK (#2535) y AMPK (#2793). El anticuerpo anti-Herpud1 (BML-PW9705) fue adquirido en Enzo (Farmingdale, NY, EE. UU.). En Biological Industries (Cromwell, CT, EE. UU.) fueron obtenidos los siguientes productos: Reactivo quimioluminiscente para western blot EZ-ECL (20-500-1000), tripsina EDTA 10X (03-051-5B) y solución penicilina-estreptomycin-anfotericina B (03-033-1B). El líquido de centelleo Ecoscint (LS-271) fue adquirido a National Diagnostic (Atlanta, GA, EE.UU.). 2-deoxi-D-glucosa (25972), citocalasina B (250233), y los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y ratón conjugados a

peroxidasa fueron adquiridos en Calbiochem (La Jolla, CA, EE. UU.). El resto de los reactivos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania), de no especificarse lo contrario.

## 5.2 Cultivo celular

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular derivada de músculo esquelético de rata L6 (ATCC CRL-1458). Estas células proliferan como mioblastos mononucleados, pero poseen el potencial de diferenciarse a miotubos multinucleados en presencia de medio de cultivo con bajo contenido de suero **(Richler y Yaffe, 1970; Yaffe, 1968; Yaffe y Saxel, 1977)**. Los miotubos L6 expresan diversas proteínas características del músculo esquelético, y su respuesta a insulina es similar a la del músculo esquelético maduro **(Antonescu y cols., 2005)**. El cultivo celular se realizó en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con un 10% de FBS (medio de crecimiento). Para llevar a cabo la diferenciación a miotubos, se reemplazó el medio de cultivo por  $\alpha$ -MEM suplementado con un 2% de FBS (medio de diferenciación) durante un periodo de 5 a 7 días.

Para determinados experimentos se utilizó la línea celular L6 GLUT4-myc, donada amablemente por la Dra. Amira Klip (The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canadá). Estas células expresan constitutivamente un epítipo myc en el primer loop extracelular del transportador de glucosa GLUT4 (secuencia de 14 aminoácidos correspondiente al c-myc humano: AEEQKLISEEDLLK). La expresión de GLUT4-myc en los miotubos L6 GLUT4-myc es, al menos, 100

veces mayor que el GLUT4 endógeno, siendo el principal responsable de la incorporación de glucosa en estas células (**Ishikura y cols., 2010**). Además, tanto las vías de señalización relacionadas con la incorporación de glucosa como las relacionadas con el reciclaje vesicular de los transportadores GLUT4 no se encuentran alteradas en las células L6 GLUT4-myc (**Ishikura y cols., 2010**).

### **5.3 Muestra de ratones KO Herpud1**

Los ratones *knockout* (KO) para Herpud1 fueron desarrollados en el laboratorio del Dr. Koichi Kokame (National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka) como se describió previamente (**Eura y cols., 2012**). Para estos experimentos se utilizaron ratones machos de 10-12 semanas. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con la Guía para el manejo y uso de animales de laboratorio (NIH, octava edición).

### **5.4 Captación de <sup>3</sup>H-2-Deoxi-glucosa**

Se evaluó de acuerdo a protocolo previamente descrito por nuestro laboratorio (**Contreras-Ferrat y cols., 2010**). Los miotubos, sembrados en placas de 12 pocillos, se lavaron 2 veces con PBS 1X estéril y se incubaron durante 3 h en medio  $\alpha$ -MEM sin suero. Posteriormente, se lavaron 2 veces con tampón HEPES (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Hepes-Na, pH=7.4) y se estimularon con insulina 100 nM durante 20 minutos (37°C) en el mismo tampón. A continuación, las células se lavaron 2 veces con

tampón HEPES y se incubaron exactamente 10 minutos en solución de transporte (10  $\mu$ M 2-Deoxi glucosa, 1  $\mu$ Ci/mL  $^3$ H-2-Deoxi glucosa, en tampón HEPES) a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo, la reacción se detuvo rápidamente agregando solución stop fría (0.9% p/v NaCl, 20 mM glucosa, en tampón HEPES). Luego, las células se lavaron 2 veces con solución stop, se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos (para favorecer la lisis celular) y se lisaron con una solución NaOH 0.05 M. Tras homogenizar el lisado celular, se tomaron 350  $\mu$ L del extracto y se agregaron en viales de centelleo que contienen 3.5 mL de líquido de centelleo. La emisión  $\beta$  se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000TA (Beckman Instruments Corp., Brea, CA, EE. UU.). El resto del lisado celular se utilizó para la cuantificación de proteínas mediante el método de BCA.

## 5.5 Captación de 2-NBDG

Se realizó mediante protocolo previamente estandarizado en nuestro Laboratorio (**Osorio-Fuentealba y cols., 2013**). Los miotubos, sembrados en placas de 6 pocillos con cubreobjetos de 25 mm removibles, fueron lavados con PBS 1X estéril 2 veces e incubados en medio  $\alpha$ -MEM sin suero durante 3 h. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con tampón HEPES y se estimularon con insulina 100 nM durante 20 min ( $37^{\circ}\text{C}$ ) en el mismo tampón. Luego, las células se incubaron exactamente 15 min con una solución de 2-NBDG 300  $\mu$ M en tampón HEPES (temperatura ambiente). La reacción se detuvo

agregando una solución fría de tampón HEPES suplementado con glucosa 20 mM. A continuación, las células se lavaron 2 veces con la misma solución y se transfirieron a un microscopio invertido de epifluorescencia Leica DM IL LED (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Para cada condición se obtuvieron al menos 10 fotos, equivalentes a aproximadamente 50 células. Para el análisis de datos se midió la intensidad de fluorescencia en regiones de interés (ROIs) con el programa Image J (NIH, EE. UU.).

## **5.6 Detección de GLUT4-myc en superficie**

Esta técnica colorimétrica permite la detección del transportador de glucosa GLUT4-myc en la membrana plasmática en células que expresan este epítipo. Los miotubos, sembrados en placas de 12 pocillos, fueron lavados con PBS 1X estéril 2 veces e incubados en medio  $\alpha$ -MEM sin suero durante 3 h. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con tampón HEPES y se estimularon con insulina 100 nM durante 20 min (37°C) en el mismo tampón. Luego, la placa se colocó sobre hielo y se procedió a lavar los pocillos con PBS 1X en tres oportunidades. A continuación, se fijó las células con una solución de PFA 4% v/v en PBS 1X durante 10 min (4°C). Luego, las células se incubaron durante 10 minutos con una solución de glicina 100 mM en PBS 1X (4°C). Posteriormente, se procedió a bloquear utilizando una solución de BSA 5% p/v en PBS 1X durante 20 min a temperatura ambiente. Tras aspirar esta solución, los pocillos se incubaron con una solución 1:500 de anticuerpo primario anti-myc

en BSA 5% (500  $\mu$ L por pocillo, a  $4^{\circ}$ C). En este punto se consideró un control sin anticuerpo primario, incubado con BSA 5% p/v en PBS 1X. Luego, se aspiró esta solución y se procedió a lavar con PBS 1X en 6 oportunidades, tras lo cual se bloqueó nuevamente durante 20 min. La incubación con el anticuerpo secundario (anti-conejo 1:1.000 en BSA 5%) se realizó durante 1 h a  $4^{\circ}$ C. Tras lavar 6 veces con PBS 1X, se procedió a realizar la reacción colorimétrica. Para esto, se disolvió una tableta de 20 mg de OPD en 50 mL de una solución de tampón fosfato-citrato, se agregó 20  $\mu$ L de  $H_2O_2$  30% y se ajustó a pH 5.0. Se agregó 1 mL de esta solución a cada pocillo, y se esperó hasta aparición de color amarillo-anaranjado. La reacción se detuvo agregando 125  $\mu$ L de HCl 3 N por pocillo. Luego se rescataron 200  $\mu$ L de cada pocillo y se transfirieron a una placa de 96 pocillos, para proceder a la medición de absorbancia a 492 nm en un lector de placa GloMax multi-detection system (Promega).

### **5.7 Determinaciones de $Ca^{2+}$ citosólico**

Las células se sembraron en placas de 35 mm con cubreobjetos removibles de 25 mm en medio de crecimiento hasta alcanzar 70-80% de confluencia, tras lo cual se incubaron en medio de diferenciación entre 5 y 7 días. El día del experimento, las células se lavaron 3 veces con tampón Krebs (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.0 mM  $MgCl_2$ , 2.6 mM  $CaCl_2$ , 10 mM HEPES-Na, 5.6 mM glucosa, pH=7.4) y se incubaron durante 30 min a  $37^{\circ}$ C con las sondas fluorescentes sensibles a  $Ca^{2+}$  Fluo-4 AM o Fura-2 AM (5,4  $\mu$ M) en tampón Krebs. A

continuación, los miotubos se lavaron 3 veces con tampón Krebs y se utilizaron dentro de las 2 h posteriores. Para los experimentos sin  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se utilizó tampón Krebs nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Hepes-Na, 5.6 mM glucosa, EGTA 0.1 mM, pH=7.4). Para realizar la medición, se retiró el cubreobjetos de la placa y se montó en una cámara metálica de 1 mL de capacidad, agregando 500  $\mu\text{L}$  de tampón Krebs con o sin  $\text{Ca}^{2+}$ , según corresponda. Los estímulos se agregaron directamente en la cámara metálica. En el caso de la sonda fluorescente Fluo-4 AM, se excitó con un láser a 488 nm y se recolectaron imágenes cada 1 s en un microscopio confocal de disco rotatorio DSU Olympus (Olympus, Hamburgo, Alemania) utilizando un objetivo 40x. En los experimentos con Fura-2 AM, se excitó de forma alternada con un láser a 340 nm y 403 nm. Las imágenes se recolectaron cada 2 s. Para la determinación de los valores basales de  $\text{Ca}^{2+}$  se comparó el promedio de la intensidad de fluorescencia ( $F_{340}/F_{403}$ ) en los primeros 60 s de medición, antes de la adición de los estímulos.

## **5.8 Determinaciones de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial**

Las células se sembraron en placas de 35 mm con cubreobjetos removibles de 25 mm en medio de crecimiento hasta alcanzar 70-80% de confluencia, tras lo cual se incubaron en medio de diferenciación entre 5 y 7 días. El día del experimento, las células se lavaron 3 veces con tampón Krebs y se incubaron durante 30 min a 37°C con la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Rhod-FF AM

(5,4  $\mu\text{M}$ ) en tampón Krebs. Esta sonda se localiza preferencialmente en la mitocondria (**Fonteriz y cols., 2010**). A continuación, los miotubos se lavaron durante 30 min en tampón Krebs y se utilizaron dentro de las 2 h posteriores. Para los experimentos sin  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se utilizó tampón Krebs nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para realizar la medición, se retiró el cubreobjetos de la placa y se montó en una cámara metálica de 1 mL de capacidad, agregando 500  $\mu\text{L}$  de tampón Krebs con o sin  $\text{Ca}^{2+}$ , según corresponda. Los estímulos se agregaron directamente en la cámara metálica. Posteriormente, se excitó con un láser 568 nm y se recolectaron imágenes cada 1 s en un microscopio confocal de disco rotatorio DSU Olympus (Olympus, Hamburgo, Alemania) utilizando un objetivo 40x. En el caso de los experimentos con mitoPeriCam (indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  genéticamente codificado, con una secuencia de destinación mitocondrial (**Fonteriz y cols., 2010**) se transfectó con el plásmido (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 48 h antes del experimento. Las células se excitaron a 405 nm y se recolectaron imágenes cada 1 s en las condiciones descritas previamente (**Fonteriz y cols., 2010**).

## 5.9 Determinación del área de los miotubos y del índice de fusión

Las células L6 se sembraron en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de 18 mm en medio alfa-MEM suplementado con 2% FBS hasta alcanzar un 80% de confluencia. Luego, el medio fue reemplazado por medio de diferenciación durante 5 días. El día del experimento, las células se lavaron con PBS 1X frío, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 10 min, luego se

permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% en PBS 1X (10 min) y se bloquearon con BSA al 1% en PBS 1X previamente filtrado (1 h). Posteriormente, los miotubos L6 se trataron con la sonda faloidina-rodamina (dilución 1:500) y H $\ddot{o}$ chst (dilución 1:1000) para visualizar los n $\acute{u}$ cleos. Finalmente, las c $\acute{e}$ lulas se montaron en portaobjetos utilizando DAKO como medio de montaje. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio confocal de disco rotatorio DSU Olympus (Olympus, Hamburgo, Alemania). Se calcul $\acute{o}$  el  $\acute{a}$ rea de las regiones de los miotubos contenidos en im $\acute{a}$ genes obtenidas de manera aleatoria utilizando el programa Image J (NIH, EE. UU.). El  $\acute{i}$ ndice de fusi $\acute{o}$ n de los miotubos L6 se calcul $\acute{o}$  como la relaci $\acute{o}$ n entre el n $\acute{u}$ mero de n $\acute{u}$ cleos celulares ubicados en los miotubos fusionados (definidos como aquellas c $\acute{e}$ lulas con 2 o m $\acute{a}$ s n $\acute{u}$ cleos) dividido por el n $\acute{u}$ mero de n $\acute{u}$ cleos totales presentes en las im $\acute{a}$ genes analizadas, de acuerdo con lo descrito previamente (**Epting y cols., 2004; Tajhya y cols., 2016; Zhong y cols., 2017**).

#### **5.10 Determinaci $\acute{o}$ n de la viabilidad celular mediante la incorporaci $\acute{o}$ n de yoduro de propidio (PI)**

Las c $\acute{e}$ lulas L6 se sembraron en placas de 12 pocillos en medio alfa-MEM suplementado con 2% FBS hasta alcanzar un 80% de confluencia. Luego, el medio fue reemplazado por medio de diferenciaci $\acute{o}$ n durante 5 d $\acute{i}$ as, tras lo cual el medio de cultivo se recolect $\acute{o}$  en tubos de FACS (BD Falcon). Las c $\acute{e}$ lulas adheridas a la placa se tripsinizaron con tripsina-EDTA 1x durante 5 min a

temperatura ambiente y se recolectaron junto al medio de cultivo en los tubos respectivos, previa interrupción de la tripsinización con 30  $\mu$ l de FBS. Luego de la recolección, las células se centrifugaron durante 5 min a 3000xg (temperatura ambiente) y resuspendieron en 300  $\mu$ l de una solución 10  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio (PI) en PBS 1X, tras lo cual se incubaron durante 5 min a 37°C y CO<sub>2</sub> 5% y posteriormente se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, CA EE. UU.). Los datos se adquirieron y analizaron con ayuda del software BD FACSDiva versión 6.1.1 (BD Biosciences). Se analizaron un mínimo de 5.000 eventos por cada punto y por duplicado de, al menos, 3 repeticiones independientes.

### **5.11 Preparación de extractos celulares totales**

Las células se sembraron en placas de 35 mm en medio  $\alpha$ -MEM 10% FBS (medio de crecimiento) hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Luego, el medio de cultivo se reemplazó por  $\alpha$ -MEM 2% FBS (medio de diferenciación) durante 5 días. Una vez estimuladas, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X frío y se lisaron con 70  $\mu$ L de tampón de lisis NP40 (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1%; tritón X-100 1% v/v) suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasas comerciales (Roche, Basel, Suiza). El homogenizado se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 12.000 rpm durante 12 min (4°C). Luego se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford (BioRad protein assay,

BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). Finalmente, el extracto se denaturó mediante el tampón SDS-PAGE 4x y se almacenó a -20°C.

### **5.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Las proteínas se separaron de acuerdo con su masa molecular mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Para cada condición se cargaron 30 µg del extracto proteico. El gel concentrador se preparó al 5% A/BA, mientras el gel separador se preparó al 10% A/BA. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis 1X (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0.1%) a voltaje constante de 70 V durante 30 min, y luego a 100 V hasta caída del frente de corrida.

### **5.13 Electrotransferencia de proteínas**

Tras la separación electroforética de proteínas, se procedió a su electrotransferencia a membranas de PVDF de 0.2 µm (BioRad, Hercules, CA, EE. UU.). El proceso se desarrolló a amperaje constante (400 mA) durante 100 min en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM).

### **5.14 Western blot**

Posterior a la electrotransferencia, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche descremada 5% p/v; Tween 20 0.1% v/v en TBS 1X) durante 1 h a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpos primarios se realizó toda la noche a 4°C con agitación suave. Las diluciones utilizadas para cada

anticuerpo primario fueron las siguientes: Herpud1 (1:50.000), tubulina (1:10.000), RCAN1, p-Akt Ser-473 y p-S6 (1:2.000), Akt, p-IR, IR, p-AMPK y AMPK (1:1.000) en solución de bloqueo. Tras la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno en TBS-T 1X. La incubación con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón o conejo según corresponda) acoplado a peroxidasa se realizó durante 1 h a temperatura ambiente, con una dilución de 1:5000 en solución de bloqueo. Tras lavar nuevamente 3 veces con TBS-T 1X (5 min cada lavado), las membranas se incubaron 1 min en la solución de detección quimioluminiscente EZ-ECL y se expusieron en una película fotográfica Kodak. Posteriormente las imágenes se digitalizaron y se procesaron con el programa ImageJ (NIH, EE. UU.).

En el caso de los resultados obtenidos en los experimentos de *Western blot*, los valores densitométricos obtenidos para cada proteína fueron relativizados intra-experimento (dividiendo el valor de cada muestra por la sumatoria de los valores en un mismo n experimental), normalizados por el control de carga, y relativizados inter-experimento (los valores muestrales fueron divididos por el promedio de los controles).

### **5.15 Transfección con ARN interferente pequeño**

La proteína Herpud1 se silenció mediante un ARN interferente pequeño específico (siHerpud1) a una concentración de 100 nM. Como control de transfección se utilizó un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) a la misma

concentración, diseñado especialmente para no tener homología con secuencias codificantes de mRNA de diversas especies. La transfección se realizó en medio Opti-MEM en ausencia de suero y antibiótico durante 6 h. Como reactivo de transfección se utilizó Oligofectamina (Invitrogen, Eugene, OR, EE. UU.). Posteriormente, se aspiró el medio de transfección y se incubó a las células con medio de diferenciación durante 48 h antes de realizar los experimentos.

### **5.16 Transfección de plásmidos**

Las células se sembraron en medio de crecimiento hasta alcanzar 70-80% de confluencia, tras lo cual se incubaron en medio de diferenciación durante 3-4 días. El día de la transfección, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X estéril, y se incubaron durante 6 h con una mezcla previamente preparada de 5  $\mu$ L de Oligofectamina 2000 (Invitrogen, Eugene, OR, EE. UU.) por cada 1  $\mu$ g de plásmido (Herpud1, pcDNA3.1, Herpud1-GFP y GFP) en Opti-MEM. Transcurrido este periodo, las células se incubaron al menos 48 h en medio de diferenciación previo al desarrollo de los experimentos.

### **5.17 Transducción adenoviral**

Las células se sembraron en medio de crecimiento hasta alcanzar 70-80% de confluencia, tras lo cual se incubaron en medio de diferenciación durante 3-4 días. La transducción se llevó a cabo incubando los miotubos por 12 h en medio de diferenciación al cual se le agregó previamente una MOI de 1.000 partículas

virales por célula (CN-CA, CAIN y LacZ). Transcurrido este periodo las células se lavaron con PBS 1X estéril y se reemplazó el medio de cultivo por medio de diferenciación fresco. Los experimentos se llevaron a cabo al menos 24 h después de la transducción.

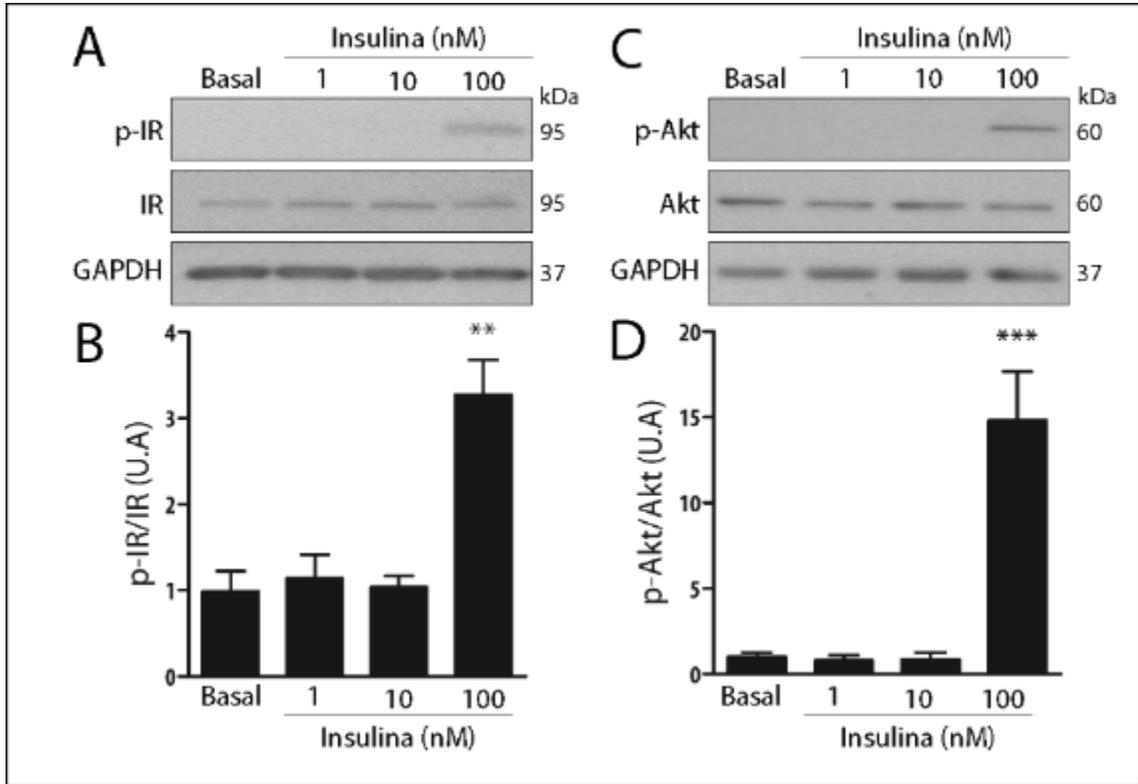
### **5.18 Expresión de resultados y análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar del promedio (SEM) de, al menos, tres experimentos independientes. La comparación entre grupos se realizó mediante el análisis estadístico de múltiple varianza (ANOVA) con un nivel de confianza aceptado inferior al 5% ( $p < 0.05$ ). Para los experimentos de captación de glucosa y OPD que comparan los miotubos L6 siControl y siHerpud1, los grupos se compararon mediante ANOVA de dos vías. Como post-test se utilizó la prueba de Tukey. La comparación entre 2 condiciones experimentales se realizó mediante el test t de Student de 2 colas ( $p < 0.05$ ). No se utilizaron test no paramétricos debido a su bajo poder para detectar diferencias significativas (GraphPad Statistics Guide). Para todos los análisis se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

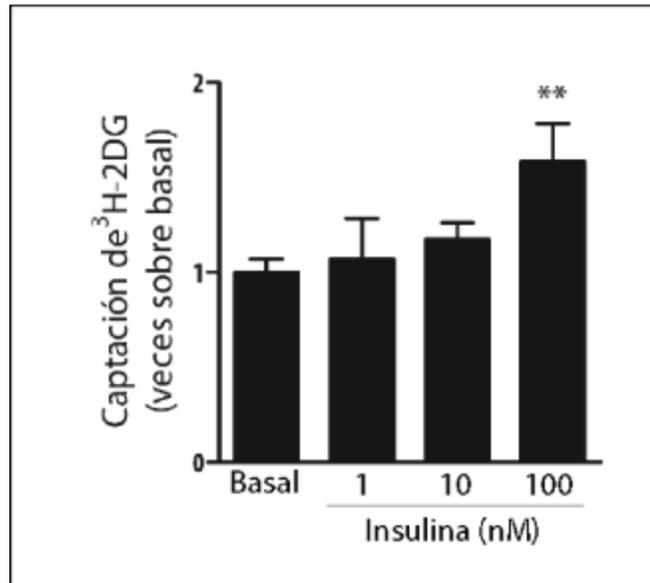
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluar el rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas

Inicialmente, se realizó una estandarización de la respuesta a insulina en la línea celular derivada de músculo esquelético de rata L6. Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de insulina en la activación de la cascada de señalización dependiente de esta hormona, además de su efecto en la captación de glucosa en miotubos L6. Las células fueron incubadas durante 5 días en medio de diferenciación, tras lo cual fueron privadas de suero durante 3 h. La privación de suero incrementa la respuesta a insulina en este modelo celular (**Ching y cols., 2010; Klip y cols., 1984**). Posteriormente, los miotubos L6 fueron estimulados con distintas concentraciones de insulina durante 20 min. Luego se realizó la extracción de proteínas totales para la determinación de los niveles proteicos mediante *Western blot*. Los resultados muestran que insulina 100 nM genera un incremento en la fosforilación del RI (Tyr-1361) y en la fosforilación de Akt (Ser-473) (**Figura 6**). A continuación, se evaluó el efecto de distintas concentraciones de insulina en la captación de glucosa en los miotubos L6, mediante la determinación de la incorporación de <sup>3</sup>H-2-deoxi-glucosa. Se observó que insulina 100 nM es la menor concentración de la hormona que induce un aumento estadísticamente significativo en la captación de glucosa (**Figura 7**). Esta concentración de insulina se utilizó para los experimentos posteriores.



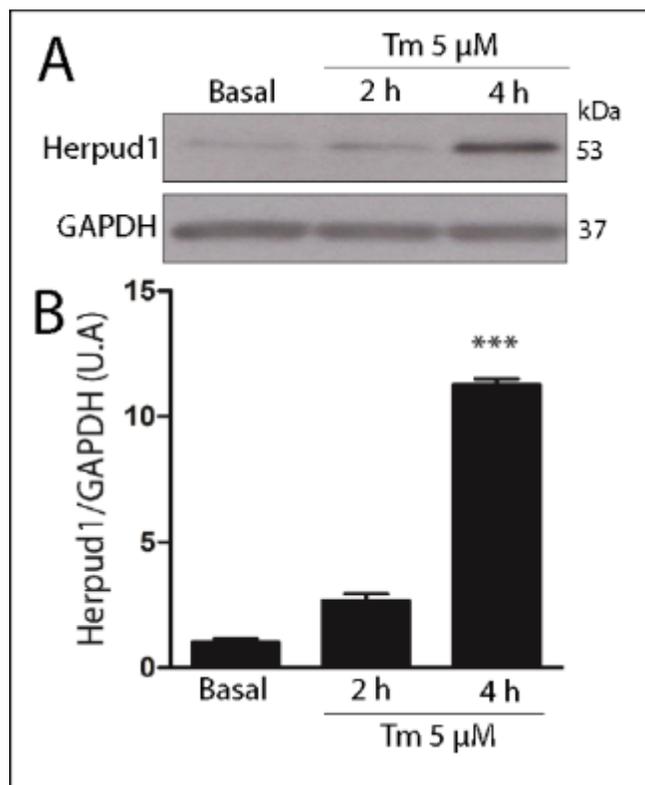
**Figura 6: Efecto de distintas concentraciones de insulina en su cascada de señalización intracelular en miotubos L6.** Tras 5 días en medio de diferenciación, los miotubos se privaron de suero por 3 h y luego se estimularon con distintas concentraciones de insulina por 20 min. Posteriormente se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante Western blot. (A) Imagen representativa del efecto de insulina a distintas concentraciones en la fosforilación del RI en el residuo Tyr-1361 (p-IR), RI total y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-IR/IR (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa del efecto de insulina en la fosforilación de Akt en el residuo Ser-473 (p-Akt), Akt total y GAPDH. (D) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt (n = 3). \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001 respecto a la condición basal. ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).



**Figura 7: Efecto de distintas concentraciones de insulina en la captación de glucosa en miotubos L6.** Tras 5 días en medio de diferenciación, los miotubos se privaron de suero por 3 h y luego se estimularon con insulina a distintas concentraciones durante 20 min. A continuación, se lavaron con tampón HEPES dos veces y se incubaron exactamente 10 min con [<sup>3</sup>H]-2DG (solución de transporte), tras lo cual la reacción se detuvo agregando la solución stop fría. Posteriormente las células se lisaron y se determinó la emisión β en un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000TA. Los datos fueron relativizados por la concentración de proteínas de cada muestra, obtenida mediante el método de BCA (n = 3). \*\* p < 0.01 respecto a la condición basal. ANOVA de 2 vías (Tukey post-test).

Dado que no existen antecedentes sobre la expresión de Herpud1 en la línea celular L6, se evaluó la expresión de la proteína en condiciones basales y ante el estímulo con tunicamicina (Tm), un antibiótico que bloquea la N-glicosilación de proteínas (**Guarnaccia y cols., 1983**). Esto provoca la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, y lleva a la inducción de estrés de RE (**Guarnaccia y cols., 1983**). Los miotubos L6 fueron estimulados con Tm 5 µg/mL por 2 y 4 h, tras lo cual se realizó la extracción de proteínas totales para

*Western blot.* Los resultados muestran que Herpud1 se expresa en condiciones basales en los miotubos L6, y que el tratamiento con tunicamicina 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (4 h) induce un incremento estadísticamente significativo en sus niveles proteicos (Figura 8).

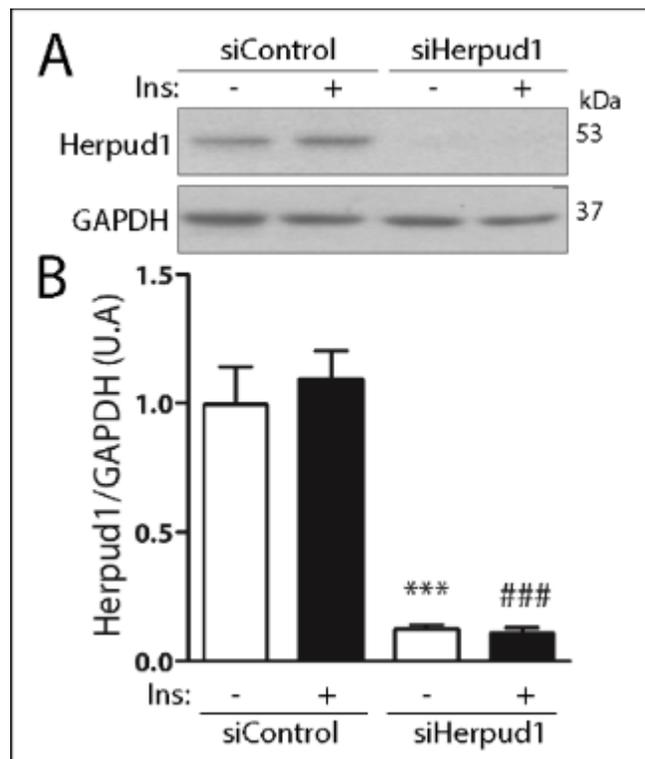


**Figura 8: Efecto del estrés de RE en los niveles proteicos de Herpud1 en los miotubos L6.** Luego de 5 días de diferenciación, las células fueron estimuladas con tunicamicina 5  $\mu\text{M}$  durante 2 y 4 h. Posteriormente se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante Western blot. (A) Imagen representativa de los niveles proteicos de Herpud1 y GAPDH en condiciones basales y ante el estímulo con tunicamicina (Tm). (B) Cuantificación densitométrica (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. \*\*\*  $p < 0.001$  respecto a la condición basal. ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

Para evaluar el rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas, se procedió a silenciar la proteína mediante un RNA interferente pequeño específico (siHerpud1). Como control se utilizó un RNA interferente de secuencia aleatoria (siControl). La transfección se realizó el día 3 de diferenciación, en medio Opti-MEM, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Los miotubos fueron incubados durante 6 h en la mezcla de transfección, tras lo cual fueron incubados en medio de diferenciación durante 48 h. Los niveles proteicos se determinaron mediante *Western blot*. Los resultados muestran una disminución en los niveles proteicos de Herpud de aproximadamente un 80% en las células tratadas con el siHerpud1 (**Figura 9**).

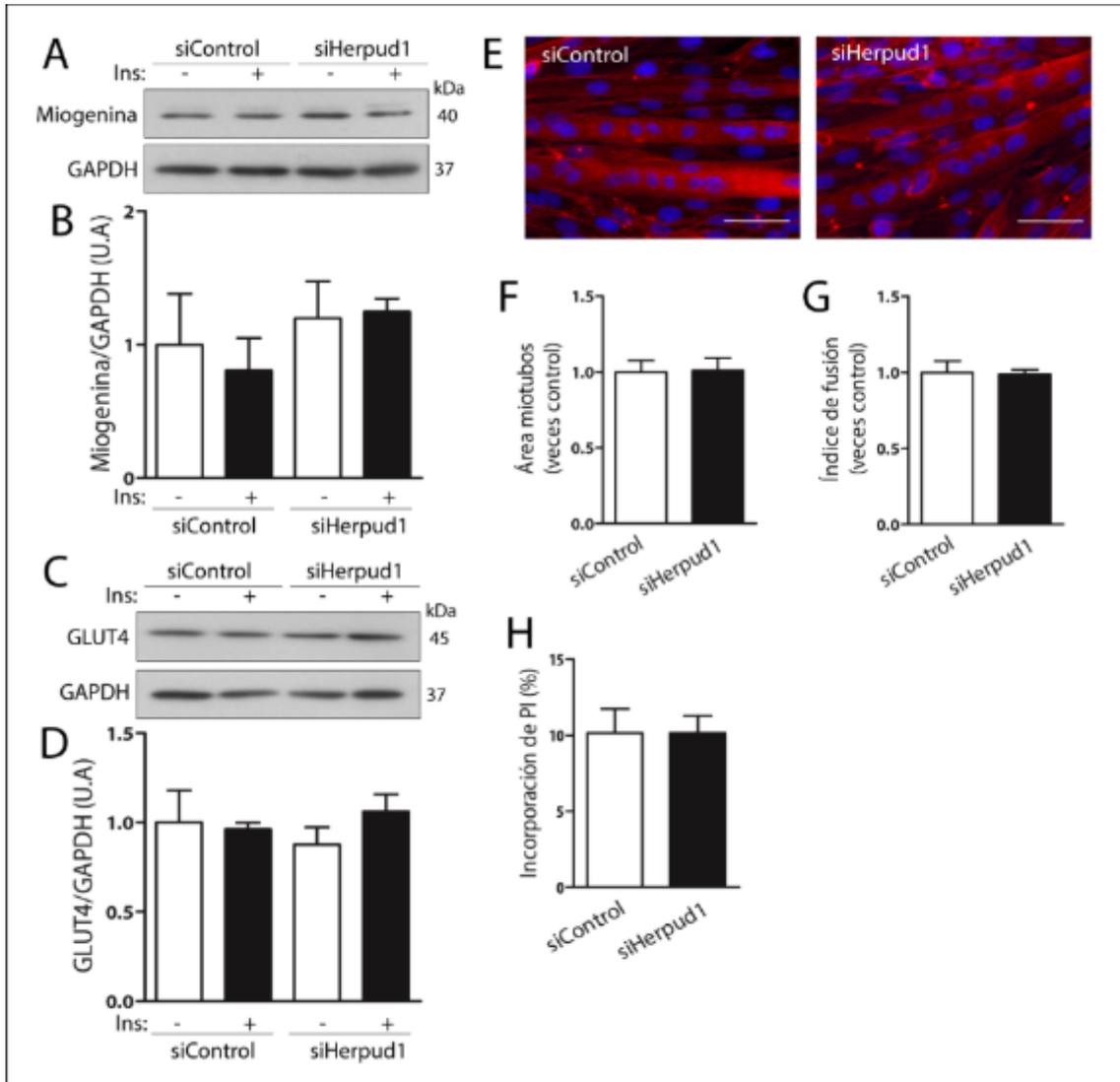
Como se mencionó previamente, las células L6 proliferan como mioblastos mononucleados, iniciando un proceso de fusión y diferenciación espontáneo al disminuir el porcentaje de suero en el medio de cultivo (**Richler y Yaffe, 1970; Yaffe, 1968; Yaffe y Saxel, 1977**). Con el objetivo de determinar la posible participación de Herpud1 en el proceso de diferenciación de las células L6, se evaluó el efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles proteicos de MYOG y GLUT4 (proteínas utilizadas como marcadores de diferenciación en la línea celular L6), el área celular y el índice de fusión, calculado como la relación entre los núcleos celulares presentes en los miotubos dividido por el número total de núcleos observados en cada imagen (**Epting y cols., 2004; Tajhya y cols., 2016; Zhong y cols., 2017; Mitsumoto y cols., 1991; Wright y cols., 198; Peck y cols., 2009**). Los resultados no mostraron diferencias entre los miotubos L6

siControl y siHerpud1 en los parámetros evaluados (**Figura 10A-G**). Adicionalmente, el *knockdown* de Herpud1 tampoco afecta la viabilidad celular, evaluada mediante la incorporación de PI (**Figura 10H**).



**Figura 9: Efecto del ARN interferente pequeño específico para Herpud1 en los niveles de la proteína en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación (48 h). El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) por 20 min. Posteriormente, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa del efecto del siHerpud1 en los niveles de la proteína. (B) Cuantificación densitométrica de la relación Herpud1/GAPDH (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. \*\*\*p<0.001 entre

las condiciones basales. ### $p < 0.001$  entre las condiciones estimuladas con insulina. ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

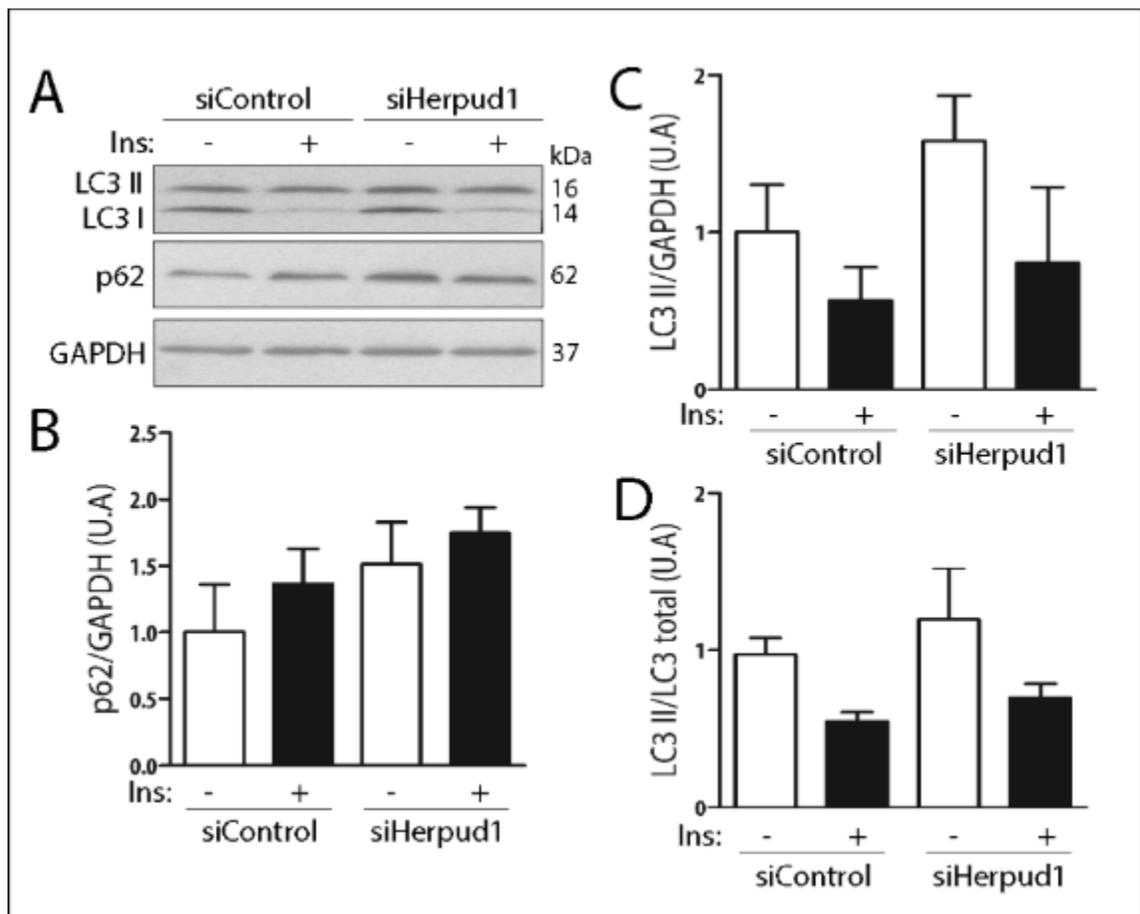


**Figura 10: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la diferenciación y la viabilidad celular en los miotubos L6.** (A-D) Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos L6 fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación por 48 h. El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Posteriormente, se realizó

el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa del efecto del siHerpud1 en los niveles de miogenina y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica de la relación miogenina/GAPDH (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa del efecto del *knockdown* de Herpud1 en los niveles proteicos de GLUT4 y GAPDH. (D) Análisis densitométrico de la relación GLUT4/GAPDH (n = 3). (E-G) Los miotubos L6, sembrados en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de 12 mm, fueron transfectados el día 3 de diferenciación como se describió anteriormente. Tras 48 h, las células fueron privadas de suero por 3 h y luego se fijaron con paraformaldehído 4% p/v, siendo posteriormente incubadas con rodamina-faloidina (rojo) y DAPI (azul). (E) Imagen representativa de los miotubos L6 siControl y siHerpud1 (barra de escala = 50  $\mu$ m). (F) Área de los miotubos L6 control y *knockdown* para Herpud1. El análisis fue realizado con el programa ImageJ (n = 4). (G) Índice de fusión de las células L6. Este parámetro se calculó dividiendo el número de núcleos presentes en las células fusionadas (definidas como aquellas que poseen más de un núcleo) por el número total de núcleos presentes en el campo analizado (n = 4). (H) Viabilidad celular en los miotubos L6 siControl y siHerpud1, evaluada mediante la incorporación de yoduro de propidio (PI) (n = 4). ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

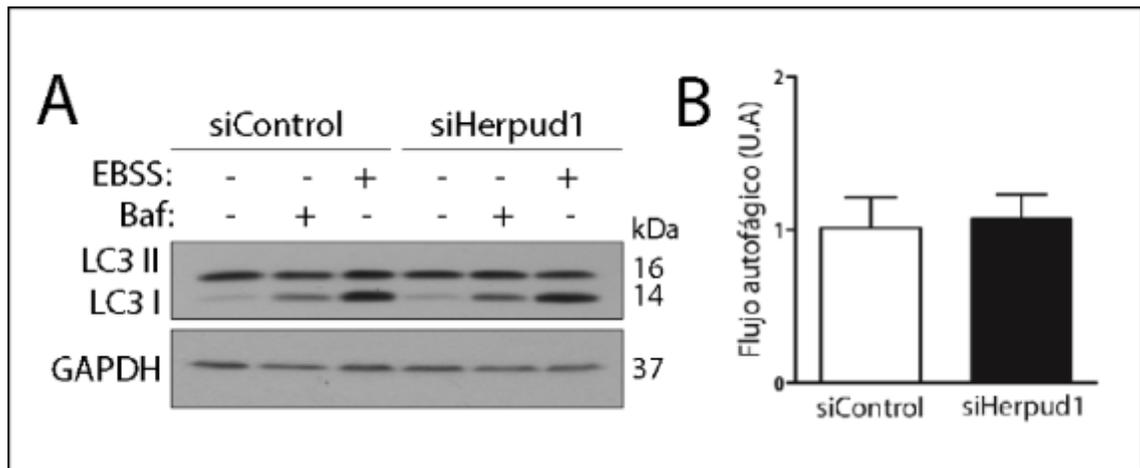
Previamente, nuestro laboratorio mostró que el silenciamiento de Herpud1 induce un aumento en los niveles de autofagia (tanto en condiciones basales como en condiciones de privación de glucosa) en células HeLa (**Quiroga y cols., 2013**). Dado que la autofagia se relaciona con cambios en la respuesta a insulina en el músculo esquelético, evaluamos el efecto del siHerpud1 en los niveles de autofagia en los miotubos L6 (**Liu y cols., 2015**). Mediante *Western blot* se determinaron los niveles proteicos de LC3 y p62, dos marcadores de autofagia, en miotubos L6 siControl y siHerpud1. También se evaluó el flujo autofágico, mediante la determinación de los niveles de LC3 II en presencia y ausencia de bafilomicina A1, un inhibidor de la H<sup>+</sup> ATPasa vacuolar, que evita la acidificación de los lisosomas y su fusión con los autofagosomas (**Zhang y cols., 2013**). Los

resultados obtenidos muestran que el *knockdown* de Herpud1 no afecta los niveles de las proteínas LC3, p62 ni el flujo autofágico en los miotubos L6 (Figuras 11 y 12).



**Figura 11: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles proteicos de LC3 y p62 en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación (48 h). El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Posteriormente, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen

representativa del efecto del siHerpud1 en los niveles de p62, LC3 I, LC3 II y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica de los niveles proteicos de p62 (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Análisis densitométrico de la relación LC3 II/GAPDH (n = 3). (D) Cuantificación de la relación LC3II/LC3 total (LC3 I + LC3 II) (n = 3). ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

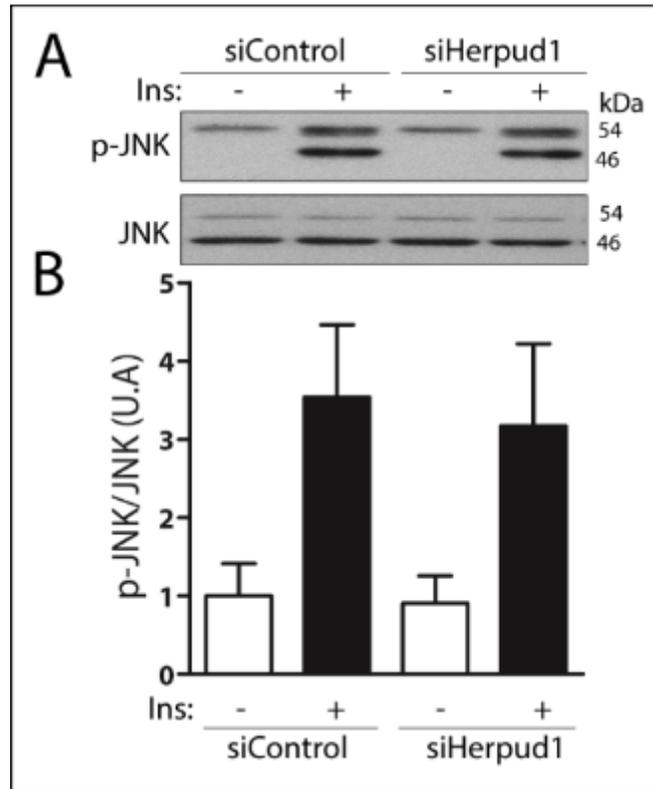


**Figura 12: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en el flujo autofágico en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h. El día del experimento, las células se trataron con bafilomicina A1 (Baf) 100 nM durante 4 h. La incubación en el medio de cultivo EBSS por 4 h se utilizó como control positivo para la inducción de autofagia. (A) Imagen representativa del efecto del siHerpud1 en los niveles de LC3 II. (B) Cuantificación densitométrica del flujo autofágico (n = 3). El flujo autofágico se calculó como la diferencia entre los niveles de LC3 II en presencia del inhibidor de la autofagia bafilomicina A1 (Baf) y los niveles de LC3 II en condiciones basales.

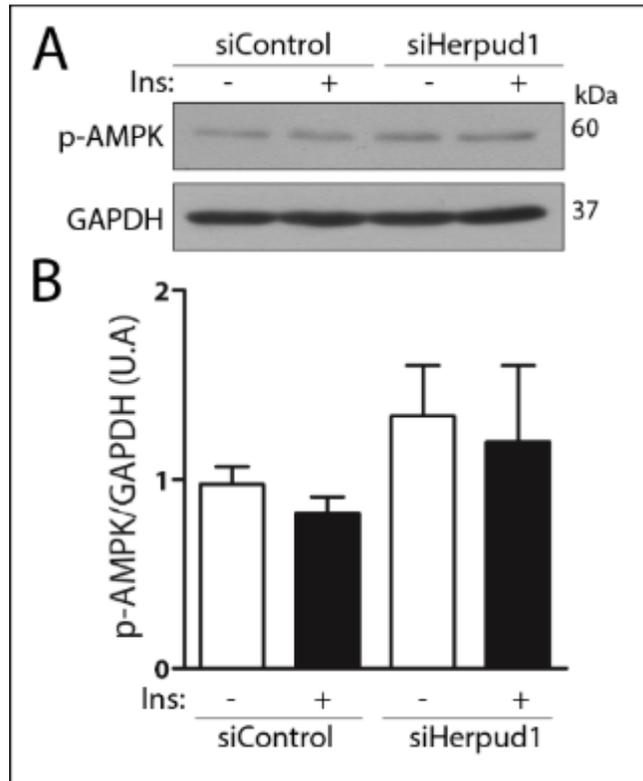
Se ha descrito al estrés de RE como uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencia a insulina en el músculo esquelético (**Boulinguez y cols., 2017**). En condiciones de estrés de RE ocurre un aumento en la

activación de la quinasa JNK, el cual es dependiente de IRE1 (**Urano y cols., 2000**). Por otro lado, JNK fosforila a IRS1 en residuos serina, lo cual inhibe su activación por diversos mecanismos, alterando la cascada de señalización dependiente de insulina (**Müssig y cols., 2005**). Dado que se ha descrito la participación de Herpud1 en la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD), y que su silenciamiento podría afectar la homeostasis del RE, se decidió evaluar el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la activación de JNK (**Schulze y cols., 2005**). Para esto, se determinaron los niveles de fosforilación de JNK mediante *Western blot*. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la fosforilación de JNK entre los miotubos L6 siControl y siHerpud1 (**Figura 13**).

La captación de glucosa en las células musculares es regulada de manera independiente de insulina por la quinasa AMPK (**Jensen y cols., 2014**). Ambas vías convergen en la fosforilación e inhibición de AS160 (**Jensen y cols., 2014**). Para determinar si el silenciamiento de Herpud1 modifica la activación de AMPK, se evaluó la fosforilación de esta quinasa mediante *Western blot*. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la fosforilación de AMPK (Thr-172) entre los miotubos L6 siControl y siHerpud1 (**Figura 14**). Esto sugiere que los resultados observados son independientes de cambios en la activación de AMPK.



**Figura 13: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la fosforilación de JNK en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación (48 h). El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Posteriormente, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa del efecto del siHerpud1 en los niveles de fosforilación de JNK en los residuos Thr-183/Tyr-185 (p-JNK) y JNK total en los miotubos L6. (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-JNK/JNK (n = 5). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).



**Figura 14: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la fosforilación de AMPK en los miotubos L6.** Tras 3 días en medio de diferenciación, los miotubos L6 fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación por 48 h. El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Posteriormente, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de AMPK en el residuo Thr-172 (p-AMPK) y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica con el programa ImageJ (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

Posteriormente, se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la respuesta a insulina en los miotubos L6. Como determinación funcional de la acción de esta hormona en las células L6 se evaluó la captación

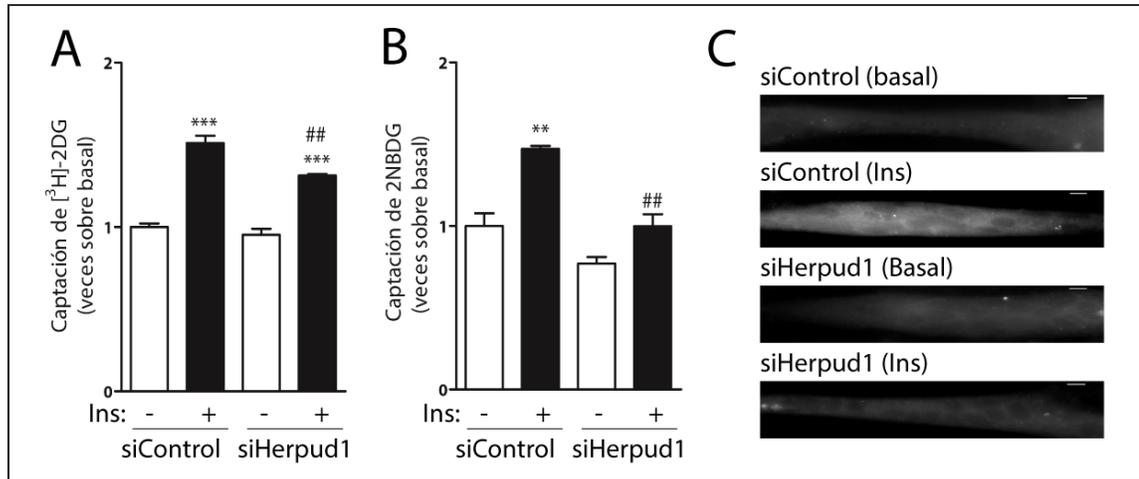
de glucosa en condiciones basales y ante el estímulo con insulina. Para este experimento, los miotubos L6 fueron transfectados con un siControl o un siHerpud1 el día 3 de diferenciación, tras lo cual fueron mantenidos durante 48 h en medio de diferenciación. El día del experimento, los miotubos L6 fueron privados de suero por 3 h, siendo estimulados a continuación con insulina 100 nM durante 20 min. La captación de glucosa se evaluó a través de la incorporación de  $^3\text{H}$ -2-deoxi-glucosa (**Figura 15A**) y del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (**Figura 15B-C**). En ambos experimentos se observa una disminución en la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6 siHerpud1.

Dado que la captación de glucosa dependiente de insulina en las células musculares esqueléticas depende de la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática, a continuación, se evaluó el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la presencia de GLUT4 en la membrana plasmática en condiciones basales y ante el estímulo con insulina. Para este experimento se utilizaron células L6 que expresan de manera estable el transportador de glucosa GLUT4 con un epítipo myc, el cual se ubica en el primer loop extracelular del transportador (**Ichikura y cols., 2010**). La determinación se realizó a través de la técnica de O-fenilendiamina (OPD). Esta técnica permite la inmunodetección del epítipo myc del GLUT4 ubicado hacia la cara extracelular en células fijadas y no permeabilizadas. Las células son incubadas con el anticuerpo primario anti-c-myc (conejo), y luego con el anticuerpo secundario

anti-conejo asociado a la peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente se realiza la cuantificación de la reacción colorimétrica catalizada por la HRP acoplada al anticuerpo secundario. Los resultados obtenidos muestran que el knockdown de Herpud1 disminuye la presencia de GLUT4 en la superficie celular inducida por insulina, sin alterar los niveles basales (**Figura 16**). Adicionalmente, podemos mencionar que no se observaron diferencias en los niveles proteicos de GLUT4 (**Figura 10**).

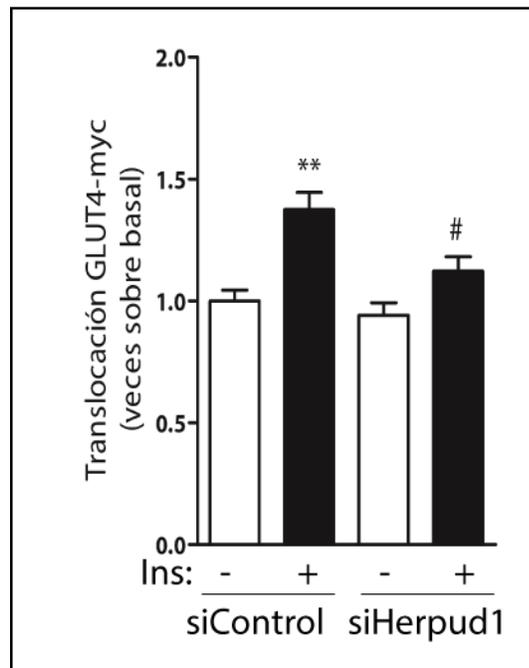
A continuación, se evaluó el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la vía de señalización intracelular inducida por insulina. Para este experimento, los miotubos L6 fueron incubados con el siHerpud1 o el siControl el día 3 de diferenciación, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Tras 48 h en medio de diferenciación, las células fueron privadas de suero (3 h), y estimuladas con insulina 100 nM (20 min), tras lo cual se realizó la extracción de proteínas totales para *Western blot*. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la fosforilación del RI (Tyr-1361) inducida por insulina entre ambas condiciones (**Figura 17A-B**). A continuación, se evaluó el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la fosforilación de Akt en los residuos Ser-473 y Thr-308. Ambas fosforilaciones, dependientes de insulina, son necesarias para la activación total de Akt (**Alessi y cols., 1997; Sarbassov y cols, 2005**). Los resultados no mostraron diferencias entre ambas condiciones en la fosforilación de Akt (Thr-308) inducida por insulina (**Figura 17C-D**). Por otro lado, el

knockdown de Herpud1 disminuyó la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en los miotubos L6 (**Figura 17E-F**).

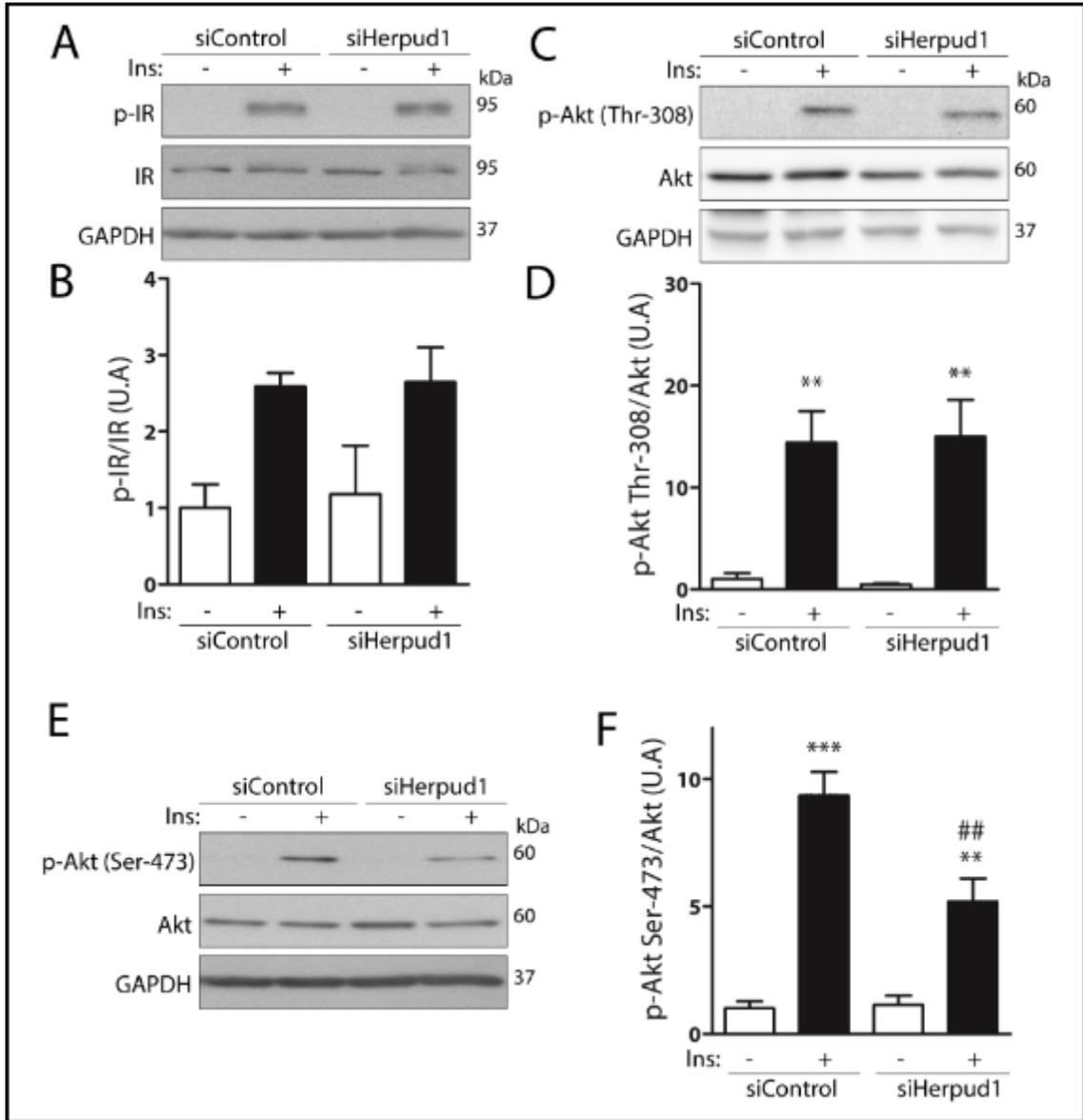


**Figura 15: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la captación de glucosa en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación por 48 h. El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. (A) Incorporación de  $[^3\text{H}]\text{-2DG}$  en condiciones basales y en presencia de insulina. Luego del estímulo con insulina, las células se lavaron con tampón HEPES dos veces y se incubaron exactamente 10 min con la solución de  $[^3\text{H}]\text{-2DG}$  (solución de transporte), tras lo cual la reacción se detuvo agregando solución stop fría. Posteriormente las células se lisaron y se determinó la emisión  $\beta$  en un contador de centelleo líquido. Los datos fueron relativizados por la concentración de proteínas de cada muestra, determinada mediante el método de BCA (n = 4). (B) Efecto del *knockdown* de Herpud1 en la incorporación de 2-NBDG en condiciones basales y ante el estímulo con insulina. Tras el estímulo con insulina, las células fueron incubadas exactamente 10 min con 2-NBDG 300  $\mu\text{M}$ . El transporte se detuvo agregando tampón HEPES suplementado con glucosa 20 mM frío. A continuación, las células se lavaron con el mismo tampón y se mantuvieron a 4°C hasta la obtención de las imágenes. Para cada condición se obtuvieron al menos 10 fotos, equivalentes a aproximadamente 50 células. Para el análisis de datos se determinó la intensidad de fluorescencia en regiones de interés (ROIs), descontando la fluorescencia de fondo, utilizando el programa

ImageJ (NIH, EE. UU.) (n = 3). (C) Imagen representativa de la captación de 2-NBDG para cada una de las condiciones (barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ). \*\* p < 0.01 y \*\*\* p < 0.001 respecto a la condición basal en cada grupo. ## p < 0.01 y ### p < 0.001 entre las condiciones estimuladas con insulina. ANOVA de 2 vías (Tukey post-test).



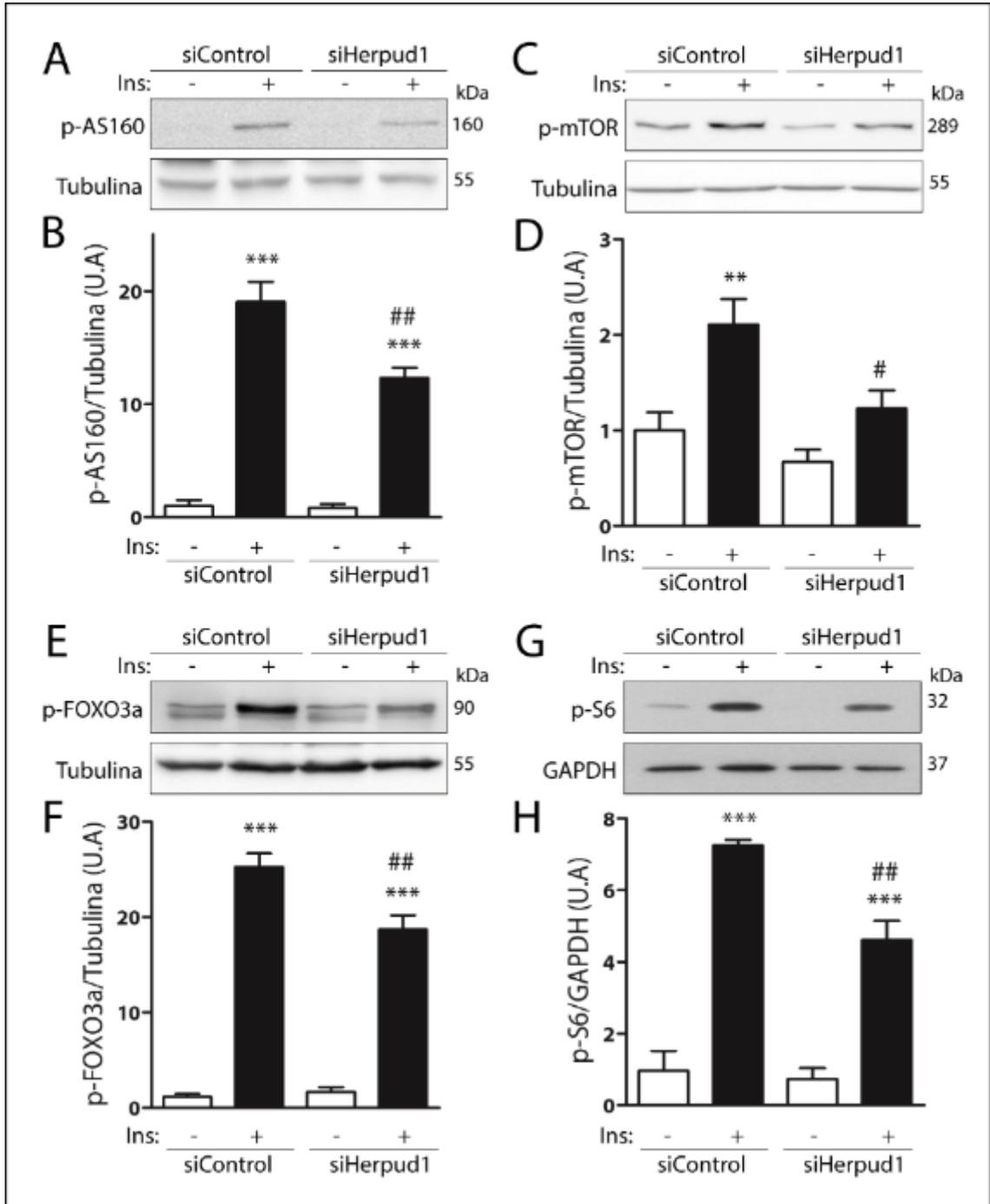
**Figura 16: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles de GLUT4 en la membrana plasmática en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación (48 h). El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. La translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática se evaluó mediante la técnica de OPD (n = 4). \*\* p < 0.01 respecto a la condición basal. ## p < 0.01 entre las condiciones estimuladas con insulina. ANOVA de 2 vías (Tukey post-test).



**Figura 17: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en la fosforilación del RI (Tyr-1361) y de Akt en los residuos Ser-473 y Thr-308 en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos L6 fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación (48 h). El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Posteriormente, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de la

fosforilación del RI en el residuo Tyr-1361 (p-IR), RI total y GAPDH en condiciones basales y ante el estímulo con insulina. (B) Cuantificación densitométrica (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de Akt (Thr-308), Akt total y GAPDH. (D) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt (Thr-308)/Akt (n = 5). (E) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de Akt (Ser-473), Akt total y GAPDH. (F) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt (Ser-473)/Akt (n = 4). \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 respecto a la condición basal. ## p < 0.01 entre las condiciones estimuladas con insulina. ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

Posteriormente, se evaluó el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la fosforilación de diversas proteínas blanco de Akt. Como se mencionó previamente, la translocación de GLUT4 hacia la superficie celular inducida por insulina depende de la inhibición de AS160 (**Miinea y cols., 2005**). Esta proteína es inhibida a través de la fosforilación en el residuo Thr-642, la cual es dependiente de Akt (**Peck y cols., 2009**). Los resultados muestran una disminución en la fosforilación de AS160 (Thr-642) inducida por insulina en los miotubos L6 siHerpud1 (**Figura 18A-B**). Además, se observó una disminución en la fosforilación dependiente de insulina de las proteínas mTOR (Ser-2448) y FOXO3a (Thr-32) en los miotubos L6 *knockdown* para Herpud1 (**Figura 18C-F**). Ambas proteínas son blancos directos de Akt (**Brunet y cols., 1999; Magnuson y cols., 2012; Sekulic y cols., 2000**). Adicionalmente, los resultados muestran una disminución en la fosforilación de S6 (Ser-235/236) en miotubos L6 siHerpud1 estimulados con insulina (**Figura 18H-I**). S6 es una quinasa activada río debajo de Akt en la cascada de señalización de insulina (**Radimerski y cols., 2000**).



**Figura 18: Efecto del *knockdown* de Herpud1 en la activación de proteínas blanco de Akt en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos L6 fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria

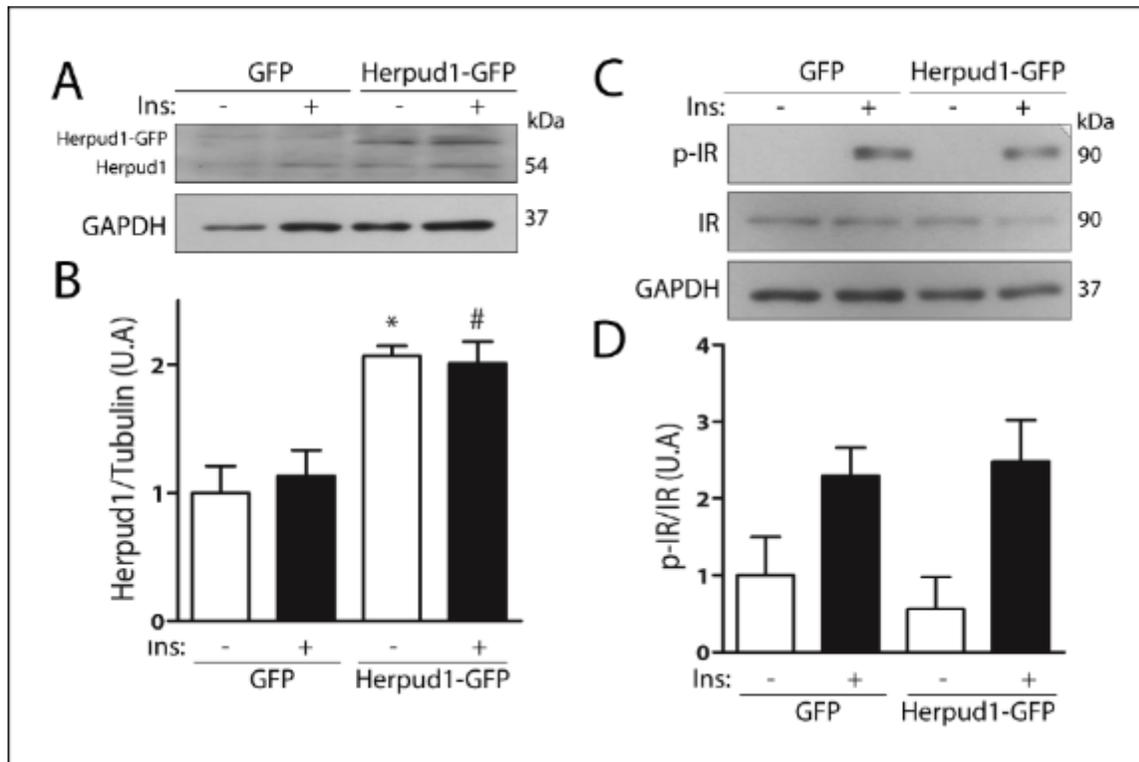
(siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación (48 h). El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Posteriormente, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de AS160 en el residuo Thr-642 (p-AS160) y tubulina. (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-AS160/Tubulina, realizada con el programa ImageJ (n = 5). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de mTOR en el residuo Ser-2448 (p-mTOR) y tubulina. (D) Cuantificación densitométrica de la relación p-mTOR/Tubulina (n = 5). (E) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de FOXO3a en la Thr-32 (p-FOXO3a) y tubulina. (F) Cuantificación densitométrica con el programa ImageJ de la relación p-FOXO3a/Tubulina (n = 5). (G) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de S6 (Ser-235/236) y GAPDH. (H) Cuantificación densitométrica con el programa ImageJ (n=5). \*\*\* p < 0.001; \*\* p < 0.01 respecto a la condición basal. # p < 0.05; ## p < 0.01 entre las condiciones estimuladas con insulina. ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

Para complementar los resultados obtenidos con el silenciamiento de Herpud1, se investigó el efecto de la sobreexpresión de la proteína en la respuesta a insulina en los miotubos L6. Con este fin, las células L6 fueron transfectadas el día 3 de diferenciación con un plásmido que codifica para la proteína Herpud1 con un epítipo GFP en el extremo N terminal (Herpud1-GFP), o con un plásmido que codifica para la proteína GFP como control. La transfección se realizó en medio Opti-MEM, utilizando Lipofectamina como reactivo de transfección, durante 6 h, tras lo cual las células se incubaron en medio de diferenciación por 48 h. El día del experimento, los miotubos L6 fueron privados de suero por 3 h y luego se estimularon con insulina 100 nM durante 20 min. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales y la

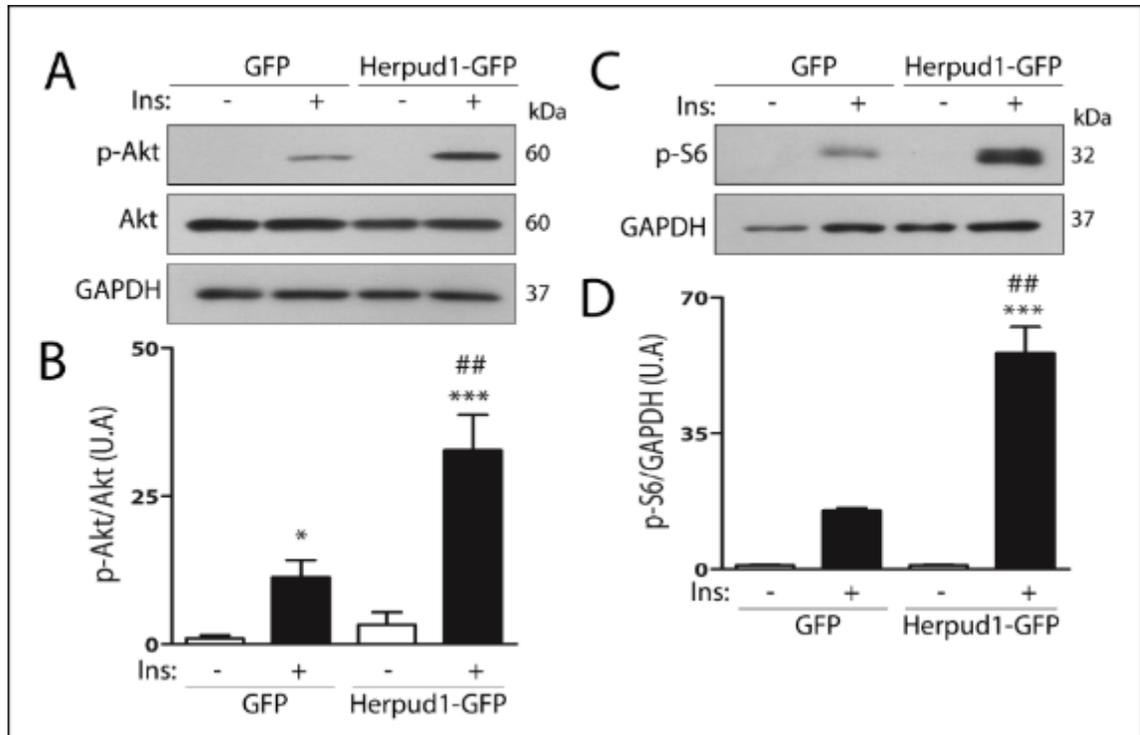
determinación de proteínas mediante *Western blot*. Se observó un incremento en los niveles proteicos de Herpud1, aproximadamente al doble de la condición control (**Figura 19A-B**). A continuación, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la cascada de señalización activada por insulina en los miotubos L6. No se observaron diferencias en la fosforilación del RI (Tyr-1361) entre los miotubos L6 GFP y los miotubos L6 Herpud1-GFP (**Figura 19C-D**). Por otro lado, los resultados muestran que la sobreexpresión de Herpud1 aumentó la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en los miotubos L6 (**Figura 20A-B**). Del mismo modo, se observó un incremento en la fosforilación de S6 (Ser-235/236) inducida por insulina en las células que sobreexpresan Herpud1 (**Figura 20C-D**).

A continuación, se procedió a evaluar el efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6. Para este experimento, las células fueron transfectadas con un plásmido que expresa la proteína Herpud1 (ratón), siguiendo el mismo protocolo mencionado previamente. No se utilizó el plásmido Herpud1-GFP debido a la interferencia de fluorescencia entre la proteína GFP y el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG. Los resultados muestran un incremento en la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6 Herpud1, en relación a la condición control tratada con la hormona (pcDNA) (**Figura 21A**). Sin embargo, la diferencia entre la captación de glucosa basal y la estimulada con insulina no es distinta entre las células control (pcDNA) y las células que sobreexpresan Herpud1

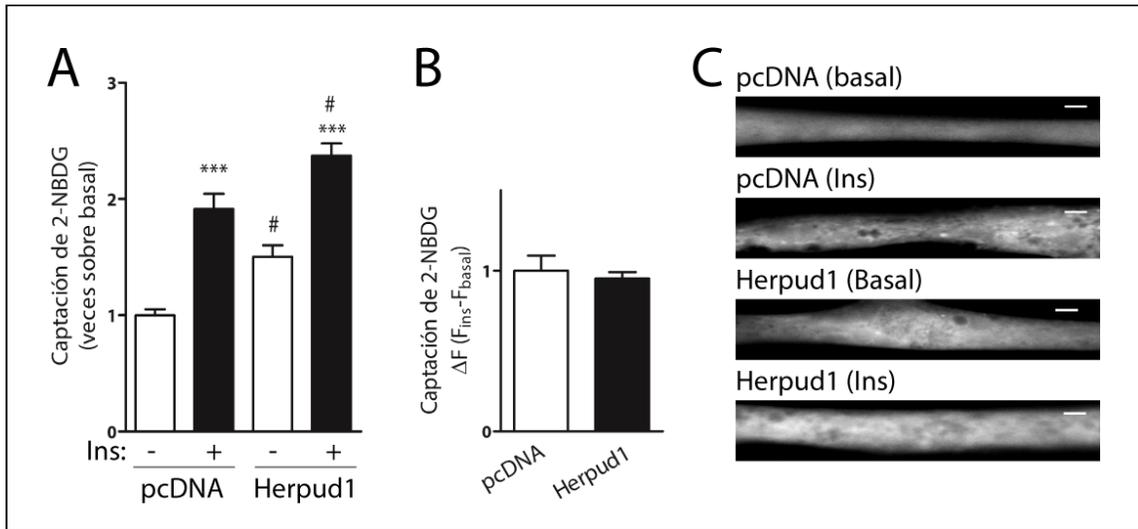
(Figura 21B). Esto posiblemente se relacione al aumento en la captación basal de glucosa observada en los miotubos L6 Herpud1 (Figura 21A).



**Figura 19: Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la fosforilación del RI (Tyr-1361) en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con los plásmidos GFP o Herpud1-GFP (humano) en medio Opti-MEM durante 6 h, utilizando Lipofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h. El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h y luego se estimularon con insulina 100 nM durante 20 min. Posteriormente se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de Herpud1, Herpud1-GFP y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa de los niveles de fosforilación del RI en el residuo Tyr-1361 (p-IR), RI total y GAPDH. (D) Cuantificación de la relación p-IR/IR (n = 3). \* p < 0.05 entre las condiciones basales. # p < 0.05 entre las condiciones estimuladas con insulina.



**Figura 20: Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la fosforilación de Akt (Ser-473) y S6 (Ser-235/236) en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con los plásmidos GFP o Herpud1-GFP (humano) en medio Opti-MEM durante 6 h, utilizando Lipofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h. El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h y luego se estimularon con insulina 100 nM durante 20 min. Posteriormente se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de Akt en el residuo Ser-473 (p-Akt), Akt total y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt ( $n = 3$ ). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de S6 en la Ser-235/236 (p-S6) y GAPDH. (D) Cuantificación densitométrica de la relación p-S6/GAPDH ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  respecto a la condición basal. ##  $p < 0.01$  entre las condiciones estimuladas con insulina. ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

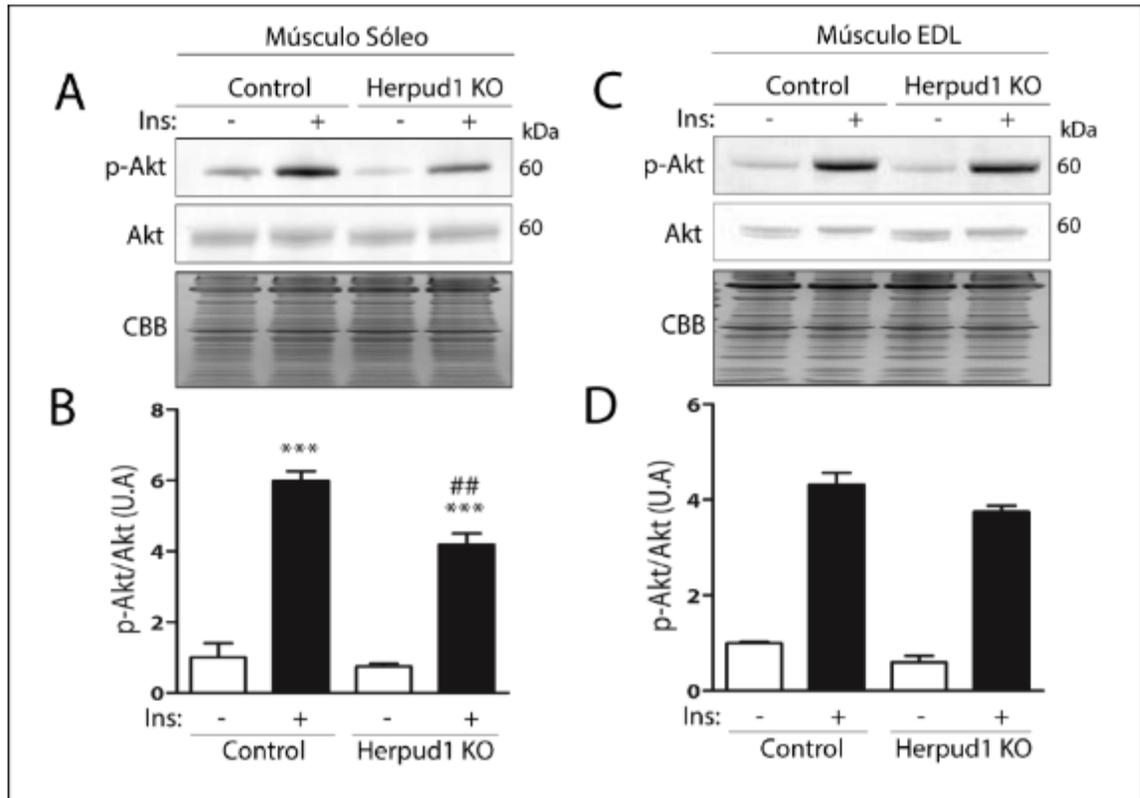


**Figura 21: Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la captación de glucosa en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con los plásmidos pcDNA o Herpud1 (ratón) en medio Opti-MEM durante 6 h, utilizando Lipofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h. El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h y luego se estimularon con insulina 100 nM durante 20 min en tampón HEPES. Transcurrido este período, las células fueron incubadas exactamente 10 min con 2-NBDG 300  $\mu$ M. El transporte se detuvo agregando tampón HEPES suplementado con glucosa 20 mM frío. A continuación, las células se lavaron con el mismo tampón y se mantuvieron a 4°C hasta la obtención de las imágenes. Para cada condición se obtuvieron al menos 10 fotos, equivalentes a aproximadamente 50 células. Para el análisis de datos se determinó la intensidad de fluorescencia en regiones de interés (ROIs), descontando la fluorescencia de fondo, utilizando el programa ImageJ (NIH, EE. UU.). (A) Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la incorporación de 2-NBDG en condiciones basales y ante el estímulo con insulina (n = 4). (B) Cuantificación de la diferencia entre la incorporación de 2-NBDG estimulada por insulina y la captación basal en ambas condiciones. (C) Imagen representativa de la incorporación de 2-NBDG en cada una de las condiciones (barra de escala = 10  $\mu$ m). \*\*\* p < 0.001 respecto a la condición basal en cada grupo. # p < 0.05 entre las condiciones estimuladas con insulina. ANOVA de 2 vías (Tukey post-test).

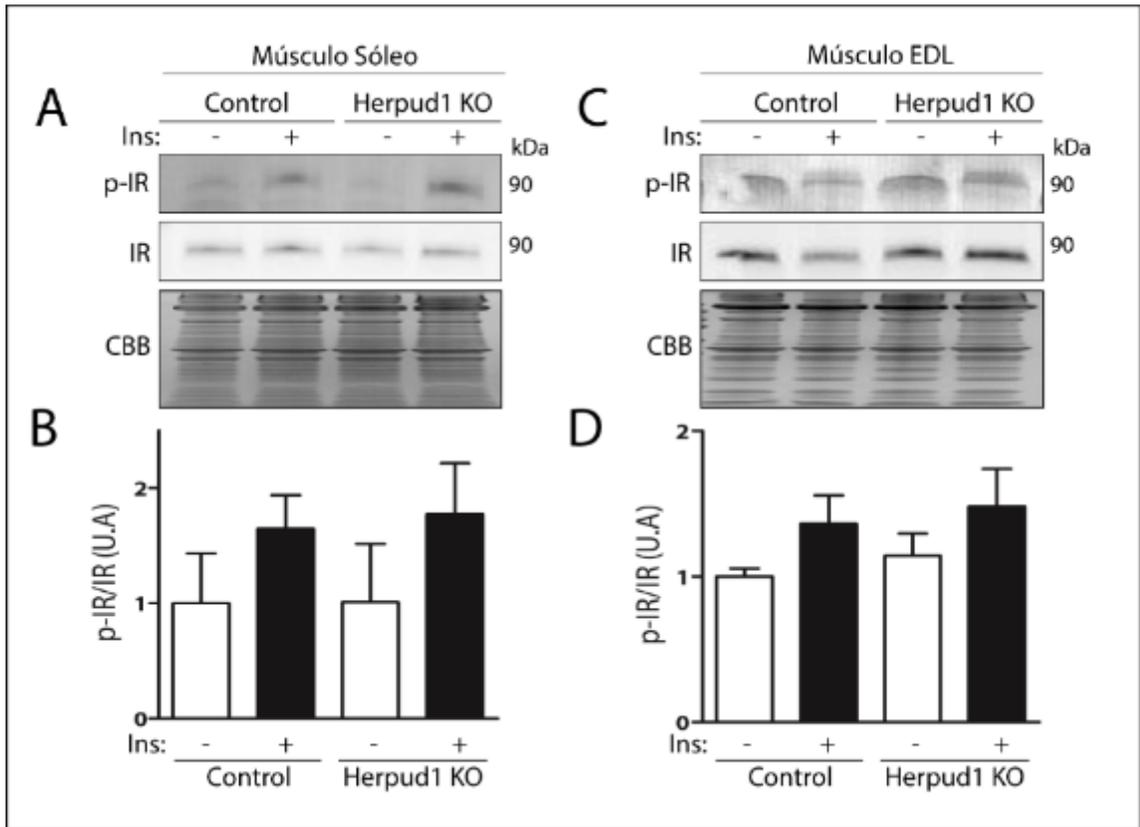
Para corroborar estos hallazgos *in vivo*, se evaluó la señalización de insulina en el músculo esquelético del ratón *knockout* general para la proteína

Herpud1. Estos experimentos fueron realizados por Natalia Torrealba y Yuka Eura en el laboratorio del Dr. Koichi Kokame (National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka, Japón). Se administró una inyección intraperitoneal de insulina 1 UI/Kg a ratones control (C57BL/6) y ratones Herpud1 KO durante 7.5 min, tras lo cual fueron sacrificados, y se obtuvieron muestras de músculo sóleo y extensor largo de los dedos (*extensor digitorum longus*, EDL) para análisis por *Western blot*, de acuerdo con lo reportado previamente (**Butler y cols., 2002; Lee et al., 2015**). Los resultados mostraron una disminución en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en el músculo sóleo de los ratones Herpud1 KO (**Figura 22A-B**). En el músculo EDL no se observó una diferencia en la fosforilación de Akt (Ser-473) entre el ratón control y el ratón Herpud1 KO (**Figura 22C-D**). Por otro lado, no se detectaron diferencias en la fosforilación del RI (Tyr-1361) entre el ratón control y el ratón Herpud1 KO en el músculo sóleo ni en el músculo EDL (**Figura 23**).

En su conjunto, estos resultados muestran que la proteína Herpud1 es necesaria para la adecuada fosforilación de Akt (Ser-473), la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática y la captación de glucosa inducida por insulina en células musculares esqueléticas.



**Figura 22: Fosforilación de Akt (Ser-473) en el músculo esquelético de ratones KO para Herpud1.** Tras 12 h de ayuno, los ratones control (C57BL/6) y Herpud1 KO se inyectaron con insulina (1 U/Kg) vía intraperitoneal. Transcurridos 7.5 min, los animales fueron sacrificados y se realizó inmediatamente la extracción de los músculos sóleo y EDL. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de Akt en el residuo Ser-473 (p-Akt) y Akt total, en condiciones basales y ante el estímulo con insulina, en el músculo sóleo. Como control de carga se utilizó la tinción con azul de coomassie (CCB). (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de Akt (ser-473) y de los niveles totales de Akt en el músculo EDL en ratones control y KO para Herpud1. (D) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt (n = 3). ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).



**Figura 23: Fosforilación del RI (Tyr-1361) en el músculo esquelético de ratones KO para Herpud1.** Tras 12 h de ayuno, los ratones control (C57BL/6) y Herpud1 KO se inyectaron con insulina (1 U/Kg) vía intraperitoneal. Transcurridos 7.5 min, los animales fueron sacrificados y se realizó inmediatamente la extracción de los músculos sóleo y EDL. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de fosforilación del RI en el residuo Tyr-1361 (p-IR) y del RI total, en condiciones basales y ante el estímulo con insulina, en el músculo sóleo. Como control de carga se utilizó la tinción con azul de coomasie (CBB). (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-IR/IR (n = 3) en el músculo sóleo. El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa de los niveles de p-IR y de los niveles totales del RI en el músculo EDL en ratones control y KO para Herpud1. (D) Cuantificación densitométrica de la relación p-IR/IR en el músculo EDL (n = 3). ANOVA de 1 vía (Tukey post-test).

## **6.2 Determinar el papel de Herpud1 en la regulación de la vía**

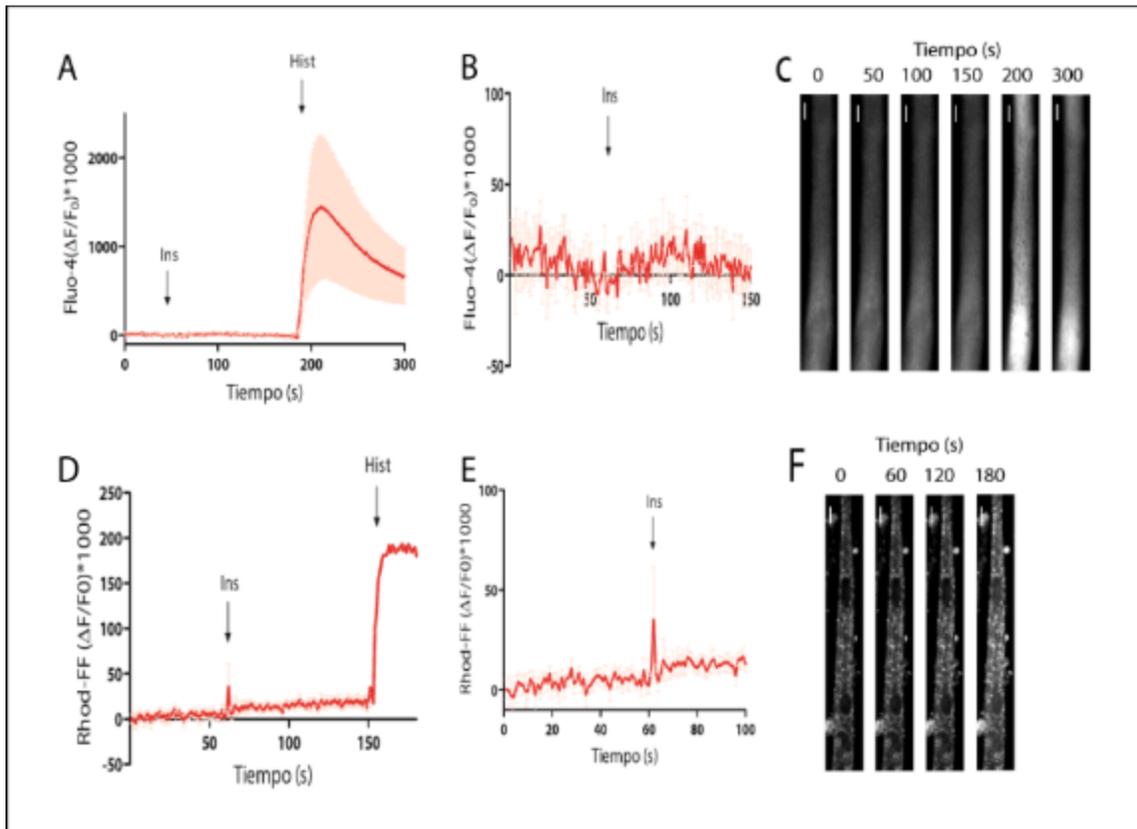
### **transduccional Ca<sup>2+</sup>-calcineurina en células musculares esqueléticas**

Como se ha mencionado previamente, la proteína Herpud1 es un importante regulador de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular en modelos neuronales (**Belal y cols., 2012; Chan y cols., 2004; Chigurupati y cols., 2009**). Por otro lado, el Ca<sup>2+</sup> intracelular participa en las respuestas celulares inducidas por insulina en el músculo esquelético (**Contreras-Ferrat y cols., 2014a**). Para determinar el posible rol de la proteína Herpud1 en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular en las células musculares esqueléticas, se evaluaron los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico y mitocondrial en miotubos L6 siControl y siHerpud1. Inicialmente, se evaluó la respuesta de Ca<sup>2+</sup> citosólica y mitocondrial inducida por insulina 100 nM en los miotubos L6, utilizando como sensores de Ca<sup>2+</sup> las sondas fluorescentes Fluo-4 AM y Rhod-FF AM, respectivamente. Los resultados no mostraron una señal de Ca<sup>2+</sup> consistente ante el estímulo con insulina (**Figura 24**). Como alternativa, se planteó la determinación de las señales de Ca<sup>2+</sup> intracelulares producidas por histamina, la cual se une a receptores acoplados a proteínas Gq que activan a fosfolipasa C e incrementan los niveles de IP<sub>3</sub>, induciendo la salida de Ca<sup>2+</sup> desde el RE vía IP<sub>3</sub>R (**Medina y Rivera, 2010**). Los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico se evaluaron utilizando la sonda fluorescente sensible a Ca<sup>2+</sup> Fura-2 AM. Luego de 30 min de incubación con la sonda, las células fueron lavadas con tampón Krebs y se montaron en una cámara metálica de 1 mL de capacidad. Luego se determinó la fluorescencia basal durante 60 s, tras lo cual se aplicó el estímulo

(histamina 100  $\mu\text{M}$ ) directamente a la cámara. Se obtuvieron imágenes cada 2 s. Los resultados no mostraron diferencias en los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  entre los miotubos L6 siControl y siHerpud1 (**Figura 25A, B y C**). Por otro lado, el silenciamiento de Herpud1 incrementó la fluorescencia máxima generada por el estímulo con histamina 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 25A, B y E**), sin cambios en el área bajo la curva (**Figura 25A, B y D**). Para corroborar estos resultados, se determinó la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducida por histamina utilizando la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 AM. En este experimento también se observó un incremento en la fluorescencia máxima inducida por histamina en los miotubos L6 siherpud1 (**Figura 26**).

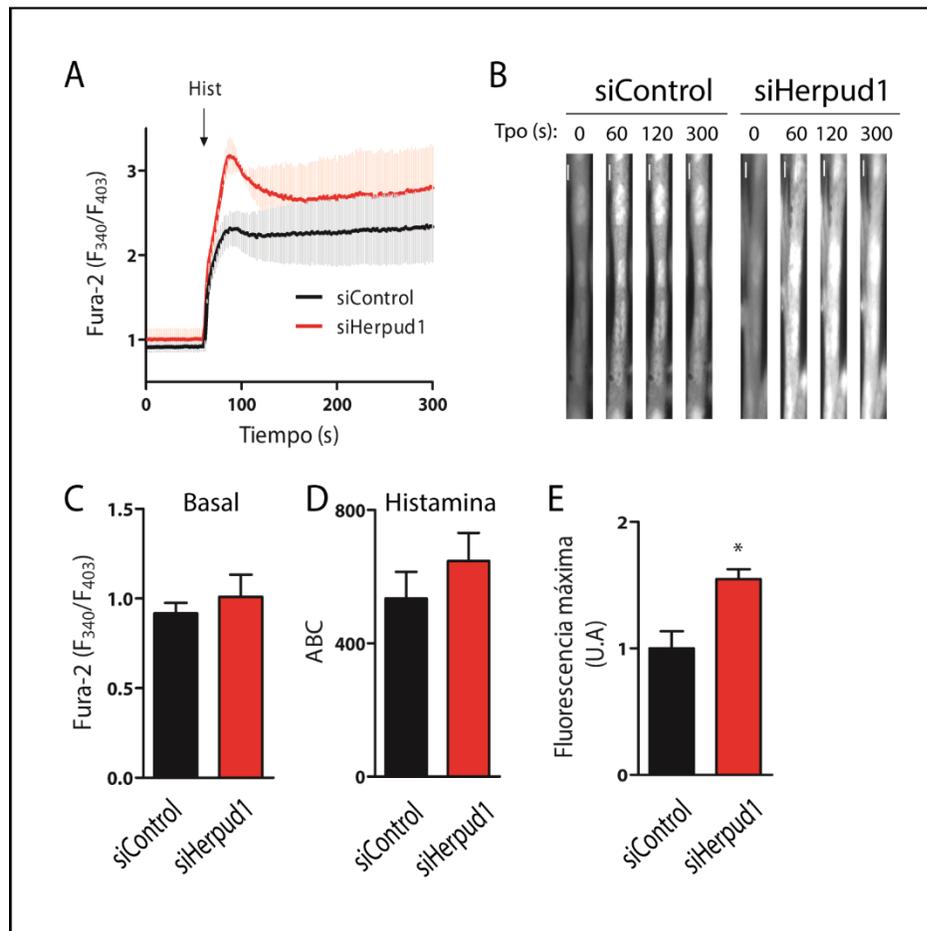
Dado que la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria también se relaciona a alteraciones en la respuesta a insulina, se procedió a evaluar el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial dependiente de la activación del  $\text{IP}_3\text{R}$  (**Del Campo y cols., 2013; Contreras-Ferrat y cols., 2010; Contreras-Ferrat y cols., 2014b; Gutiérrez y cols., 2014; Rieusset y cols., 2015**). Para esto se determinó la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inducida por histamina 100  $\mu\text{M}$  utilizando el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  genéticamente codificado mitoPericam. La transfección del plásmido se realizó el día 3 de diferenciación, en paralelo a la transfección del siHerpud1, utilizando Lipofectamina como reactivo de transfección. Si bien mitoPericam es un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  radiométrico (máximos de excitación a 415 y 485 nm), la excitación a 485 nm es altamente sensible a cambios del pH celular, por lo que no se consideró en el análisis

(Fonteriz y cols., 2010). Los resultados muestran que el silenciamiento de Herpud1 disminuye la fluorescencia máxima y el área bajo curva de la señal inducida por histamina (Figura 27).



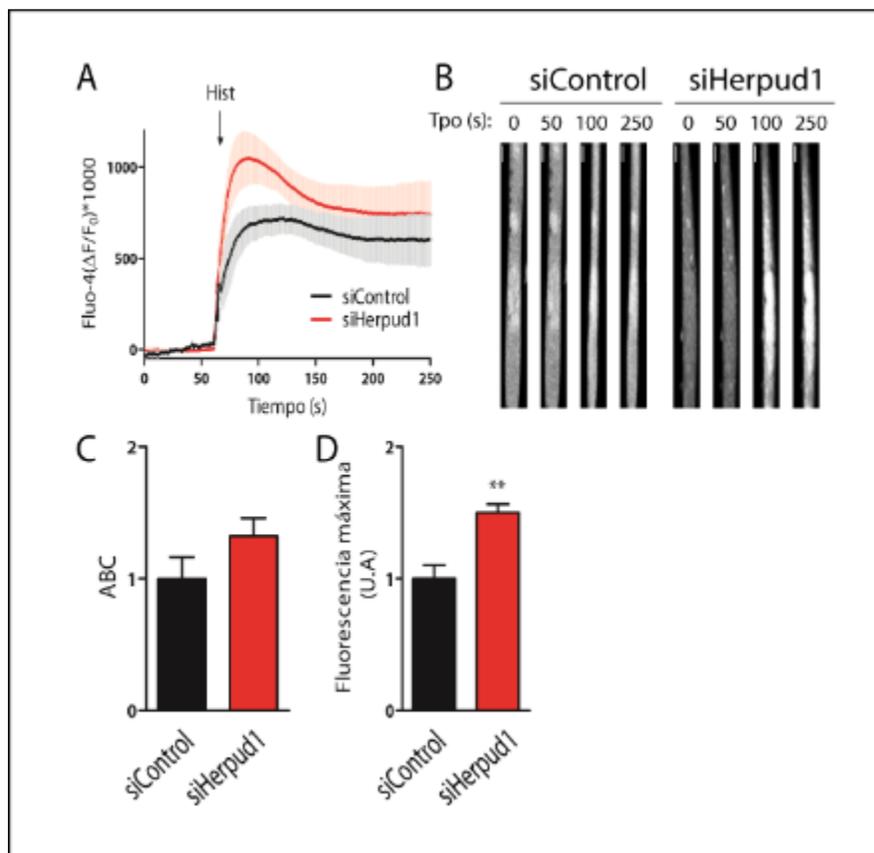
**Figura 24: Respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por insulina en los miotubos L6.** Luego de 5 días en medio de diferenciación, las células se lavaron 3 veces con tampón Krebs y luego se incubaron por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$  con una de las sondas fluorescentes sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ . Posteriormente las células se lavaron con Krebs y se montaron en una cámara matélica. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal de disco rotatorio DSU Olympus (objetivo 40x), recolectándose imágenes cada 1 s. (A) Cinética de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, utilizando la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 AM ( $5,4 \mu\text{M}$ ). Se realizó una medición basal (60 s), tras lo cual los miotubos L6 fueron estimulados con insulina 100 nM (Ins), siendo finalmente estimulados con histamina  $100 \mu\text{M}$  (Hist) a los 180 s. Las células se excitaron con un láser a 488 nm ( $n = 6$ ). (B) Amplificación de los primeros 150 s de medición. (C) Imagen representativa de la respuesta

observada (barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ). (D) Cinética de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, utilizando la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Rhod-FF AM (5,4  $\mu\text{M}$ ). Se realizó una medición basal (60 s), tras lo cual los miotubos L6 fueron estimulados con insulina 100 nM (Ins), siendo finalmente estimulados con histamina 100  $\mu\text{M}$  (Hist) a los 150 s. Las células se excitaron con un láser a 568 nm ( $n = 6$ ). (E) Amplificación de los primeros 100 s de medición. (C) Imagen representativa de la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  observada (barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ).



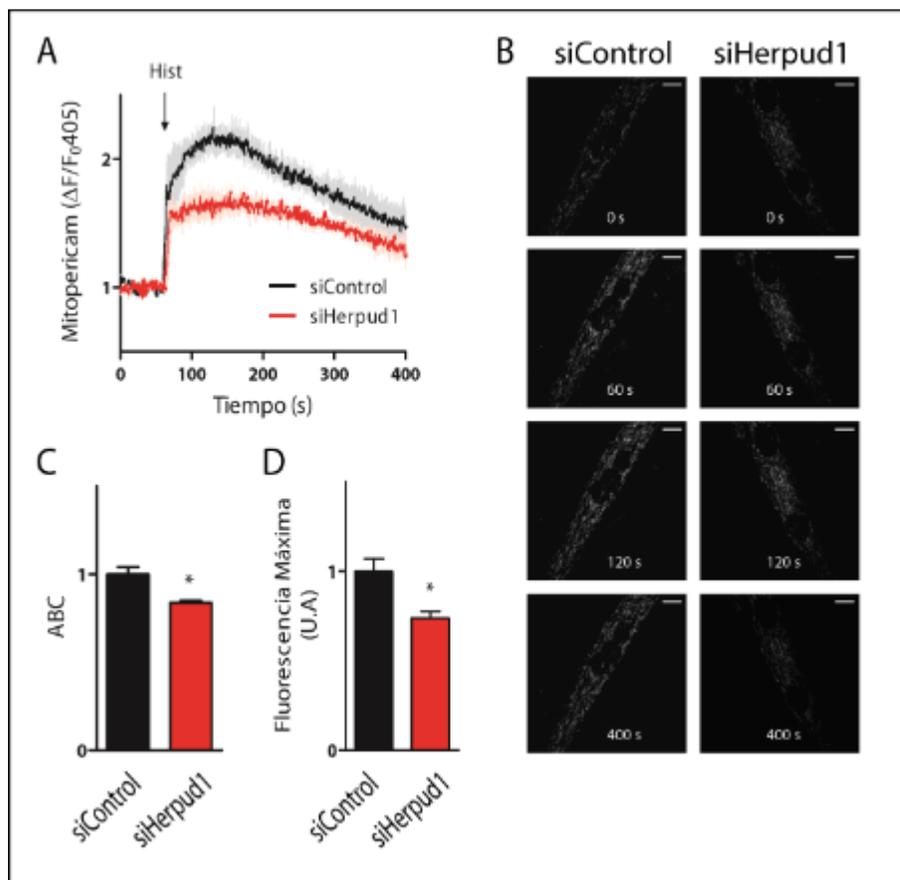
**Figura 25: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en los miotubos L6.** Tras 5 días en medio de diferenciación, las células control (siControl) y *knockdown* para Herpud1 (siHerpud1) se incubaron por 30 min a 37°C con la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fura-2 AM (5,4  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, las células se lavaron con tampón Krebs y se montaron en una cámara matélica. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal de disco rotatorio DSU Olympus (objetivo 40x). Las células se excitaron de manera alternada con un láser a 340 y 403 nm. Las imágenes se recolectaron cada 2 s.

Se realizó una medición basal (60 s), tras lo cual los miotubos fueron estimulados con histamina 100  $\mu\text{M}$  (Hist). (A) Cinética de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (n = 3). (B) Imagen representativa de la señal de fluorescencia ( $F_{340}$ ) en los miotubos L6 siControl y siHerpud1 a distintos tiempos (barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ). (C) Promedio de los valores de intensidad de fluorescencia (relación  $F_{340}/F_{403}$ ) durante los primeros 60 s para la condición control y knockdown para Herpud1 (n = 3). (D) ABC de la medición de  $\text{Ca}^{2+}$  luego del estímulo con histamina 100  $\mu\text{M}$  (n = 3). (E) Valor de fluorescencia máxima alcanzada luego del estímulo con histamina (n = 3). \*  $p < 0.05$  entre ambas condiciones.



**Figura 26: Respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica dependiente de  $\text{IP}_3\text{R}$  en los miotubos L6 siControl y siHerpud1.** Las células control (siControl) y knockdown para Herpud1 (siHerpud1) se lavaron 3 veces con tampón Krebs y luego se incubaron por 30 min a 37°C con la sonda fluorescente sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Fluo-4 AM (5,4  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente las células se lavaron con Krebs y se montaron en una cámara matérica. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal de disco rotatorio DSU Olympus (objetivo 40x). Las células

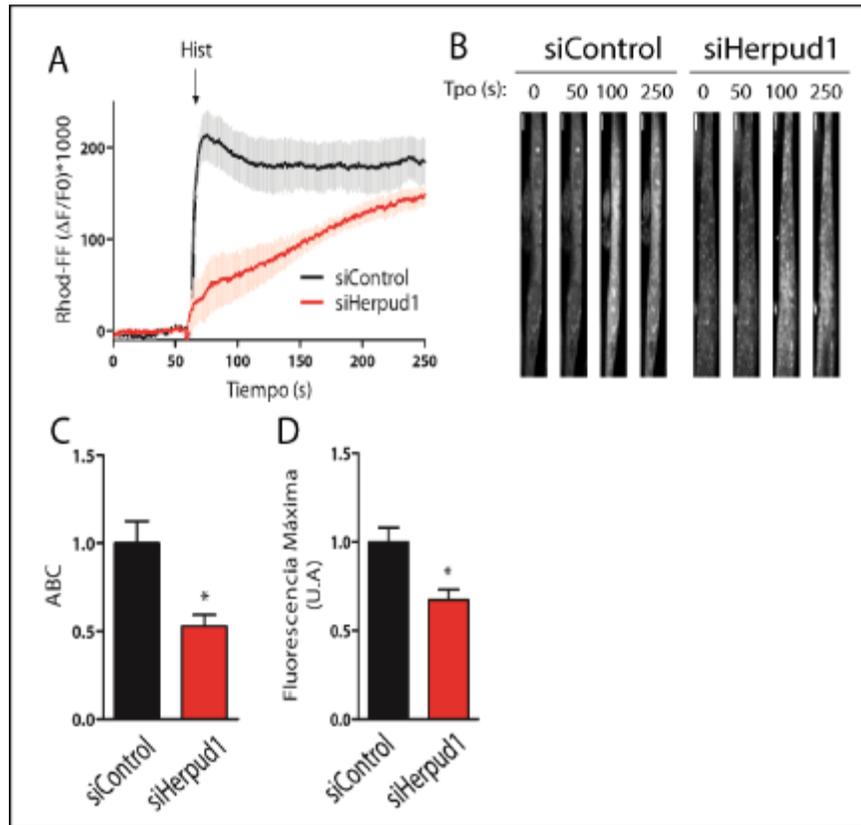
se excitaron con un láser a 488 nm, recolectándose imágenes cada 1 s. Se realizó una medición basal (60 s), tras lo cual los miotubos fueron estimulados con histamina 100  $\mu$ M (Hist) durante 180 s. (A) Cinética de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (n = 3). (B) Imágenes representativas de la señal de fluorescencia en los miotubos L6 siControl y siHerpud1 a distintos tiempos (barra de escala = 10  $\mu$ m). (C) Área bajo la curva (ABC) de la medición de  $\text{Ca}^{2+}$  luego del estímulo con histamina 100  $\mu$ M (n = 3). (D) Valor de fluorescencia máxima alcanzada luego del estímulo con histamina (n = 3). \*\* p < 0.01 entre ambas condiciones.



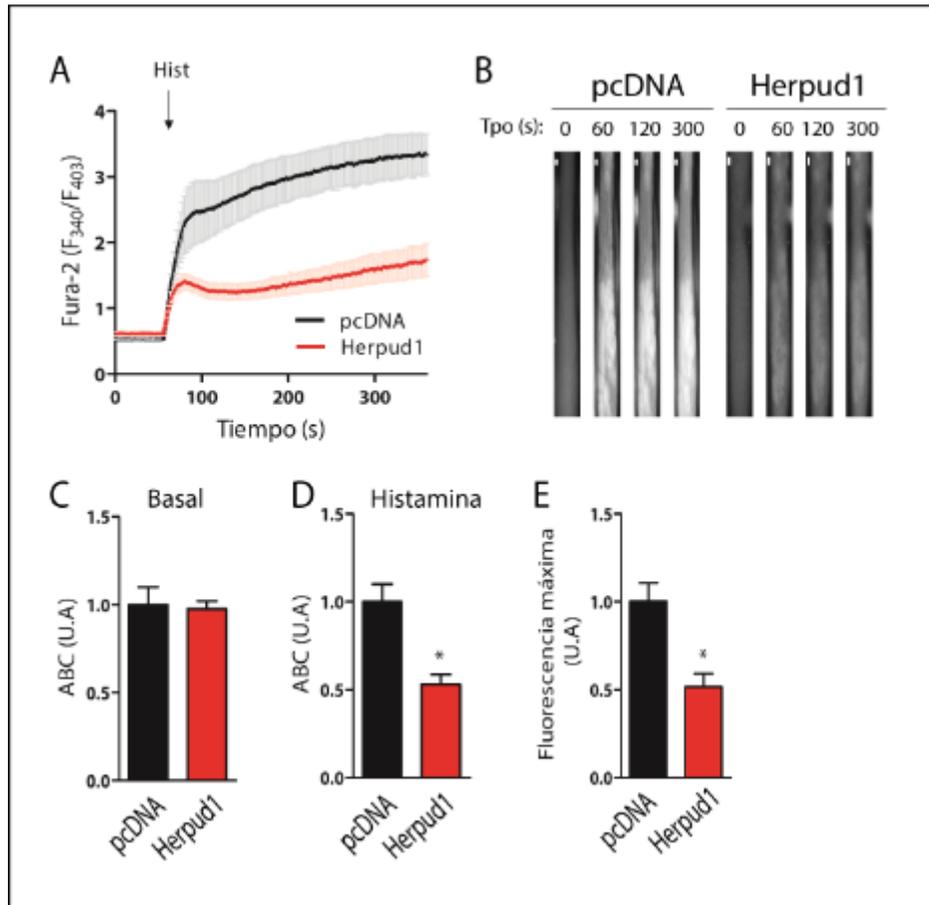
**Figura 27: Rol de Herpud1 en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en miotubos L6.** Las células control (siControl) y knockdown para Herpud1 (siHerpud1) se transfectaron con el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  genéticamente codificado mitoPeriCam 48 h antes del experimento. El día del experimento, las células se lavaron con tampón Krebs y se montaron en una cámara matélica. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal Leica LSM 700 (objetivo 40x). Las células se excitaron

con un láser a 405 nm, recolectándose imágenes cada 1 s. Se realizó una medición basal (60 s), tras lo cual las células se estimularon con histamina 100  $\mu$ M (Hist) durante 340 s. (A) Cinética de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en miotubos L6 control y *knockdown* para Herpud1 (n = 3). (B) Imágenes representativas de la señal de fluorescencia ( $F_{405}$ ) a distintos tiempos. (C) Área bajo la curva (ABC) de la medición de  $\text{Ca}^{2+}$  luego del estímulo con histamina 100  $\mu$ M (n = 3). (D) Valor de fluorescencia máxima alcanzada luego del estímulo con histamina (n = 3). \* p < 0.05 entre ambas condiciones.

Para corroborar estos resultados se evaluó la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inducida por histamina utilizando la sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  Rhod-FF, la cual se acumula preferencialmente en la mitocondria (Fonteriz y cols., 2010). Los resultados muestran una disminución en la fluorescencia máxima y en el área bajo la curva de la respuesta inducida por histamina en los miotubos L6 *knockdown* para Herpud1 (Figura 28). Para complementar estos resultados, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducida por histamina en los miotubos L6. Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión disminuye tanto la fluorescencia máxima como el área bajo la curva de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por histamina (Figura 29).



**Figura 28: Rol de Herpud1 en los niveles de  $Ca^{2+}$  mitocondrial en miotubos L6.** Las células control (siControl) y knockdown para Herpud1 (siHerpud1) se lavaron 3 veces con tampón Krebs y luego se incubaron por 30 min a  $37^{\circ}C$  con la sonda fluorescente sensible a  $Ca^{2+}$  Rhod-FF AM ( $5,4 \mu M$ ). Posteriormente las células se lavaron con tampón Krebs nuevamente y se montaron en una cámara matélica. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal de disco rotatorio DSU Olympus (objetivo 40x). Las células se excitaron con un láser a 568 nm. Las imágenes se recolectaron cada 1 s. Se realizó una medición de los niveles basales de fluorescencia (60 s), tras lo cual las células se estimularon con histamina  $100 \mu M$  (Hist) durante 200 s (A) Cinética de los niveles de  $Ca^{2+}$  mitocondrial en los miotubos L6 siControl y siHerpud1 ( $n = 3$ ). (B) Imágenes representativas de la fluorescencia observada a distintos tiempos. (C) Área bajo la curva (ABC) de la medición de  $Ca^{2+}$  mitocondrial luego del estímulo con histamina  $100 \mu M$  ( $n = 3$ ). (D) Valor de fluorescencia máxima alcanzada luego del estímulo con histamina ( $n = 3$ ). \*  $p < 0.05$  entre ambas condiciones.

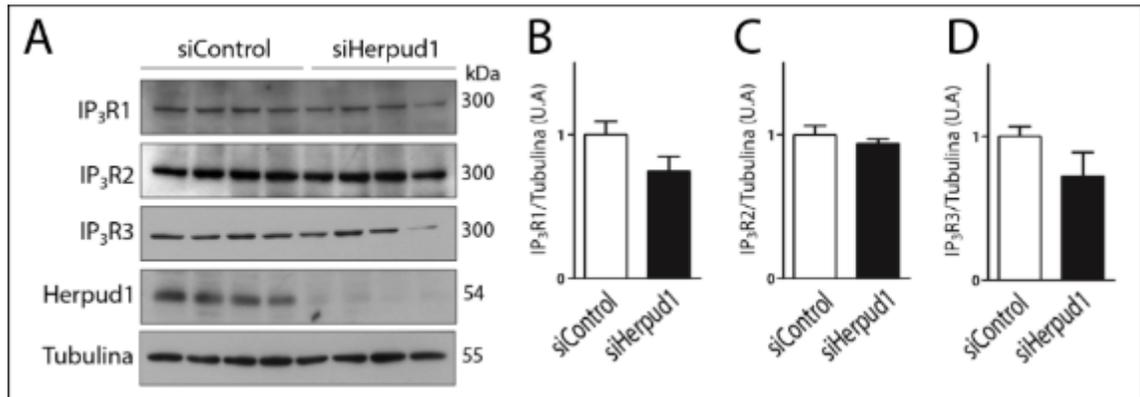


**Figura 29: Efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos L6 fueron transfectados con los plásmidos pcDNA o Herpud1 (ratón) en medio Opti-MEM durante 6 h, utilizando Lipofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h. El día del experimento, los miotubos L6 se incubaron por 30 min a  $37^{\circ}C$  con la sonda fluorescente sensible a  $Ca^{2+}$  Fura-2 AM ( $5,4 \mu M$ ). Posteriormente, las células se lavaron con tampón Krebs y se montaron en una cámara matélica. Las mediciones se realizaron en un microscopio confocal de disco rotatorio DSU Olympus (objetivo 40x). Las células se excitaron de manera alternada con un láser a 340 y 403 nm. Las imágenes se recolectaron cada 2 s. Se realizó una medición basal (60 s), tras lo cual los miotubos fueron estimulados con histamina  $100 \mu M$  (Hist). (A) Cinética de los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico ( $n = 3$ ). (B) Imagen representativa de la señal de fluorescencia ( $F_{340}$ ) en los miotubos L6 pcDNA y Herpud1 a distintos tiempos (barra de escala =  $10 \mu m$ ). (C) Área bajo la curva (ABC) de la medición de los niveles basales de  $Ca^{2+}$  ( $n = 3$ ). (D) ABC de la medición de  $Ca^{2+}$  luego del estímulo con histamina  $100 \mu M$  ( $n = 3$ ). (E)

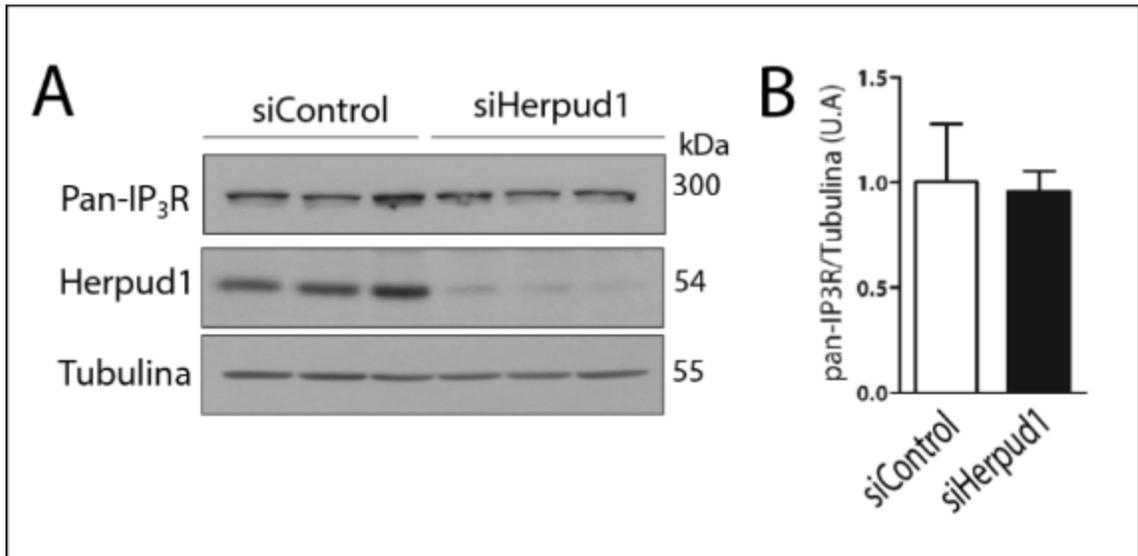
Valor de fluorescencia máxima alcanzada luego del estímulo con histamina (n = 3). \* p < 0.05 entre ambas condiciones.

Previamente, se ha propuesto que Herpud1 modula los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de la regulación de la degradación del  $\text{IP}_3\text{R}$  (**Belal y cols., 2012; Paredes y cols., 2016**). Para determinar si este mecanismo opera en las células musculares esqueléticas, se evaluó el efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles proteicos de las 3 isoformas del  $\text{IP}_3\text{R}$  en los miotubos L6. Los resultados no mostraron diferencias en relación a la condición control (**Figura 30**). Tampoco se observaron diferencias utilizando un anticuerpo primario que reconoce indistintamente las tres isoformas del  $\text{IP}_3\text{R}$  (anticuerpo pan-  $\text{IP}_3\text{R}$ ) (**Figura 31**).

En su conjunto, estos resultados muestran que el silenciamiento de Herpud1 incrementa la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmática dependiente de  $\text{IP}_3\text{R}$ . Este aumento va acompañado de una disminución en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inducida por histamina en los miotubos L6 *knockdown* para Herpud1. Estas diferencias no se relacionan con cambios en los niveles proteicos del  $\text{IP}_3\text{R}$  en el estado estacionario.



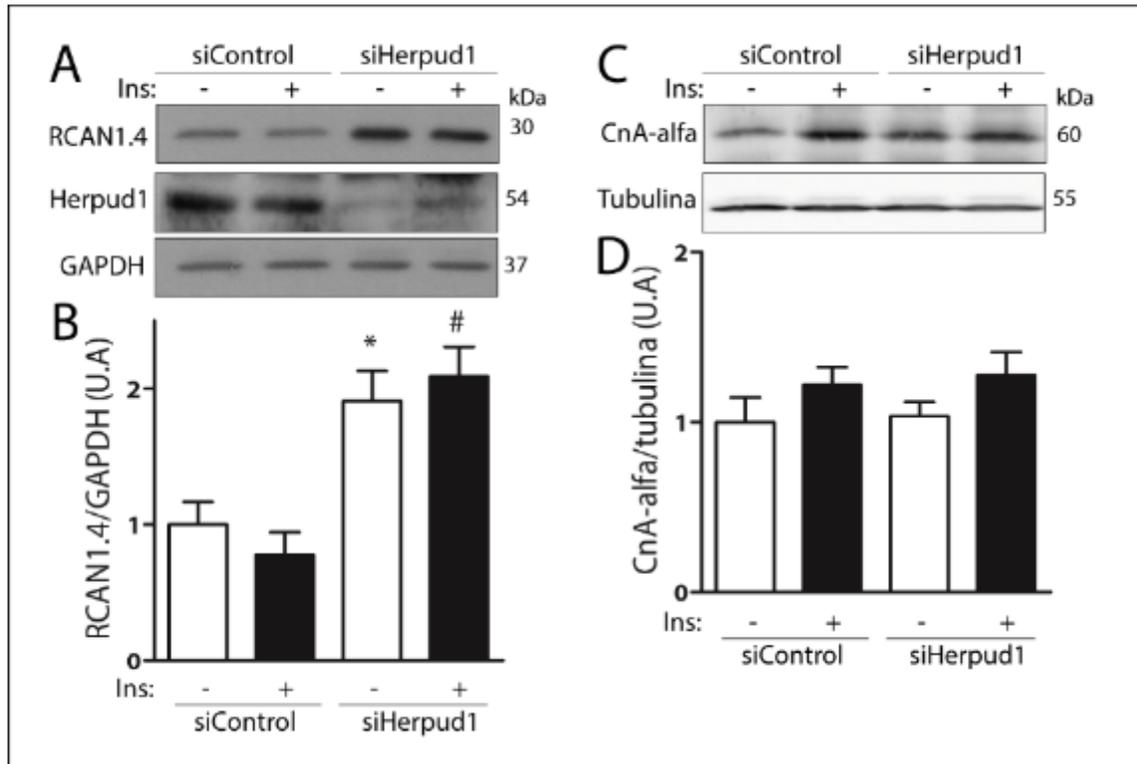
**Figura 30: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles de las isoformas del IP<sub>3</sub>R en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o con un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM durante 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h, tras lo cual se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante Western blot. (A) Imagen representativa de los niveles proteicos de las isoformas 1, 2 y 3 del IP<sub>3</sub>R, Herpud1 y tubulina. (B-D) Cuantificación densitométrica de los niveles proteicos de IP<sub>3</sub>R1 (B), IP<sub>3</sub>R2 (C) e IP<sub>3</sub>R3 (D) (n = 4). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos.



**Figura 31: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles totales de IP<sub>3</sub>R en los miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o con un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM durante 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h, tras lo cual se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles proteicos de pan-IP<sub>3</sub>R, Herpud1 y tubulina. (B) Cuantificación densitométrica de los niveles de IP<sub>3</sub>R en miotubos L6 siControl y siHerpud1 (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos.

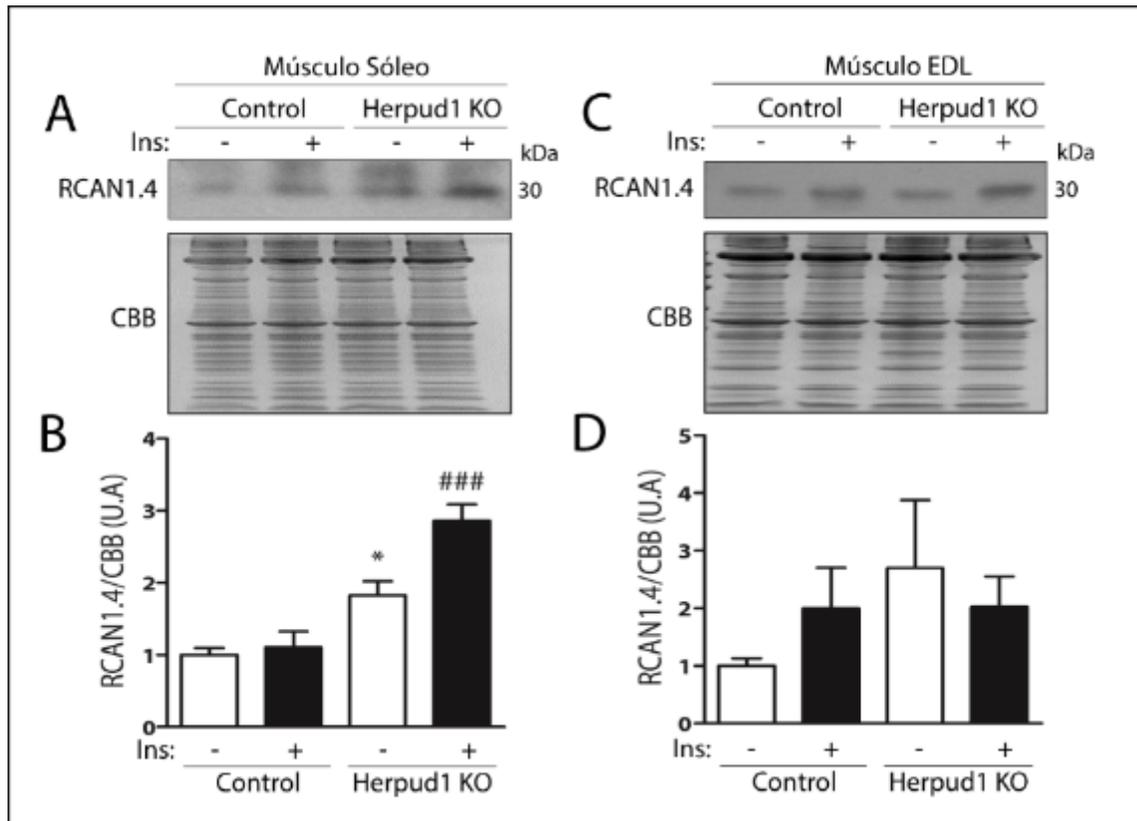
A continuación, nos enfocamos en determinar la relación entre las alteraciones en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular en las células L6 siHerpud1 y la resistencia a la insulina. Previamente, Ni y cols. mostraron que la serina/treonina fosfatasa calcineurina disminuye la fosforilación de Akt inducida por insulina en cardiomiocitos (Ni y cols., 2007). Calcineurina se activa en respuesta a aumentos en los niveles de Ca<sup>2+</sup> en el citosólico (Li y cols., 2011).

En base a estos antecedentes, se propuso investigar si el *knockdown* de Herpud1 podría llevar a un aumento en la actividad de calcineurina en los miotubos L6. Para determinar si Herpud1 regula la actividad de calcineurina, se evaluó, mediante *Western blot*, el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la expresión de la isoforma 4 de la proteína reguladora de calcineurina (RCAN1.4), cuya expresión depende directamente de la actividad de calcineurina-NFAT (Rothermel y cols., 2003). Los resultados muestran que el *knockdown* de Herpud1 incrementa de manera estadísticamente significativa la expresión de RCAN1.4, indicando de esta forma un aumento en la actividad de la fosfatasa calcineurina en los miotubos L6 siHerpud1 (Figura 32A-B). Por otro lado, no se observaron diferencias en los niveles proteicos de la subunidad A-alfa de calcineurina (Figura 32C-D). En concordancia con lo encontrado en los miotubos L6, se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles proteicos de RCAN1.4 en el músculo sóleo del ratón KO para Herpud1 (Figura 33A-B), sin observarse diferencias en el músculo EDL (Figura 33C-D).



**Figura 32: Efecto del silenciamiento de Herpud1 en los niveles proteicos de RCAN1.4 y de la subunidad alfa de calcineurina (CnA-alfa) en miotubos L6.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos L6 fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o con un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM durante 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h. El día del experimento, las células fueron privadas de suero por 3 h, y luego se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Posteriormente, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles proteicos de RCAN1.4, Herpud1 y GAPDH (B) Cuantificación densitométrica de los niveles de RCAN1.4 en células siControl y siHerpud1, en condiciones basales y ante el estímulo con insulina (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa de los niveles proteicos de la subunidad A alfa de calcineurina (CnA-alfa). Como control de carga se utilizó tubulina. (D) Cuantificación densitométrica de los niveles de CnA-alfa en miotubos L6 siControl y siHerpud1, en condiciones basales y ante el

estímulo con insulina (Ins) (n = 3). \* p < 0.05 entre las condiciones basales. # p < 0.05 entre las condiciones estimuladas con insulina.

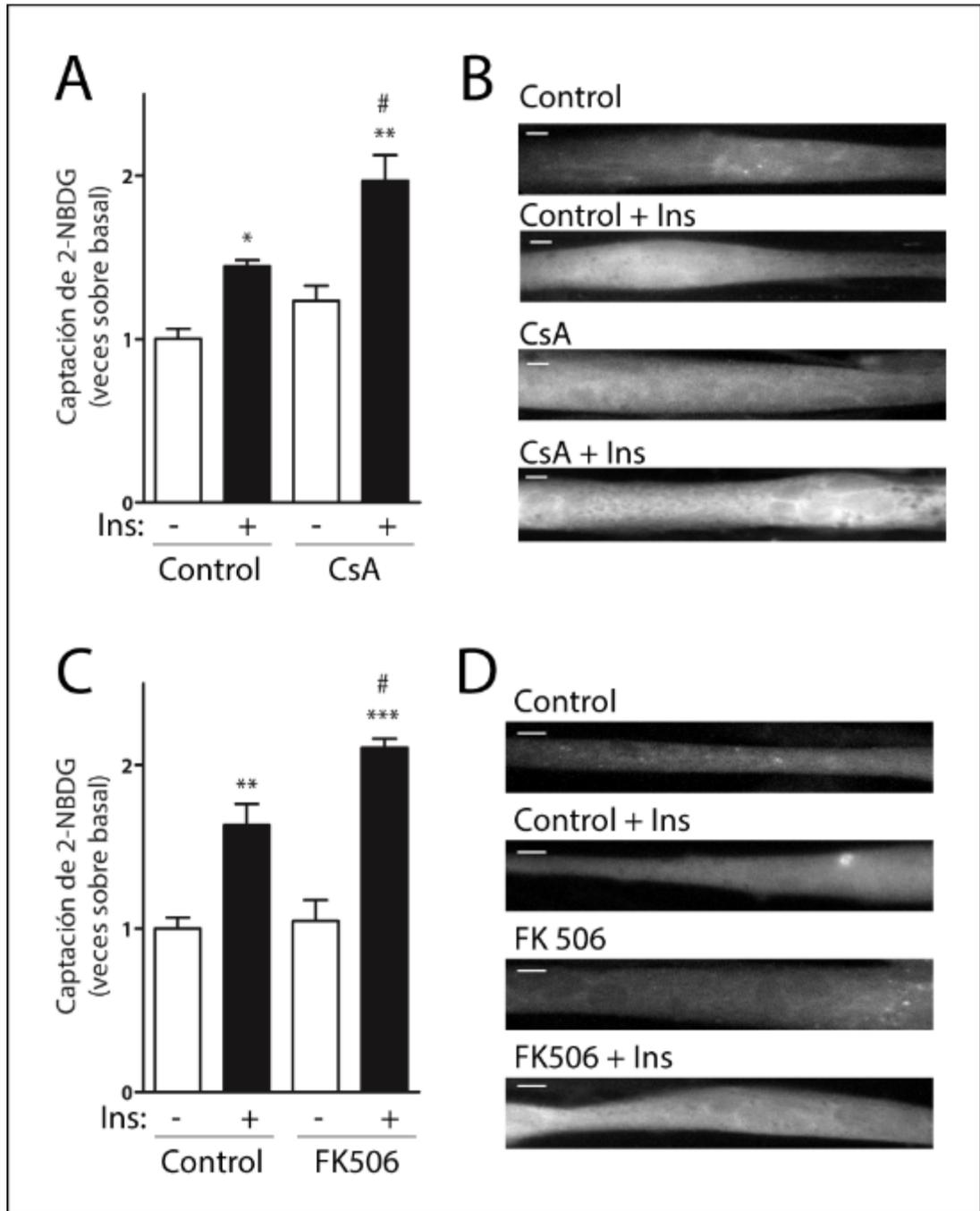


**Figura 33: Niveles proteicos de RCAN1.4 en el músculo esquelético de ratones KO para Herpud1.** Tras 12 h de ayuno, los ratones control (C57BL/6) y Herpud1 KO se inyectaron con insulina (1 U/Kg) vía intraperitoneal. Transcurridos 7.5 min, los animales fueron sacrificados y se realizó inmediatamente la extracción de los músculos sóleo y EDL. Posteriormente se realizó la extracción de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de RCAN1.4, en condiciones basales y ante el estímulo con insulina, en el músculo sóleo. Como control de carga se utilizó la tinción con azul de coomasie (CCB). (B) Cuantificación densitométrica de los niveles proteicos de RCAN1.4 (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Imagen representativa de los niveles de RCAN1.4 en el músculo EDL en ratones control y KO para Herpud1. (D) Cuantificación densitométrica de los niveles proteicos de RCAN1.4 (n = 3). \*

p < 0.05 respecto a la condición basal. ### p < 0.001 entre las condiciones estimuladas con insulina.

### **3. Examinar la participación de calcineurina en los efectos de Herpud1 en la respuesta a insulina en el músculo esquelético**

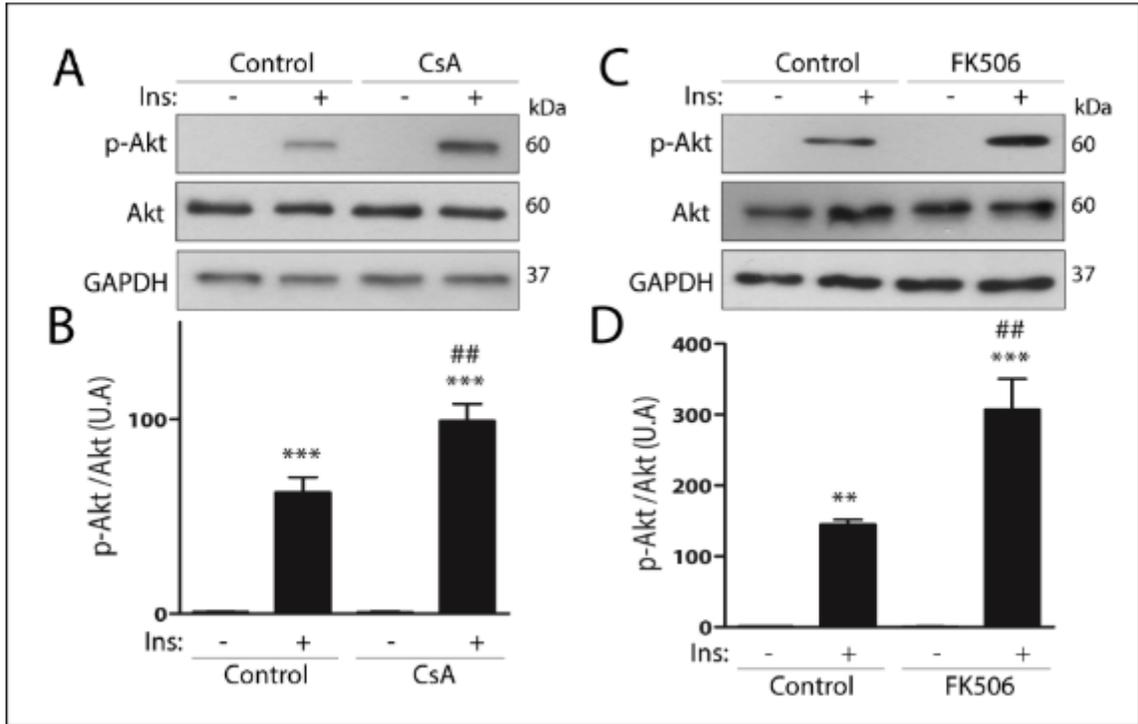
En los apartados anteriores se mostró que Herpud1 es necesaria para una adecuada respuesta a insulina en células musculares esqueléticas. Además, el silenciamiento de Herpud1 incrementó la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico dependiente de  $\text{IP}_3\text{R}$  e generó un aumento en la actividad de la serina/treonina fosfatasa calcineurina. Previamente se ha descrito que calcineurina regula el estado de fosforilación de Akt y la señalización río debajo de insulina en cardiomiocitos (**Ni y cols., 2007**), sin embargo se desconoce si este mecanismo opera en células musculares esqueléticas. Para determinar la participación de calcineurina en la respuesta a insulina en miotubos L6, se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica de calcineurina en la captación de glucosa. Tras 5 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron privados de suero por 3 h, siendo incubados durante los últimos 30 min de privación con los inhibidores de calcineurina ciclosporina A (CsA) 100 nM o tacrolimus (FK506) 5  $\mu\text{M}$ . Posteriormente las células fueron estimuladas con insulina 100 nM durante 20 min, siendo luego incubadas con el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG 300  $\mu\text{M}$  durante 10 min. Los resultados muestran que la preincubación con los inhibidores farmacológicos de calcineurina aumenta la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6 (**Figura 34**).



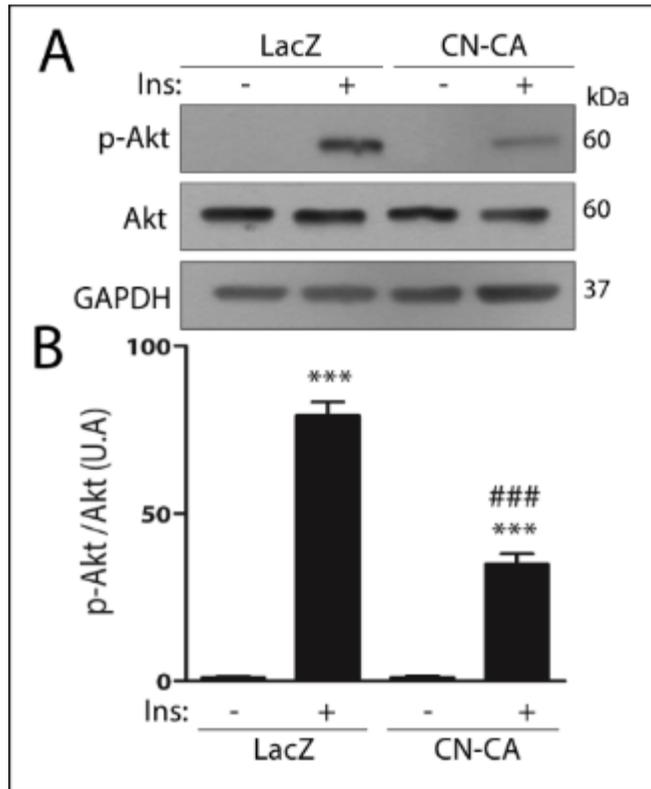
**Figura 34: Efecto de la inhibición de calcineurina en la captación de glucosa dependiente de insulina en los miotubos L6.** Las células se incubaron en medio de diferenciación durante 5 días. El día del experimento, los miotubos L6 se privaron de suero durante 3 h, siendo incubados con los inhibidores de calcineurina durante los últimos 30 min. Posteriormente, los miotubos L6 se

estimularon con insulina 100 nM durante 20 min en tampón HEPES. Transcurrido este período las células fueron incubadas exactamente 10 min con 2-NBDG 300  $\mu$ M. El transporte se detuvo agregando tampón HEPES suplementado con glucosa 20 mM frío. A continuación, las células se lavaron con el mismo tampón y se mantuvieron a 4°C hasta la obtención de las imágenes. (A) Efecto de ciclosporina A (CsA) 100 nM en la incorporación de 2-NBDG en condiciones basales y ante el estímulo con insulina (n = 3). (B) Imágenes representativas de la captación de 2-NBDG en las condiciones mencionadas (barra de escala = 10  $\mu$ m). (C) Efecto de tacrolimus (FK506) 5  $\mu$ M en la incorporación de 2-NBDG (n = 3) en condiciones basales y ante el estímulo con insulina. (D) Imágenes representativas de la incorporación de 2-NBDG en las condiciones mencionadas en el punto anterior (barra de escala = 10  $\mu$ m). Para cada condición se obtuvieron al menos 10 fotos, equivalentes a aproximadamente 50 células. Para el análisis de datos se determinó la intensidad de fluorescencia en regiones de interés (ROIs), descontando la fluorescencia de fondo, utilizando el programa ImageJ (NIH, EE. UU.). \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 respecto a la condición basal. # p < 0.05 entre las condiciones estimuladas con insulina.

Posteriormente se determinó el efecto de CsA y FK506 en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en los miotubos L6 mediante *Western blot*. Los resultados muestran que la preincubación con CsA (**Figura 35A-B**) o FK506 (**Figura 35C-D**) aumenta la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en los miotubos L6. Por otro lado, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de calcineurina (CN-CA) mediante un vector adenoviral disminuyó la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en los miotubos L6 (**Figura 36**). En su conjunto, estos resultados muestran la participación de calcineurina en la fosforilación de Akt (Ser-473) y en la captación de glucosa inducida por insulina en células musculares esqueléticas.



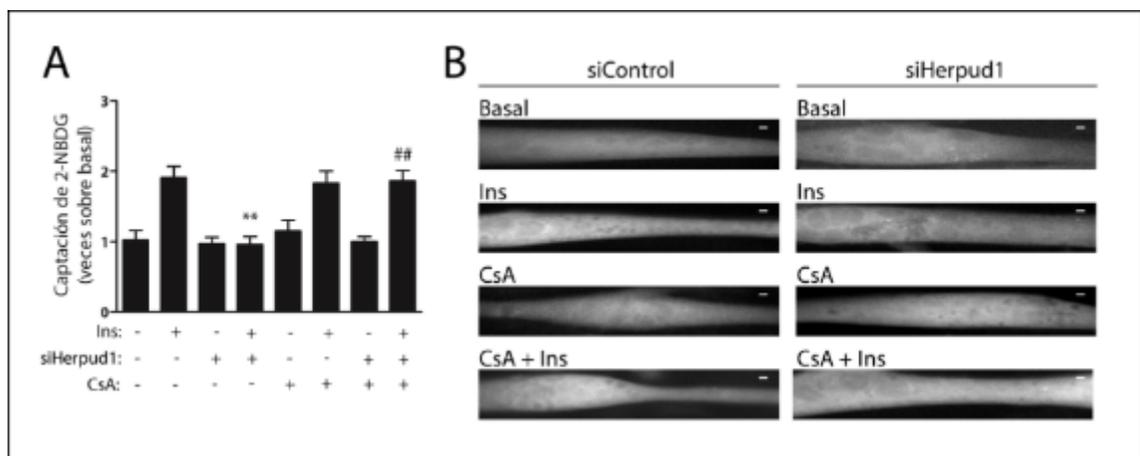
**Figura 35: Efecto de la inhibición de calcineurina en la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6.** El día del experimento, los miotubos L6 se privaron de suero durante 3 h, siendo incubados con los inhibidores de calcineurina durante los últimos 30 min de privación. Posteriormente, los miotubos se estimularon con insulina 100 nM durante 20 min. A continuación, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa del efecto de ciclosporina A (CsA) 100 nM en los niveles de fosforilación de Akt en el residuo Ser-473 (p-Akt), Akt total y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. (C) Efecto de tacrolimus (FK506) 5  $\mu$ M en los niveles de p-Akt, Akt total y GAPDH. (D) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt (n = 3). \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001 respecto a la condición basal. ## p < 0.01 entre las condiciones estimuladas con insulina.



**Figura 36: Evaluación del efecto de calcineurina constitutivamente activa (CN-CA) en la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6.** Al tercer día de diferenciación, las células se infectaron con un adenovirus control (LacZ) o con un adenovirus que expresa una forma constitutivamente activa de calcineurina (CN-CA). 48 h después, las células se privaron de suero por 3 h, siendo posteriormente estimuladas con insulina (Ins) 100 nM durante 20 min. Luego se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa del efecto de CN-CA en los niveles de fosforilación de Akt en el residuo Ser-473 (p-Akt), Akt total y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt ( $n = 3$ ). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. \*\*\*  $p < 0.001$  respecto a la condición basal. ###  $p < 0.001$  entre las condiciones estimuladas con insulina.

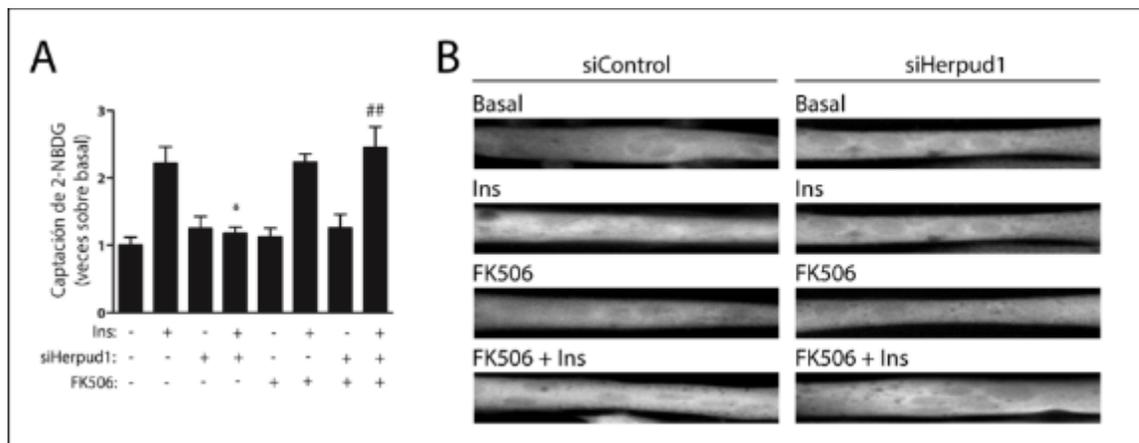
A continuación nos enfocamos en determinar la participación de calcineurina en la disminución en la respuesta a insulina observada en las células musculares *knockdown* para la proteína Herpud1. Con este objetivo se evaluó el

efecto de los inhibidores farmacológicos de calcineurina CsA y FK506 en la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6 siControl y siHerpud1. Las células fueron transfectadas con el RNA interferente pequeño el día 3 de diferenciación. 48 h luego de la transfección los miotubos L6 fueron privados de suero por 3 h, siendo incubados durante los últimos 30 min en presencia de los inhibidores de calcineurina CsA (100 nM) y FK506 (5  $\mu$ M). Posteriormente las células fueron estimuladas con insulina 100 nM durante 20 min, tras lo cual se determinó la incorporación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG. Los resultados muestran que la preincubación con CsA (**Figura 37**) o FK506 (**Figura 38**) reestablece la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6 siHerpud1.



**Figura 37: Rol de calcineurina en la disminución en la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6 siHerpud1.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1)

en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación durante 48 h. El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, siendo incubadas con ciclosporina A (CsA) 100 nM durante los últimos 30 min. Posteriormente, las células se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Tras el estímulo con insulina, las células fueron incubadas exactamente 10 min con 2-NBDG 300  $\mu$ M. El transporte se detuvo agregando tampón HEPES suplementado con glucosa 20 mM frío. A continuación, las células se lavaron con el mismo tampón y se mantuvieron a 4°C hasta la obtención de las imágenes. (A) Cuantificación del efecto de CsA en la incorporación de 2-NBDG en los miotubos L6 siControl y siHerpud1 en condiciones basales y ante el estímulo con insulina (n = 3). (B) Imagen representativa de cada una de las condiciones antes mencionadas (barra de escala = 10  $\mu$ m). Para el análisis de datos se determinó la intensidad de fluorescencia en regiones de interés (ROIs), descontando la fluorescencia de fondo, utilizando el programa ImageJ (NIH, EE. UU.). \*\* p < 0.01 entre las barras 2 y 4. ## p < 0.01 entre las barras 4 y 8.

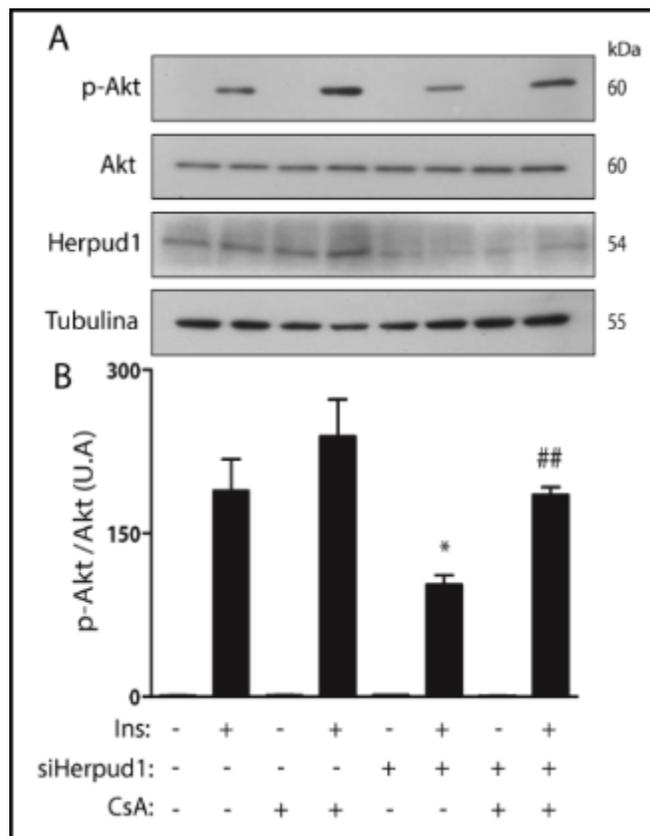


**Figura 38: Efecto de tacrolimus (FK506) en la captación de glucosa inducida por insulina en miotubos L6 control y *knockdown* para Herpud1.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos L6 fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación (48 h). El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, siendo incubadas con tacrolimus (FK506) 5  $\mu$ M durante los últimos 30 min. Posteriormente, las células se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Tras el estímulo con insulina, las células fueron incubadas exactamente 10 min con 2-NBDG 300  $\mu$ M. El transporte se detuvo agregando tampón HEPES

suplementado con glucosa 20 mM frío. A continuación, las células se lavaron con el mismo tampón y se mantuvieron a 4°C hasta la obtención de las imágenes. (A) Cuantificación del efecto de FK506 en la incorporación de 2-NBDG en los miotubos L6 siControl y siHerpud1 en condiciones basales y ante el estímulo con insulina (n = 3). (B) Imagen representativa de cada una de las condiciones *antes mencionadas* (barra de escala = 10  $\mu$ m). Para cada condición se obtuvieron al menos 10 fotos, equivalentes a aproximadamente 50 células. Para el análisis de datos se determinó la intensidad de fluorescencia en regiones de interés (ROIs), descontando la fluorescencia de fondo, utilizando el programa ImageJ (NIH, EE. UU.). \* p < 0.05 entre las barras 2 y 4. ## p < 0.01 entre las barras 4 y 8.

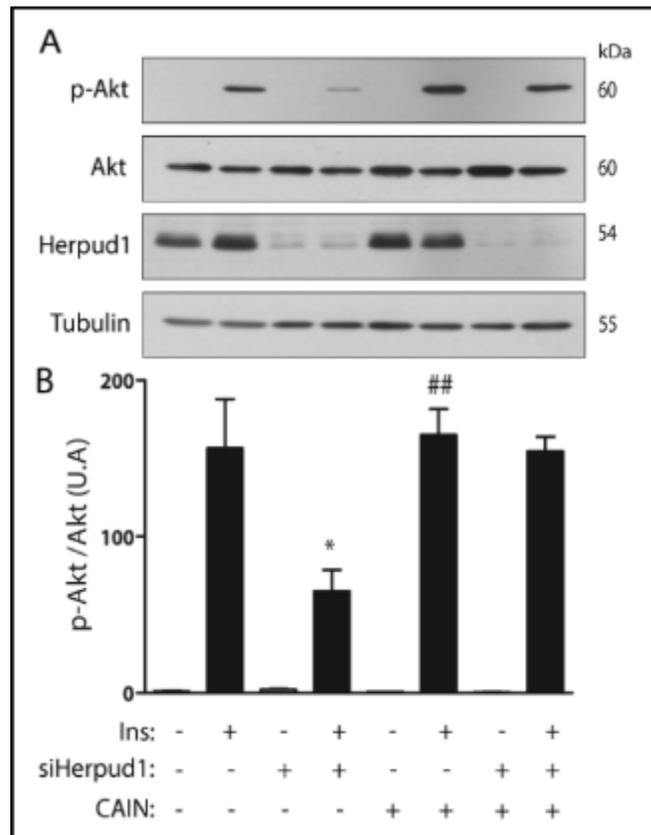
Luego se evaluó mediante *Western blot* el efecto de la inhibición de calcineurina en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en los miotubos L6 siControl y siHerpud1. Los resultados muestran un restablecimiento en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en las células L6 siHerpud1 preincubadas con CsA 100 nM durante 30 min (**Figura 39**). Para complementar estos hallazgos, se determinó el efecto de la sobreexpresión de un inhibidor endógeno de calcineurina, la proteína CAIN, en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en las células L6 siHerpud1. Los miotubos L6 fueron transfectados el día 3 de diferenciación con el siControl o el siHerpud1. Al día siguiente se agregó el vector adenoviral que expresa la proteína CAIN. Tras 48 h los miotubos fueron privados de suero (3 h) y estimulados con insulina 100 nM durante 20 min. Luego se realizó la extracción de proteínas totales para *Western blot*. Los resultados muestran que la sobreexpresión de CAIN reestablece la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en los miotubos L6 *knockdown* para Herpud1 (**Figura 40**). Estos resultados sustentan la

participación de calcineurina en las alteraciones en la respuesta a insulina observadas en los miotubos L6 en los cuales se ha silenciado a la proteína Herpud1.



**Figura 39: Efecto de la inhibición de calcineurina en la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6 siHerpud1.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Posteriormente el medio se reemplazó por medio de diferenciación (48 h). El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h, siendo incubadas con ciclosporina A (CsA) 100 nM durante los últimos 30 min, tras lo cual las células se estimularon con insulina 100 nM (Ins) durante 20 min. Posteriormente, se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos

mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de Akt (Ser-473), Akt total, Herpud1 y GAPDH. (B) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt (n = 3). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. \* p < 0.05 entre las barras 2 y 6. ## p < 0.01 entre las barras 6 y 8.



**Figura 40: Efecto de la sobreexpresión de la proteína inhibidora de calcineurina (CAIN) en la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6 siHerpud1.** Luego de 3 días en medio de diferenciación, los miotubos fueron transfectados con un siRNA de secuencia aleatoria (siControl) o un siRNA específico para Herpud1 (siHerpud1) en medio Opti-MEM por 6 h, utilizando Oligofectamina como reactivo de transfección. Al día siguiente, las células fueron transducidas con el adenovirus que codifica para la proteína inhibidora de calcineurina (CAIN) por 48 h. El día del experimento, las células se privaron de suero por 3 h y luego se estimularon con insulina (Ins) 100 nM durante 20 min. Posteriormente se realizó el extracto de proteínas totales y se determinaron los niveles proteicos mediante *Western blot*. (A) Imagen representativa de los niveles de fosforilación de Akt en el residuo Ser-473 (p-Akt), Akt total, Herpud1 y GAPDH.

(B) Cuantificación densitométrica de la relación p-Akt/Akt ( $n = 3$ ). El análisis realizado se explica en detalle en materiales y métodos. \*  $p < 0.05$  entre las barras 2 y 4. ##  $p < 0.01$  entre las barras 4 y 6.

## 7. DISCUSIÓN

Según datos de la *International Diabetes Federation* (IDF), actualmente existen 425 millones de personas con diabetes en el mundo, y las proyecciones indican que este número aumentará a 693 millones al año 2045 (“**IDF Diabetes Atlas**”, 2017). Del total de casos de esta enfermedad, alrededor de un 90% corresponde a diabetes tipo 2 (“**IDF Diabetes Atlas**”, 2017). En nuestro país la situación no es distinta, observándose un incremento sostenido en la prevalencia de diabetes durante las últimas décadas (**Sapunar, 2016**). Estos antecedentes reflejan en parte la magnitud del problema que representa la diabetes en la actualidad, dejando de manifiesto la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para prevenir o enlentecer la progresión de esta enfermedad.

La resistencia a insulina, definida como una disminución en las acciones de insulina en sus tejidos blanco, es un componente fisiopatológico temprano en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (**DeFronzo y Tripathy, 2009**). En particular, la resistencia a insulina en el músculo esquelético compromete la homeostasis energética general y se relaciona directamente con el desarrollo de diabetes tipo 2 (**DeFronzo y Tripathy, 2009**). A pesar de los avances en la comprensión de los mecanismos relacionados con el desarrollo de la resistencia a insulina, el conocimiento existente aún es incompleto y las alternativas terapéuticas para su manejo son escasas, por lo que la búsqueda de nuevos mecanismos moleculares

relacionados a la resistencia a insulina representa un área de investigación activa.

Herpud1 es una proteína localizada en la membrana del RE, con una pequeña región transmembrana y los extremos N y C terminal ubicados en el citoplasma **(Kokame y cols., 2000; Van Laar y cols., 2000)**. Herpud1 se expresa basalmente en diversos tejidos, y es rápidamente inducida en condiciones de estrés celular **(Kokame y cols., 2000; Kokame y cols., 2001; Ma y Hendershot, 2004; Van Laar y cols., 2000)**. Esta proteína forma parte de los complejos ERAD (*ER-associated protein degradation*), los cuales median la retrotranslocación de proteínas mal plegadas o no plegadas desde el lumen del RE hacia el citoplasma, para su posterior degradación vía proteosoma **(Okuda-Shimizu y Hendershot, 2007; Schulze y cols., 2005)**. Diversos trabajos describen el rol citoprotector de Herpud1 en condiciones de estrés celular, proceso que depende de la estabilización de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la mantención de la función mitocondrial **(Belal y cols., 2012; Chan y cols., 2004; Chigurupati y cols., 2009; Paredes y cols., 2016)**. Eura y cols. describieron que el ratón *knockout* general para la proteína Herpud1 es intolerante a una carga de glucosa, sin mostrar alteraciones en la secreción de insulina **(Eura y cols., 2012)**. Dado que el músculo esquelético es el principal encargado de la captación de glucosa dependiente de insulina luego de la ingesta de alimentos, proponemos que Herpud1 es necesaria para la adecuada respuesta a insulina en células musculares esqueléticas. Si bien se ha descrito la presencia de Herpud1 en el

músculo esquelético, sus funciones en este tejido se desconocen (**Kokame y cols., 2000**).

### **7.1 Consideraciones generales sobre el modelo celular**

La fisiología muscular se puede estudiar mediante diversas aproximaciones experimentales. Los modelos celulares más utilizados son el cultivo primario de células musculares y el uso de líneas celulares inmortalizadas (**Spurway y Wackerhage, 2006**). Ambos modelos requieren de la proliferación inicial de células progenitoras (mioblastos), que luego son sometidos a un proceso de diferenciación formando miotubos multinucleados.

Para evaluar las funciones de Herpud1 en el músculo esquelético se utilizó como modelo de estudio la línea celular derivada de músculo esquelético de rata L6. Esta línea celular fue generada inicialmente por Yaffe a partir de un cultivo primario de células musculares de muslo de rata mantenido en presencia del agente carcinogénico metilcolantreno durante los 2 primeros pasajes (**Yaffe, 1968**). Las células L6 proliferan como mioblastos mononucleados, pero poseen el potencial de diferenciarse a miotubos multinucleados en presencia de medio de cultivo con bajo contenido de suero (**Richler y Yaffe, 1970; Yaffe, 1968; Yaffe y Saxel, 1977**). Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada para investigar los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta a insulina en el músculo esquelético. En este sentido, se ha descrito que las vías de señalización activadas por insulina en los miotubos L6 son similares a las activadas en el

músculo esquelético *in vivo* (**Antonescu y cols., 2005; Green y cols., 2008**). Además, en este modelo insulina incrementa la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática y la captación de glucosa (**Antonescu y cols., 2005**). Del mismo modo, esta línea celular ha sido utilizada para estudiar los mecanismos de resistencia a insulina generada en modelos clásicos de lipotoxicidad inducida por palmitato y ceramidas (**Mahfouz y cols., 2014; Yuzefovych y cols., 2012**). Otras ventajas inherentes al uso de líneas celulares son la homogeneidad genética y la facilidad en la manipulación genética y farmacológica, lo cual simplifica la realización de experimentos de causa y efecto (**Spurway y Wackerhage, 2006**). Además, en el cultivo celular se evita la influencia de factores que pueden interferir con las determinaciones como la presencia de hormonas, factores de crecimiento y la inervación nerviosa presentes *in vivo*, permitiendo un mejor control de las condiciones experimentales (**Aas y cols., 2013**).

A pesar de lo anterior, existen consideraciones relacionadas al modelo *in vitro* que se deben tener en cuenta. Si nos centramos en la captación de glucosa, el incremento inducido por insulina en la incorporación de glucosa *in vivo* en experimentos de *clamp* hiperinsulinémico-euglicémico en ratas, es de aproximadamente 10 veces sobre el basal en distintos músculos (**James y cols., 1985; Rodnick y cols., 1992**). En músculos de rata aislados, el incremento en la captación de glucosa inducida por insulina es de aproximadamente 2 a 3 veces sobre el basal (**Rudich y cols., 2003**). Por otro lado, tanto en cultivo primario de

células musculares como en líneas celulares de músculo esquelético, el incremento inducido por insulina en la incorporación de glucosa es bastante menor (aproximadamente 1.5 – 2.0 veces sobre el basal) **(Aas y cols., 2013)**. Se ha propuesto que esta respuesta disminuida a insulina en células en cultivo está relacionada con cambios en la expresión de los transportadores de glucosa, en particular con una mayor expresión de GLUT1 y/o una menor expresión de GLUT4 **(Aas y cols., 2013)**. En las células musculares, la captación de glucosa en condiciones basales es mediada principalmente por el transportador de glucosa GLUT1, mientras la captación de glucosa inducida por insulina ocurre principalmente vía translocación de GLUT4 hacia la superficie celular **(Wilson y cols., 1995)**. Kraegen y cols. detectaron una relación molar GLUT1/GLUT4 que varía entre 0.1 y 0.6 en distintos músculos de rata **(Kraegen y cols., 1993)**. Por otro lado, en los miotubos L6 la relación molar GLUT1/GLUT4 es aproximadamente 1 **(Wilson y cols., 1995)**. Cabe destacar que se ha demostrado que existe una drástica disminución en la expresión de GLUT4 causada por la denervación en el músculo sóleo **(Rodnick y cols., 1992)**. Esto plantea la posibilidad de que la pérdida de la inervación nerviosa sea la causa de la disminución en la expresión de GLUT4 observada en cultivos primarios de células musculares y en las líneas celulares de músculo esquelético **(Aas y cols., 2013)**. También se ha planteado que las células musculares en cultivo no logran su diferenciación total a miotubos, lo que se relacionaría con su baja tasa metabólica y una menor expresión de GLUT4 **(Aas y cols., 2013)**. Es necesario

tener en cuenta estas consideraciones a la hora de interpretar los resultados *in vitro*.

Finalmente, podemos mencionar que, si bien los miotubos L6 son un modelo bien validado para estudiar la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas, su uso ha ido disminuyendo en los últimos años, en favor del cultivo primario de células progenitoras musculares de animales u obtenidas a partir de biopsias humanas (**Aas y cols., 2013; Perrin y cols., 2015; Perrin y cols., 2018**). Estos cultivos tienen la particularidad de mantener las características del fenotipo del sujeto dador de las células satélite. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que el fenotipo diabético se mantiene en miotubos formados a partir de células aisladas de pacientes o animales diabéticos (**Gaster y cols., 2002; Henry y cols., 1996; Aas y cols., 2013**). En la actualidad, los esfuerzos están dirigidos a conseguir modelos celulares que conserven las características estructurales y funcionales del músculo esquelético, destacando en este sentido la reciente publicación de un estudio que describe la generación de un cultivo tridimensional de células musculares a partir de células madre pluripotenciales humanas (**Maffioletti y cols., 2018**).

## **7.2 Rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas**

Inicialmente, se estandarizó la respuesta a insulina en los miotubos L6 a distintas concentraciones de esta hormona. Si bien las concentraciones

fisiológicas de insulina se encuentran en el rango picomolar, la respuesta disminuida a la hormona observada en el cultivo celular hace necesario el uso de insulina en el rango 0.1-1.0  $\mu\text{M}$  (**Aas y cols., 2013**). Los resultados mostraron que insulina 100 nM activó la cascada de señalización dependiente de insulina, además de incrementar de manera significativa la captación de glucosa respecto a la captación basal. Estos resultados coinciden con diversos trabajos publicados previamente en esta línea celular (**Del Campo y cols., 2013; Contreras-Ferrat y cols., 2014b; Osorio-Fuentealba y cols., 2013**). Para los experimentos posteriores se consideró esta concentración de insulina.

Como se ha mencionado previamente, no existen antecedentes sobre las funciones de Herpud1 en el músculo esquelético. Para determinar la presencia de la proteína en nuestro modelo de estudio, se evaluaron los niveles proteicos de Herpud1 mediante *Western blot* en condiciones basales y de estrés de RE (inducido mediante el inhibidor de la N-glicosilación tunicamicina). Los resultados mostraron la presencia de Herpud1 en condiciones basales y un aumento estadísticamente significativo en los niveles proteicos en presencia de tunicamicina por 4 h. Estos datos coinciden con reportes previos, que muestran un rápido aumento de Herpud1 en condiciones de estrés de RE (**Chan y cols., 2004; Hori y cols., 2004; Kokame y cols., 2000**). Previamente se ha descrito que el aumento rápido en los niveles de Herpud1 permite el ensamblaje de la maquinaria ERAD en condiciones de estrés agudo (**Leitman y cols., 2014**).

Para determinar el rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas se procedió a silenciar la proteína mediante un ARN interferente pequeño específico para la secuencia de la proteína (siHerpud1). Como control en estos experimentos se utilizó la transfección con un ARN interferente pequeño de secuencia aleatoria (siControl). Se privilegió una estrategia de silenciamiento transitorio de Herpud1 por sobre la generación de líneas estables para evitar artefactos relacionados con la posible participación de Herpud1 en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Los resultados mostraron que el siHerpud1 disminuyó los niveles proteicos de Herpud1 en aproximadamente un 80% en relación con el siControl. Respecto a la utilización del siRNA como estrategia de silenciamiento, no podemos descartar la presencia de efectos *off-target* relacionados al siHerpud1 (**Jackson y Linsley, 2010**). Esto se podría haber controlado mediante la realización de experimentos de reexpresión de la proteína en los miotubos L6 siHerpud1, o utilizando una estrategia de silenciamiento alternativa, como el sistema CRISP/Cas9 (**Jackson y Linsley, 2010**). De todos modos, el hecho de que la sobreexpresión de Herpud1 mediante una estrategia diferente afecte la señalización de insulina y las cinéticas de  $Ca^{2+}$  citosólico nos podría indicar, de manera indirecta, que los efectos observados al silenciar la proteína son específicos.

Dado que la expresión de los transportadores de glucosa y la respuesta a insulina cambia según el grado de diferenciación de los miotubos L6, evaluamos el efecto del *knockdown* de Herpud1 en la diferenciación celular utilizando

diferentes aproximaciones (**Mitsumoto y cols., 1991**). Dentro de los métodos utilizados para determinar la diferenciación de células musculares se encuentran la determinación de la actividad de la enzima creatina quinasa, la expresión de factores de transcripción relacionados con el proceso de diferenciación (como MYOG y MYOD), la cuantificación del área celular y el índice de fusión de los miotubos, definido como la relación entre el número de núcleos celulares ubicados en los miotubos fusionados dividido por el número de núcleos totales presentes en la imagen analizada (**Epting y cols., 2004; Tajhya y cols., 2016; Zhong y cols., 2017; Mitsumoto y cols., 1991; Wright y cols., 1989**). Los resultados no mostraron diferencias en los marcadores de diferenciación evaluados entre los miotubos siControl y siherpud1, descartando la participación de la proteína en este proceso. Tampoco se observaron diferencias en la morfología ni en la viabilidad celular.

Previamente nuestro laboratorio demostró que Herpud1 regula los niveles de autofagia en células HeLa (**Quiroga y cols., 2013**). Dado que cambios en los niveles de autofagia pueden alterar la respuesta a insulina en el músculo esquelético, se evaluaron los niveles de autofagia en los miotubos L6 siControl y siHerpud1 (**Laker y cols., 2017; Shi y cols., 2015**). Los resultados no mostraron cambios en los niveles de LC3 II ni en el flujo autofágico en los miotubos L6 *knockdown* para Herpud1. Esta diferencia respecto a lo publicado previamente se puede explicar por la posible participación de mecanismos distintos en el control de la autofagia en ambos modelos celulares. Además, el incremento

descrito en los niveles basales de autofagia en las células HeLa *knockdown* para Herpud1 es cuantitativamente pequeño, en comparación a lo observado en condiciones de privación de glucosa **(Quiroga y cols., 2013)**.

Otro de los parámetros que se evaluó fue la activación de la quinasa JNK, debido a que el silenciamiento de Herpud1 podría alterar el funcionamiento de los complejos ERAD, causando acumulación de sus sustratos en el RE y generando estrés de RE. En condiciones de estrés de RE, ocurre un aumento en la actividad de JNK, la cual fosforila a la proteína IRS1 en residuos serina, inhibiendo su activación y disminuyendo la cascada de señalización activada por insulina **(Urano y cols., 2000; Müssig y cols., 2005)**. Los resultados no mostraron diferencias en la activación de JNK. Cabe mencionar que en trabajos previos no se ha observado un incremento en marcadores de estrés de RE en células *knockdown* para Herpud1 en condiciones basales **(Quiroga y cols., 2013; Miura y cols., 2010)**. Esto posiblemente se relacione con la activación de mecanismos compensatorios para la eliminación de los sustratos ERAD, o su degradación por complejos ERAD que no requieran a Herpud1 para su funcionamiento. En este sentido, se ha descrito recientemente la existencia de una proteína con analogía estructural y funcional con Herpud1, llamada Herpud2 **(Huang y cols., 2014)**. Esta proteína mantiene cierta redundancia de funciones con Herpud1, y se diferencia de esta última en que sus niveles plasmáticos son estables, sin aumentar en condiciones de estrés celular **(Huang y cols., 2014)**.

Otro de los parámetros que quisimos evaluar inicialmente fue la activación de la quinasa AMPK, la cual induce la captación de glucosa de forma independiente a la vía de señalización de insulina (**Jensen y cols., 2014**). Ambas vías convergen en la fosforilación e inhibición de AS160 (**Treebak y cols., 2006**). No se observaron diferencias en la fosforilación de AMPK (Thr-172), la cual es necesaria para su activación (**Hawley y cols., 1996; Stein y cols., 2000**). Este resultado nos sugiere que los cambios observados en la captación de glucosa son independientes de cambios en la activación de la vía de AMPK.

Para determinar el rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en los miotubos L6, se evaluó la captación de glucosa en condiciones basales y ante el estímulo con insulina en los miotubos L6 siControl y siHerpud1. Los resultados mostraron una disminución en la incorporación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6 siHerpud1, evaluada a través de la captación de  $^3\text{H}$ -2DOG y del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG. Ambas técnicas utilizadas poseen características complementarias: la incorporación de  $^3\text{H}$ -2DOG es una técnica con mayor respaldo en la literatura, donde se determina la captación del análogo radiactivo de glucosa en toda la población de células de la placa de cultivo, lo que disminuye la variabilidad en el análisis por los criterios del observador. Sin embargo, posee desventajas como una mayor complejidad técnica, mayor costo y el riesgo que implica trabajar con radiactividad, además de no considerar diferencias en la población celular analizada, lo cual es importante al trabajar con cultivos heterogéneos, como es el caso de las células musculares, donde un

porcentaje de las células no se fusionan y permanecen en estado de mioblastos. Por otro lado, el uso de 2-NBDG como análogo fluorescente de glucosa es técnicamente más sencillo, no requiere trabajar con isótopos radiactivos y permite seleccionar la incorporación de glucosa en aquellas células efectivamente diferenciadas. Entre sus desventajas podemos mencionar que es un método menos validado en la literatura e involucra mayor variabilidad producto de la selección de las células a analizar por parte del observador. Este método ha sido previamente validado en nuestro laboratorio (**Osorio-Fuentealba y cols., 2013; Contreras-Ferrat y cols., 2014b**). Además, no observamos compartimentalización en la distribución de la sonda, y el cambio en la captación de glucosa inducido por insulina es cuantitativamente similar a lo observado con  $^3\text{H}$ -2DOG. A partir de los resultados obtenidos podemos deducir que la presencia de Herpud1 es necesaria para la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6, al menos de forma parcial. Son necesarios experimentos *in vivo* para determinar la importancia de esta diferencia en un contexto fisiológico. También sería interesante determinar en el futuro si el efecto del silenciamiento de Herpud1 en la captación de glucosa es dependiente de su acción en la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD), y si otras proteínas de la maquinaria ERAD afectan de igual forma la captación de glucosa dependiente de insulina. Hasta la fecha no se han descrito mutaciones en el gen que codifica para Herpud1 asociadas a patología ni condiciones en donde se observe una disminución de la expresión de la proteína.

En el músculo esquelético, la estimulación con insulina gatilla la incorporación de glucosa mediante el aumento en la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática, los cuales se encuentran basalmente en reservorios intracelulares (**Amira Klip y cols., 2014**). Mediante la técnica conocida como OPD, evaluamos la presencia del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana plasmática en los miotubos L6. Para este experimento se utilizaron células L6 que expresan el transportador de glucosa GLUT4 asociado a un epítotope myc en el primer loop extracelular (**Ishikura y cols., 2010**). Los resultados mostraron que el silenciamiento de Herpud1 disminuyó la presencia del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana plasmática inducida por insulina. Este hallazgo explicaría la disminución en la captación de glucosa observada en los miotubos L6 siHerpud1 estimulados con insulina.

Los experimentos de señalización celular no mostraron diferencias en la fosforilación del receptor RI en el residuo Tyr-1361 inducida por insulina, lo que sugiere que la alteración en la respuesta a insulina en las células siHerpud1 ocurre río abajo del receptor. Luego se evaluó el efecto del *knockdown* de Herpud1 en la fosforilación de la serina/treonina quinasa Akt, la cual es un mediador central en la cascada de señalización activada por insulina (**Taniguchi y cols., 2006**). Los resultados no mostraron diferencias en la fosforilación de Akt en el residuo Thr-308. Dado que esta fosforilación, mediada por PDK1, requiere de la producción de PIP<sub>3</sub> en la membrana plasmática, podemos deducir que la

vía de señalización de insulina no se ve alterada río arriba de Akt (**Alessi y cols., 1997; Gao y cols., 2011**). Por otro lado, observamos una disminución en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en los miotubos L6 siHerpud1. Esta fosforilación, dependiente de mTORC2, es independiente de PI3K, dado que existe un pool de este complejo localizado constitutivamente en la membrana plasmática (**Sarbassov y cols., 2005; Ebner y cols., 2017**). Este tipo de alteración selectiva en la fosforilación de Akt ha sido previamente descrito: En los trabajos de Gao y cols. y Brognard y cols. se ha descrito que la activación de las fosfatasas PHLPP y PHLPP2 disminuyen exclusivamente la fosforilación de Akt (Ser-473), sin afectar la fosforilación de Akt (Thr-308) (**Gao y cols., 2005; Brognard y cols., 2008**). Los resultados también mostraron una disminución en la fosforilación inhibitoria de AS160 (Thr-642) en los miotubos L6 siHerpud1 (**Miinea y cols., 2005**). Esta fosforilación, gatillada por insulina, es necesaria para la translocación de las vesículas enriquecidas en GLUT4 hacia la membrana plasmática (**Peck y cols., 2009; Seabra y Wasmeier, 2004**). Este resultado se condice con la disminución en la translocación del GLUT4 hacia la membrana plasmática en los miotubos L6 siHerpud1. También observamos una disminución en la fosforilación, dependiente de insulina, de mTOR (Ser-2448), FOXO3a (Thr-32) y S6 (Ser-235/236), lo cual apoya los resultados previamente mencionados. Las implicancias del efecto del silenciamiento de Herpud1 en la activación de estos blancos se desconoce. En este sentido, mTOR es un regulador importante de los procesos anabólicos en el músculo esquelético, mientras los factores

transcripcionales de la familia FOXO son esenciales en la expresión de genes relacionados con la degradación de proteínas en este tejido **(Yoon, 2017; Sanchez y cols., 2013)**.

Para corroborar los resultados previos, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de Herpud1 en la respuesta a insulina en los miotubos L6. Se observó que la sobreexpresión de Herpud1 incrementó la fosforilación de Akt (Ser-473) y de S6 (Ser-235/236) inducida por insulina. En concordancia a lo observado en los experimentos de silenciamiento de Herpud1, no se detectaron cambios en la fosforilación del RI (Tyr-1361) al sobreexpresar la proteína, apoyando la noción de que los cambios en la señalización de insulina dependientes de Herpud1 ocurren río abajo del RI en la transducción de señales activada por esta hormona. Si bien la captación de glucosa estimulada por insulina fue mayor en los miotubos L6 Herpud1, en relación con la misma condición en las células control (miotubos L6 pcDNA), la diferencia entre la captación de glucosa basal y la inducida por insulina no difiere entre ambas condiciones. Este resultado se puede explicar por el incremento (no significativo) en la captación de glucosa basal en los miotubos L6 Herpud1. Esta discrepancia entre lo observado en la señalización intracelular activada por insulina y la captación de glucosa se puede deber a la saturación de los mecanismos de entrada de glucosa a la célula muscular en los miotubos L6 Herpud1. Esto se podría dilucidar evaluando la incorporación de glucosa inducida por insulina en dosis menores de la hormona. A pesar de lo anterior, estos resultados sugieren que el aumento en los niveles de Herpud1 podría

incrementar la cascada de señalización activada por insulina. En modelos celulares se ha descrito el aumento en los niveles proteicos de Herpud1 en condiciones de estrés celular, como estrés de RE (**Belal y cols., 2012; Chan y cols., 2004; Chigurupati y cols., 2009; Hori y cols., 2004; Kokame y cols., 2000; Van Laar y cols., 2000**) y estrés oxidativo (**Paredes y cols., 2016**). En la mayoría de estos trabajos, Herpud1 ayuda a proteger a la célula de la muerte celular inducida por estas condiciones de estrés. Un trabajo reciente describe que 4-trifluorometil-celecoxib, un análogo del fármaco celecoxib con baja afinidad por la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), genera un aumento relativamente específico en los niveles de Herpud1 (**McLaughlin y cols., 2010**). Este análogo ha mostrado efectos beneficiosos en modelos animales de artritis y neuroinflamación, y representa una alternativa interesante para generar, mediante una herramienta farmacológica, un incremento en los niveles de Herpud1 (**Chiba y cols., 2012; Di Penta y cols., 2013**). Nos parece interesante evaluar en el futuro el efecto del incremento de Herpud1 en modelos de resistencia a insulina, como la incubación con palmitato o ceramidas en cultivo celular o la dieta alta en grasa (HFD) en animales. En su conjunto, estos resultados complementan los hallazgos realizados en los experimentos de silenciamiento de Herpud1, y apoyan la hipótesis de la participación de Herpud1 en la respuesta a insulina en los miotubos L6.

Para complementar estos hallazgos en un modelo *in vivo*, se evaluó la vía de señalización de insulina en el músculo esquelético de ratones C57BL/6 wild-type

(control) y ratones knockout generales para la proteína Herpud1. Para realizar estos experimentos, los ratones se sometieron a ayuno por 12 h y luego se inyectaron con suero salino (control) o con una solución de insulina 1 U/Kg por vía intraperitoneal. Este protocolo ha sido previamente utilizado en el estudio de la vía de señalización activada por insulina en músculos soleo y EDL de ratón **(Lee y cols., 2015)**. La concentración de insulina utilizada en este experimento se encuentra dentro del rango utilizado en estudios de tolerancia a la insulina en ratones **(McGuinness y cols., 2009)**. Se realizó la extracción de estos músculos en particular debido a la diferencia en la composición de fibras musculares que presentan: en el músculo sóleo de ratón predominan las fibras tipo 1 (oxidativas), mientras en el EDL predominan las fibras tipo 2 (glicolíticas) **(Sandona y cols., 2012; Schiaffino y Reggiani, 2011)**. Los resultados mostraron una disminución en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en el músculo sóleo en los ratones KO para Herpud1. Este resultado concuerda con los resultados obtenidos *in vitro*, y apoya la hipótesis del rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en el músculo esquelético. De modo interesante, no se observaron diferencias en la fosforilación de Akt (Ser-473) en el músculo EDL, lo que podría indicar un rol selectivo de Herpud1 en la respuesta a insulina en las fibras de metabolismo preferencialmente oxidativo. Como se discutirá más adelante, la disminución en la fosforilación de akt (Ser-473) en el músculo sóleo del ratón KO para herpud1 va acompañada de un aumento en los niveles de RCAN1.4, un indicador de la actividad de la fosfatasa calcineurina, la cual inhibe la vía de

señalización de insulina en los miotubos L6. En este punto, no podemos descartar que la ausencia de Herpud1 altere la composición de los tipos de fibras musculares en los músculos estudiados, lo que requiere comprobación a futuro. Las implicancias fisiológicas de esta diferencia se desconocen, y se requieren nuevos estudios para dilucidar este punto. Por otro lado, y en concordancia con los datos obtenidos *in vitro*, no se encontraron diferencias en la fosforilación del RI en los músculos estudiados.

En conclusión, tanto los resultados *in vitro* como *in vivo* apoyan la hipótesis del rol de Herpud1 en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas.

### **7.3 Papel de Herpud1 en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular**

Una vez definido el rol de Herpud1 en la respuesta a insulina, nos enfocamos en determinar los mecanismos moleculares a través de los cuales Herpud1 regula esta respuesta en los miotubos L6. Previamente se ha descrito que el silenciamiento de Herpud1 produce un incremento en las señales de Ca<sup>2+</sup> citosólico dependientes del IP<sub>3</sub>R en células HeLa, PC12 y cardiomiocitos de rata neonata (**Belal y cols., 2012; Paredes y cols., 2016; Torrealba y cols., 2017**). Por otro lado, se ha descrito que la sobreexpresión de Herpud1 mantiene la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular en condiciones de estrés de RE y estrés oxidativo, disminuyendo de esta forma la muerte celular (**Belal y cols., 2012; Chan y cols., 2004b; Chigurupati y cols., 2009; Paredes y cols., 2016**). La citoprotección conferida por Herpud1 estaría relacionada con el aumento en la

degradación del IP<sub>3</sub>R, lo que disminuiría la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> citosólica y mitocondrial inducida por estas condiciones de estrés (**Belal y cols., 2012; Paredes y cols., 2016; Torrealba y cols., 2017**). En este punto, consideramos la posibilidad de que las alteraciones en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular pudiesen ser las responsables de las alteraciones en la respuesta a insulina observadas en los miotubos L6 *knockdown* para Herpud1. Esto debido a que diversos antecedentes de la literatura destacan la importancia de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular para la adecuada respuesta a insulina en el músculo esquelético, cardíaco y en células hepáticas (**Del Campo y cols., 2013; Contreras-Ferrat y cols., 2010; Contreras-Ferrat y cols., 2014b; Gutiérrez y cols., 2014; Rieusset y cols., 2015; Tubbs y cols., 2014**). En cardiomiocitos de rata neonata y en miotubos L6 se ha descrito que el uso de quelantes de Ca<sup>2+</sup> citosólico inhibe la fosforilación de Akt (Ser-473), la translocación del GLUT4 hacia la superficie celular y la captación de glucosa inducidas por insulina (**Contreras-Ferrat y cols., 2010; Contreras-Ferrat y cols., 2014b**). Del mismo modo, se ha descrito que la inhibición farmacológica del IP<sub>3</sub>R mediante xestospongina B, o su silenciamiento mediante un siRNA, disminuyen la fosforilación de Akt (Ser-473) y la captación de glucosa inducidas por insulina en diversos modelos celulares (**Del Campo y cols., 2013; Contreras-Ferrat y cols., 2014b; Gutiérrez y cols., 2014**). Efectos similares en la respuesta a insulina se han observado inhibiendo, mediante herramientas farmacológicas o genéticas, al uniporter de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial (MCU), canal de ingreso de Ca<sup>2+</sup> a través de la

membrana mitocondrial interna (**Del Campo y cols., 2013; Contreras-Ferrat y cols., 2014b; Gutiérrez y cols., 2014**). Basado en estos antecedentes, nos centramos en investigar si la ausencia de Herpud1 en los miotubos L6 afecta la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y si esas alteraciones se relacionan con el fenotipo resistente a insulina. Inicialmente, se estudió la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por insulina en los miotubos L6. Los resultados no mostraron un incremento sostenido en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ni mitocondrial ante el estímulo con insulina 100 nM, concentración utilizada para estimular la captación de glucosa. Si bien se ha descrito previamente una respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica y mitocondrial inducida por esta hormona en células musculares, esta señal es cuantitativamente pequeña, lo cual dificulta su detección, más aún pensando en buscar una diferencia significativa entre la condición control y *knockdown* para Herpud1 (**Contreras-Ferrat y cols., 2014; del Campo y cols., 2013; Park y cols., 2015**). Por otro lado, Bruton y cols. demostraron que la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducida por insulina ocurre en determinadas regiones de la célula, en particular, en las cercanías de la membrana plasmática, lo cual podría explicar la falta de consistencia en los resultados obtenidos (**Bruton y cols., 1999**). Como alternativa, se planteó evaluar la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y mitocondrial inducida por histamina. Esta amina idazólica se une a receptores acoplados a proteínas Gq en la membrana plasmática, activa a fosfolipasa C e incrementa los niveles de  $\text{IP}_3$  en el citosol, lo que estimula la apertura del  $\text{IP}_3\text{R}$  y la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE (**Medina y Rivera., 2010; Gutiérrez y cols., 2014**). Utilizando la

sonda radiométrica Fura-2 AM como indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, observamos que el silenciamiento de Herpud1 incrementa la fluorescencia máxima inducida por histamina, sin observarse diferencias en los niveles de fluorescencia basal. Las sondas radiométricas se caracterizan porque existe una diferencia entre los máximos de excitación o emisión de las formas libre y unida a  $\text{Ca}^{2+}$  de la sonda, lo que hace posible su detección por separado (**Bootman y cols., 2013**). Esto permite cuantificar la relación entre la forma de la sonda unida a  $\text{Ca}^{2+}$  y la forma libre, corrigiendo de esta forma artefactos relacionados con la concentración intracelular de la sonda, la intensidad del haz de luz y el camino de paso óptico (**Barreto-Chang y Dolmetsch, 2009**). Esto permite además comparar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones basales. Los datos se expresaron como la relación entre la intensidad de fluorescencia a 340 y 403 nm ( $F_{340}/F_{403}$ ). En estos experimentos no se realizó la calibración de las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  por complicaciones técnicas. Esto hubiera permitido conocer con exactitud el rango dinámico de las sondas y obtener resultados cuantitativos de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (**Bootman y cols., 2013**). Resultados similares en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se observaron utilizando la sonda sensible a  $\text{Ca}^{2+}$  no radiométrica Fluo-4 AM en los miotubos L6 siHerpud1. Además, observamos que la sobreexpresión de Herpud1 atenúa la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica inducida por histamina, lo que concuerda con los resultados discutidos previamente.

Los resultados obtenidos coinciden con reportes previos que muestran un aumento en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico al silenciar Herpud1 en células HeLa,

cardiomiocitos de rata neonata y células PC12 (**Belal y cols., 2012; Chan y cols., 2004; Chigurupati y cols., 2009; Paredes y cols., 2016; Torrealba y cols., 2017**). Al estudiar la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial observamos una disminución en la señal inducida por histamina en los miotubos L6 siHerpud1, evaluada mediante el indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  genéticamente codificado mitoPeriCam, el cual posee una señal de destinación mitocondrial. Si bien MitoPeriCam es una sonda radiométrica, se ha descrito que el *peak* de emisión a 480-490 nm es altamente sensible a pH, por lo que sólo se consideró el *peak* de emisión a 410-440 nm para el análisis de datos (**Fonteriz y cols., 2010**). Para corroborar el resultado previo se evaluaron las cinéticas de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial utilizando la sonda fluorescente Rhod-FF AM como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta sonda se acumula preferencialmente en la mitocondria (**Fonteriz y cols., 2010; Eisner y cols., 2010**). Los resultados mostraron una disminución en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inducida por histamina en los miotubos L6 siHerpud1, concordante con lo observado con mitoPeriCam. Estos resultados difieren de lo publicado previamente, donde se ha descrito un aumento en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial asociada al *knockdown* de Herpud1 en células PC12 y HeLa (**Chigurupati y cols., 2009; Paredes y cols., 2016**). Se requieren nuevos estudios para clarificar este punto. La disociación observada entre la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y mitocondrial nos lleva a hipotetizar que Herpud1 podría tener un rol en la comunicación funcional entre el RE y la mitocondria. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial interna ocurre a través del MCU

**(Kirichok y cols., 2004)**. Este canal posee una baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que la entrada masiva de este catión a la mitocondria requiere de microdominios de alta concentración, como los que se generan en las cercanías del  $\text{IP}_3\text{R}$  **(Csordás y cols., 1999; Rizzuto y cols., 1998)**. Además, como mencionamos previamente, tanto la inhibición de  $\text{IP}_3\text{R}$  como la del MCU son suficientes para alterar la respuesta a insulina en diversos modelos celulares. Tubbs y cols. demostraron que el silenciamiento de diversas proteínas relacionadas en la interacción física entre ambos organelos disminuye la respuesta a insulina en una línea celular derivada de hígado humano **(Tubbs y cols., 2014)**. Además, nuestro grupo ha demostrado tanto en músculo cardiaco como esquelético, que la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria con diversas herramientas altera la fosforilación de Akt (Ser-473), la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática y la captación de glucosa inducidas por insulina **(Del Campo y cols., 2013; Contreras-Ferrat y cols., 2010; Contreras-Ferrat y cols., 2014b; Gutiérrez y cols., 2014)**. Esta hipótesis requiere de comprobación empírica en el futuro.

Trabajos previos describen que Herpud1 regula la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través de la regulación de la degradación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicados en la membrana del RE, especialmente el  $\text{IP}_3\text{R}$  **(Belal y cols., 2012; Paredes y cols., 2016; Torrealba y cols., 2017)**. En estos trabajos, el silenciamiento de Herpud1 genera el aumento en los niveles proteicos del  $\text{IP}_3\text{R}$ , lo cual se traduce en un aumento en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y mitocondrial

dependientes del IP<sub>3</sub>R. Para determinar si el silenciamiento de Herpud1 altera los niveles proteicos del IP<sub>3</sub>R en nuestro modelo medimos los niveles de las isoformas 1, 2 y 3 del IP<sub>3</sub>R en los miotubos L6 siControl y siHerpud1, sin encontrar diferencias entre ambas condiciones. Tampoco se encontraron diferencias entre los grupos utilizando un anticuerpo pan-IP<sub>3</sub>R. A partir de estos datos podemos deducir que el efecto de Herpud1 en las señales de Ca<sup>2+</sup> intracelulares es independiente de cambios en los niveles proteicos de IP<sub>3</sub>R, al menos en el estado estacionario. Nuevos experimentos serían necesarios para determinar específicamente diferencias en la transcripción, traducción y/o la degradación del IP<sub>3</sub>R. También cabe mencionar que se intentó evaluar los niveles proteicos del RYR1 mediante *Western blot*, pero sin obtener resultados. No se evaluaron los niveles proteicos de la Ca<sup>2+</sup>/ATPasa SERCA, por lo que no podemos descartar cambios en su expresión o en su actividad que pudieran modificar las señales de Ca<sup>2+</sup> intracelular. En este punto, hubiese sido ideal evaluar directamente el efecto de la modulación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular en la respuesta a insulina en los miotubos L6 siHerpud1, utilizando, por ejemplo, quelantes de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Sin embargo, esta ampliamente demostrado en la literatura que el Ca<sup>2+</sup> es necesario para la adecuada señalización de insulina en los miotubos L6, y que la disminución o el aumento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico impacta directamente en la respuesta a insulina (**Hutchinson y Bengtsson 2005; Mohankumar y cols., 2012; Zhou y cols., 2016; Contreras-Ferrat y cols., 2014b**).

Una vez definidas las alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los miotubos L6 siherpud1, nos enfocamos en evaluar vías de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que pudieran afectar directamente la señalización de insulina. En este punto, nos centramos en evaluar la actividad de la serina-treonina fosfatasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$  calcineurina. Está descrito que esta fosfatasa puede interactuar con Akt, disminuyendo su estado de fosforilación y afectando negativamente la captación de glucosa inducida por insulina en un cultivo primario de cardiomiocitos de rata neonata **(Ni y cols., 2007)**.

#### **7.4 Papel de Herpud1 en la regulación de la actividad de calcineurina.**

La actividad de calcineurina se evaluó mediante la determinación de la expresión proteica de la isoforma 4 de la proteína RCAN1 (RCAN1.4). La expresión de esta proteína depende directamente de la actividad de calcineurina **(Rothermel y cols., 2003)**. Los resultados mostraron que el *knockdown* de Herpud1 incrementó los niveles de RCAN1.4 en los miotubos L6, sugiriendo un incremento en la actividad de calcineurina. Además, observamos un aumento en la expresión de RCAN1.4 en el músculo sóleo del ratón KO para Herpud1, sin encontrar diferencias en el músculo EDL. Este hallazgo es consistente con el resultado diferencial observado en la fosforilación de Akt (Ser-473) en el músculo esquelético *in vivo*. Desconocemos el motivo de la diferencia en los resultados observados en el músculo sóleo en relación con el EDL. Suponemos que las diferencias en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pueden influir en la actividad de

calcineurina. En relación a este punto, se ha descrito la expresión de diferentes isoformas de la proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  calsequestrina en fibras tipo 1 y 2, lo que se relaciona con diferencias en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (**Lamboley y cols., 2013**). Estos resultados confirman el papel de Herpud1 en la actividad de calcineurina *in vitro* e *in vivo*. Lamentablemente no contamos con herramientas para detectar cambios agudos en la actividad de calcineurina. Esto nos hubiese permitido determinar directamente el efecto de la modulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la actividad de calcineurina. Los miotubos L6 son sensibles a la disminución de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, observándose muerte celular masiva a las pocas horas, mientras los cambios en la expresión de RCAN1.4 se observan a largo plazo.

### **7.5 Calcineurina regula la vía de señalización de insulina en el músculo esquelético.**

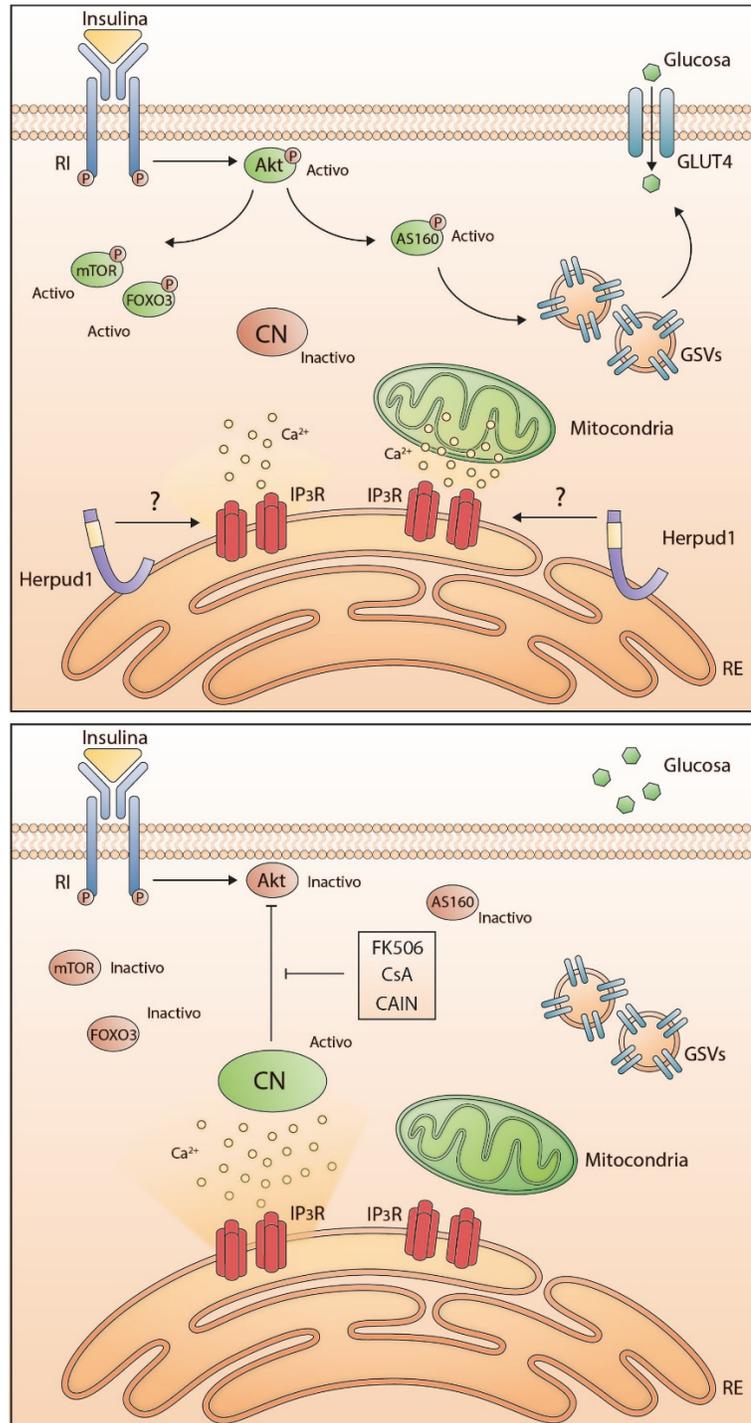
Como se mencionó previamente, calcineurina regula el estado de fosforilación de Akt y la captación de glucosa en cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas (**Ni y cols., 2007**). Sin embargo, se desconoce si este mecanismo opera en células musculares esqueléticas. Para aclarar este punto evaluamos el efecto de la modulación de calcineurina en la respuesta a insulina en los miotubos L6. Los resultados muestran que la inhibición farmacológica de calcineurina, mediante el uso de los inhibidores CsA y FK506, incrementa la captación de glucosa inducida por insulina en los miotubos L6. Esto se relaciona con un

incremento en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en presencia de estos inhibidores. De forma complementaria, observamos que la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de calcineurina disminuye fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina. La suma de estos antecedentes sugiere que calcineurina juega un rol en la respuesta a insulina en células musculares esqueléticas, aunque son necesarias nuevas investigaciones para ahondar en este tema. En este punto podemos mencionar que se ha descrito que el ratón KO músculo-específico de calcineurina está protegido de las complicaciones metabólicas y la obesidad inducidas por una dieta alta en grasa **(Pfluger y cols., 2015)**. En base a nuestros resultados y los antecedentes de la literatura proponemos que calcineurina puede representar un blanco terapéutico interesante a explorar para el manejo de la resistencia a insulina en el músculo esquelético.

#### **7.6 La inhibición de calcineurina revierte las alteraciones en la vía de señalización de insulina causadas por el silenciamiento de Herpud1.**

A continuación, nos enfocamos en establecer la participación de calcineurina en las alteraciones en la señalización de insulina observadas en las células *knockdown* para Herpud1. Con este objetivo se evaluó el efecto de la inhibición de calcineurina en la captación de glucosa en miotubos L6 siControl y siHerpud1. La preincubación por 30 min con los inhibidores CsA o FK506 evitó la disminución en la captación de glucosa inducida por insulina en las células

siHerpud1. También se observó que la preincubación con CsA evitó la disminución en la fosforilación de Akt (Ser-473) causada por el silenciamiento de Herpud1. Debido a que el restablecimiento de la señalización de insulina en las células siHerpud1 se observa a tiempos cortos de incubación con los inhibidores de calcineurina, se sugiere que el efecto observado es independiente de cambios transcripcionales causados por la inhibición de calcineurina. Para complementar los resultados obtenidos con la inhibición farmacológica de esta fosfatasa, se estudió el efecto de la sobreexpresión de un inhibidor endógeno de calcineurina (CAIN) en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina. Similar a lo observado previamente, la sobreexpresión de la proteína CAIN restableció la fosforilación de Akt (Ser-473) en los miotubos L6 siHerpud1. En su conjunto, estos resultados apoyan nuestra hipótesis sobre la participación de calcineurina en las alteraciones en la vía de señalización dependiente de insulina en células L6 *knockdown* para Herpud1. Basado en nuestros resultados, no podemos dilucidar si el efecto de calcineurina es directo sobre Akt o existe algún mediador entre ambos. Se requieren nuevos experimentos para aclarar este punto. Los hallazgos de esta tesis se resumen en el modelo presentado en la **Figura 41**.



**Figura 41: Modelo propuesto.** Panel superior: en condiciones normales, la proteína Herpud1 es necesaria para mantener la adecuada respuesta a insulina, mediante la mantención de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El mecanismo a

través del cual Herpud1 regula la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  se desconoce. En estas condiciones, la actividad de calcineurina se mantiene baja. Panel inferior: En ausencia de Herpud1, existe un desbalance en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, con una disminución en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria y un aumento en la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (dependientes del  $\text{IP}_3\text{R}$ ), generando un aumento en la actividad de la fosfatasa calcineurina, la cual disminuye la fosforilación de Akt inducida por insulina, afecta la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática y la captación de glucosa dependientes de la hormona.

## 8. CONCLUSIONES

En esta tesis se estudió el rol de la proteína Herpud1 en la respuesta a insulina a través del eje  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina-Akt en células musculares esqueléticas. La respuesta a insulina se evaluó mediante la determinación de la captación de glucosa, la presencia de GLUT4 en la superficie celular y la vía de señalización activada por esta hormona, utilizando como modelo de estudio principal la línea celular derivada de músculo esquelético de rata L6. Los niveles proteicos de herpud1 fueron modificados mediante herramientas moleculares. El silenciamiento de Herpud1 disminuyó la respuesta inducida por insulina en los miotubos L6. Además, se observó una disminución en la fosforilación de Akt (Ser-473) inducida por insulina en el músculo sóleo del ratón KO general para Herpud1. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la proteína Herpud1 es necesaria para la adecuada respuesta a insulina en nuestro modelo de estudio. Adicionalmente, observamos que la sobreexpresión de Herpud1 aumentó la activación de la cascada de señalización gatillada por insulina en los miotubos L6 y la captación de glucosa basal inducida por esta hormona. Estos resultados, además de sustentar la participación de Herpud1 en la respuesta a insulina, plantean la posibilidad de que el aumento de Herpud1, ya sea por herramientas moleculares o farmacológicas, pueda incrementar la respuesta a insulina en modelos de resistencia a insulina, obesidad o diabetes tipo 2. Estos hallazgos

representan la primera evidencia sobre las funciones de la proteína Herpud1 en el músculo esquelético.

A continuación, nos centramos en dilucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales Herpud1 podría regular la respuesta a insulina. Dado que esta proteína participa en la mantención de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la cual es necesaria para una adecuada respuesta a insulina, se estudió el papel de Herpud1 en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los miotubos L6. Los resultados mostraron un incremento en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicas dependientes de  $\text{IP}_3\text{R}$  en los miotubos L6 *knockdown* para Herpud1. Por otro lado, el silenciamiento de Herpud1 disminuyó la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria mediada por el  $\text{IP}_3\text{R}$ . A diferencia de lo observado en otros modelos celulares, no se encontraron cambios en los niveles proteicos de  $\text{IP}_3\text{R}$  en los miotubos L6 siHerpud1. Estos antecedentes sugieren que la proteína Herpud1 es necesaria para la mantención de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en células musculares esqueléticas. La determinación del mecanismo a través del cual Herpud1 regula la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular esta fuera de los objetivos de este trabajo, siendo una incógnita interesante de abordar en el futuro. Proponemos como hipótesis al respecto que Herpud1 es necesaria para la adecuada transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE hacia la mitocondria, con la consiguiente pérdida de la capacidad amortiguadora de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  de este organelo. La alteración en la comunicación RE-mitocondria ha sido relacionada previamente con alteraciones en la respuesta a insulina. Por otro lado, no podemos evaluar

directamente el papel de las alteraciones del  $\text{Ca}^{2+}$  en los miotubos L6 siHerpud1, pues este ión es necesario para la respuesta a insulina y su modulación impacta directamente sobre los efectos de esta hormona. El desbalance en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los miotubos L6 siHerpud1 fue acompañado de un aumento en la actividad de la serina-treonina fosfatasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$  calcineurina. Dado que esta fosfatasa disminuye la fosforilación de Akt en otros modelos celulares, se examinó su participación en la respuesta a insulina en los miotubos L6, observándose un incremento en la respuesta a insulina en células tratadas con inhibidores de calcineurina. Estos resultados dejan de manifiesto que calcineurina también modula la respuesta a insulina en nuestro modelo de estudio. Basado en estos resultados, nos enfocamos en determinar la participación de calcineurina en las alteraciones en la respuesta a insulina observadas en los miotubos L6 siHerpud1. Los resultados mostraron que la inhibición farmacológica y molecular de calcineurina restablece la fosforilación de Akt (Ser-473) y la captación de glucosa inducidas por insulina en los miotubos L6 *knockdown* para Herpud1. Estos resultados demuestran la participación de calcineurina en las alteraciones en la respuesta a insulina causadas por el silenciamiento de Herpud1. En base a nuestros resultados, no podemos dilucidar si el rol de calcineurina sobre la respuesta a insulina ocurren de manera directa o indirecta, lo que plantea la necesidad de realizar nuevas investigaciones al respecto.

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten comprobar la hipótesis planteada: Herpud1 es necesaria para la adecuada respuesta a insulina en células musculares esqueléticas a través de la regulación del eje  $\text{Ca}^{2+}$ -calcineurina-Akt.

Dado que este trabajo fue realizado mayoritariamente en una línea celular, cuyo comportamiento puede diferir del observado en un contexto fisiológico, proponemos evaluar a futuro el rol de Herpud1 en el músculo esquelético en un modelo *in vivo*. En este sentido, la generación del ratón KO para Herpud1 específicamente en el músculo esquelético entregaría información valiosa sobre el impacto de Herpud1 tanto en la fisiología muscular como en el metabolismo general. Finalmente, y en base a lo observado en los experimentos de sobreexpresión de Herpud1, nos parece interesante buscar en el futuro estrategias farmacológicas o moleculares que generen un incremento en los niveles de Herpud1 en el músculo esquelético, y evaluar su efecto en modelos de resistencia a insulina, obesidad y diabetes tipo 2, pensando en su posible utilidad como una herramienta terapéutica en el futuro.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Aas V, Bakke S, Feng Z, Kase E, Jensen J, Bajpeyi S, Thoresen G, Rustan A. (2013). Are cultured human myotubes far from home? ***Cell and Tissue Research***, 354 (3): 671-82.

Ainbinder A, Boncompagni S, Protasi F, Dirksen R. (2014). Role of mitofusin-2 in mitochondrial localization and calcium uptake in skeletal muscle. ***Cell Calcium***, 57 (1): 14-24.

Albers P, Pedersen A, Birk J, Kristensen D, Vind B, Baba O, Nøhr J, Højlund K, Wojtaszewski J. (2015). Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes. ***Diabetes***, Feb; 64 (2): 485-97.

Alessi D, James S, Downes C, Holmes A, Gaffney P, Reese C, Cohen P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ . ***Current Biology***, 7 (4), 261–9.

Antonescu C, Thong F, Niu W, Klip, A. (2005). To be or not to be: Regulation of the intrinsic activity of GLUT4. ***Current Medicinal Chemistry - Immunology Endocrine and Metabolic Agents***, 5, 175–187.

Barreto-Chang O, Dolmetsch R (2009). Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. ***Journal of Visualized Experiments***, 23, 3–5.

Belal C, Ameli N, El Kommos A, Bezalel S, Al'Khafaji A, Mughal M, Chan S. (2012). The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum (ER) stress protein Herp counteracts mutant  $\alpha$ -synuclein-induced ER stress via the homeostatic regulation of ER-resident calcium release channel proteins. ***Human Molecular Genetics***, 21 (5), 963–77.

Boguslavsky S, Chiu T, Foley K, Osorio-Fuentealba C, Antonescu C, Bayer K, Klip A. (2012). Myo1c binding to submembrane actin mediates insulin-induced tethering of GLUT4 vesicles. ***Molecular Biology of the Cell***, 23 (20), 4065–4078.

Bootman M, Rietdorf K, Collins T, Walker S, Sanderson M. (2013). Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent dyes and intracellular Ca<sup>2+</sup> imaging. ***Cold Spring Harbor Protocols***, Feb 1;2013 (2):83-99.

Bottinelli R, Betto R, Schiaffino S, Reggiani C. (1994). Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast

fibres of rat skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 15: 413–419, 1994.

Boucher J, Kahn C. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(1).

Boulinguez A, Staels B, Duez H, Lancel S. (2017). Mitochondria and endoplasmic reticulum: Targets for a better insulin sensitivity in skeletal muscle?. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862 (9): 901-916.

Brognaard J, Sierceki E, Gao T, Newton AC. (2007). PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Molecular Cell*, Mar 23; 25 (6):917-31.

Brunet A, Bonni A, Zigmond M, Lin M, Juo P, Hu L, Greenberg M. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, 96 (6), 857–868.

Bruton J, Katz A, Westerblad H. (1999). Insulin increases near-membrane but not global Ca<sup>2+</sup> in isolated skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America*, Mar 16; 96 (6): 3281-6.

Butler M, McKay R, Popoff I, Gaarde W, Witchell D, Murray S, Dean N, Bhanot S, Monia B. (2002). Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Diabetes*, April; 51 (4): 1028-34.

Calderhead DM, Kitagawa K, Lienhard GE, Gould GW. (1990). Translocation of the brain-type glucose transporter largely accounts for insulin stimulation of glucose transport of in BC3H-1 myocytes. *Biochemical Journal*, Aug 1; 269 (3): 597-601.

Capes E, Loaiza R, Valdivia H. (2011). Ryanodine receptors. *Skeletal Muscle*, 1 (1), 18.

Chan S, Fu W, Zhang P, Cheng A, Lee J, Kokame K, Mattson M. (2004). Herp stabilizes neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (27), 28733–28743.

Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Miyake S. (2012). A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. *Arthritis Research & Therapy*, 14 (1), 1–10.

Ching J, Rajguru P, Marupudi N, Banerjee S, and Fisher J. (2010). A role for AMPK in increased insulin action after serum starvation. ***American Journal of Physiology - Cell Physiology***, 299: C1171–C1179.

Chigurupati S, Wei Z, Belal C, Vandermeij M, Kyriazis G, Arumugam T, Chan S. (2009). The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein counteracts calcium store depletion and induction of CCAAT enhancer-binding protein homologous protein in a neurotoxin model of Parkinson disease. ***The Journal of Biological Chemistry***, 284 (27), 18323–33.

Chiu T, Patel N, Shaw A, Bamburg J, Klip A. (2010). Arp2/3- and cofilin-coordinated actin dynamics is required for insulin-mediated GLUT4 translocation to the surface of muscle cells. ***Molecular Biology of the Cell***, 21 (20).

Contreras-Ferrat A, Toro B, Bravo R, Parra V, Vásquez C, Ibarra C, Lavandero S. (2010). An inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. ***Endocrinology***, 151 (10), 4665–4677.

Contreras-Ferrat A, Lavandero S, Jaimovich E, Klip A. (2014a). Calcium signaling in insulin action on striated muscle. ***Cell Calcium***, 56 (5), 390–396.

Contreras-Ferrat A, Llanos P, Vásquez C, Espinosa A, Osorio-Fuentealba C, Arias-Calderon M, Jaimovich E. (2014b). Insulin elicits a ROS-activated and an IP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> release, which both impinge on GLUT4 translocation. ***Journal of Cell Science***, 127, 1911–23.

Csordás G, Thomas A, Hajnóczky G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. ***EMBO Journal***, 18 (1), 96–108.

DeFronzo R, Tripathy D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. ***Diabetes Care***, 32 Suppl 2: S157-63.

DeFronzo R.A, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, and Felber J.P. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. ***Diabetes***, 30, 1000–1007.

de Brito O, Scorrano L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria, ***Nature***, 456: 605-610.

del Campo A, Parra V, Vásquez-Trincado C, Gutiérrez T, Morales PE, López-Crisosto C, Bravo-Sagua R, Navarro Márquez M, Verdejo HE, Contreras-ferrat A, Troncoso R, Chiong M, Lavandero S. (2013). Mitochondrial fragmentation impairs

insulin-dependent glucose uptake by Akt activity through mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. ***American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism***, 306 (1): E1-E13 (2014).

Di Penta A, Chiba A, Alloza I, Wyssenbach A, Yamamura T, Villoslada P, Vandenbroeck K. (2013). A trifluoromethyl analogue of celecoxib exerts beneficial effects in neuroinflammation. ***PLoS ONE***, 8 (12), 1–15.

Dunn S, Burns J, Michel R. (1999). Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. ***Journal of Biological Chemistry***, 274 (31), 21908–21912.

Ebner M, Sinkovics B, Szczygielzc, Wolfschoon Ribeiro D, Yudushkin I. (2017). Localization of mTOR activity inside the cell. ***Journal of Cell Science***, 216 (2):343-353.

Eisner V, Parra V, Lavandero S, Hidalgo C, Jaimovich E. (2010). Mitochondria fine-tune the slow  $\text{Ca}^{2+}$  transients induced by electrical stimulation of skeletal myotubes. ***Cell Calcium***, 48 (6), 358–370.

Eltit J, Yang T, Li H, Molinski T, Pessah I, Allen P, Lopez J. (2010). RyR1-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  leak and  $\text{Ca}^{2+}$  entry determine resting intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in skeletal myotubes. ***Journal of Biological Chemistry***, 285 (18), 13781–13787.

Epting CL, López J, Shen X, Liu L, Bristow J, Bernstein HS. (2004). Stem cell antigen-1 is necessary for cell cycle withdrawal and myoblast differentiation in C2C12 cells. ***Journal of Cell Science***, Dec. 1; 117 (Pt. 25): 6185-95.

Eura Y, Yanamoto H, Arai Y, Okuda T, Miyata T, Kokame K. (2012). Derlin-1 deficiency is embryonic lethal, Derlin-3 deficiency appears normal, and Herp deficiency is intolerant to glucose load and ischemia in mice. ***PloS One***, 7 (3), e34298.

Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P. (2015). Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. ***Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America***, 112 (17): E2174-81.

Fonteriz R, de la Fuente S, Moreno A, Lobatón C, Montero M, Alvarez J. (2010). Monitoring mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin. ***Cell Calcium***, 48 (1), 61–69.

Fortin M, Videman T, Gibbons L.E., Battiè M.C. (2014). Paraspinal muscle morphology and composition: A 15-yr longitudinal magnetic resonance imaging study. ***Medicine and Science in Sports and Exercise***, 46, 893–901.

Frontera W, Ochala J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. ***Calcified Tissue International***, 96 (3), 183–195.

Frøsig C, Richter E. (2009). Improved insulin sensitivity after exercise: focus on insulin signaling. ***Obesity (Silver Spring)***, 17 Suppl 3, S15–S20.

Gao T, Furnari F, Newton AC. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. ***Molecular Cell***, Apr 1;18 (1):13-24.

Gao X, Lowrya PR, Zhoua X, Deprya C, Weib Z, Wongb GW, and Zhanga J. (2011). PI3K/Akt signaling requires spatial compartmentalization in plasma membrane microdomains. ***Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America***, 108 (35): 14509-14514.

Gaster M, Petersen I, Hojlund K, Poulsen P, Beck-Nielsen H. (2002). The diabetic phenotype is conserved in myotubes established from diabetic subjects: evidence for primary defects in glucose transport and glycogen synthase activity. ***Diabetes***, 51:921-927.

Gehlert S, Bloch W, Suhr F. (2015). Ca<sup>2+</sup>-dependent regulations and signaling in skeletal muscle: From electro-mechanical coupling to adaptation. ***International Journal of Molecular Sciences***, 16 (1), 1066–1095.

Gonzalez E, McGraw T. (2009). The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. ***Cell Cycle***, 8 (16), 2502–2508.

GraphPad Statistics Guide. <https://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/>

Guarnaccia S, Shaper J, Schnaar R. (1983). Tunicamycin inhibits ganglioside biosynthesis in neuronal cells. ***Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America***, 80: 1551-1555.

Gutiérrez T, Parra V, Troncoso R, Pennanen C, Contreras-Ferrat A, Vasquez-Trincado C, Lavandero S. (2014). Alteration in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. ***Cell Communication and Signaling*** 12 (1), 68.

Harmon M, Larkman P, Hardigham G, Jackson M, Skehel P. (2017). A Bi-fluorescence complementation system to detect associations between the Endoplasmic reticulum and mitochondria. ***Scientific Reports***, 7 (1): 17647.

Hawley S, Davison M, Woods A, Davies S, Beri R, Carling D, Hardie D. (1996). Characterization of the AMO-activated protein kinase kinase from rat liver and

identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMO-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, 271 (44), 27879–27887.

Henry R, Ciaraldi T, AbramsCarter L, Mudaliar S, Park K, Nikoulina S. (1996). Glycogen synthase activity is reduced in cultured skeletal muscle cells of non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects - Biochemical and molecular mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, 98:1231-1236.

Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Tamatani T, Taniguchi M, Koyama Y, Ogawa S. (2004). Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. **Genes to Cells**, 9, 457–469.

Huang C, Chu Y, Ye Y, Chen X. (2014). Role of HERP and a HERP-related protein in HRD1-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, 289, 4444–4454.

Hutchinson DS, Bengtsson T. (2005). alpha1A-adrenoceptors activate glucose uptake in L6 muscle cells through a phospholipase C-, phosphatidylinositol-3 kinase-and atypical protein kinase C-dependent pathway. **Endocrinology**, Feb;146 (2): 901-12.

IDF Diabetes Atlas. (2017). <http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>

Ishikura S, Antonescu C, Klip A. (2010). Documenting GLUT4 exocytosis and endocytosis in muscle cell monolayers. **Current Protocols in Cell Biology**, Chapter 15: Unit 15.15.

Ishikura S, Bilan P, Klip A. (2007). Rabs 8A and 14 are targets of the insulin-regulated Rab-GAP AS160 regulating GLUT4 traffic in muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 353 (4), 1074–1079.

JeBailey L, Wanono O, Niu W, Roessler J, Rudich A, Klip A. (2007). Ceramide- and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent Rac-activation and actin remodeling in muscle cells. **Diabetes**, 56 (2), 394–403.

Jackson A, Linsley P. (2010). Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2010 Jan;9 (1): 57-67.

James D, Jenkins A, Kraegen E. (1985). Heterogeneity of insulin action in individual muscles in vivo: euglycemic clamp studies in rats. **American Journal of Physiology**, May; 248 (5 Pt. 1): E567-74.

Jensen T, Angin Y, Sylow L, Richter E. (2014). Is contraction-stimulated glucose transport feedforward regulated by  $Ca^{2+}$ ? *Experimental Physiology*, 99 (12), 1562–8.

Kawaguchi T, Tamori Y, Kanda H, Yoshikawa M, Tateya S, Nishino N, Kasuga M. (2010). The t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 but not v-SNARE VAMP2 are indispensable to tether GLUT4 vesicles at the plasma membrane in adipocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391 (3), 1336–1341.

Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham D. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427 (6972), 360–4.

Klip A, Li G, Logan W. (1984). Induction of sugar uptake response to insulin by serum depletion in fusing L6 myoblasts. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 247: E291–E296.

Klip A, Volchuk A, He L, Tsakiridis T. (1996). The Glucose Transporters Of Skeletal-Muscle. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 7 (2), 229–237.

Klip A, Sun Y, Chiu T, Foley K, Antonescu C, Díaz M, Olefsky J. (2014). Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 306 (10), C879-86.

Kny M, Standera S, Hartmann-Petersen R, Kloetzel P, Seeger M. (2011). Herp regulates Hrd1-mediated ubiquitylation in a ubiquitin-like domain-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (7), 5151–5156.

Koh H, Toyoda T, Didesch M, Lee M, Sleeman M, Kulkarni R, Goodyear L. (2013). Tribbles 3 mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Nature Communications*, 4, 1871.

Kokame K, Agarwala K, Kato H, Miyata T. (2000). Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (42), 32846–53.

Kokame K, Kato H, Miyata T. (2001). Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (12), 9199–9205.

Kraegen EW, Sowden JA, Halstead MB, Clark PW, Rodnick KJ, Chisholm DJ, James DE. (1993). Glucose transporters and in vivo glucose uptake in

skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunolocalization studies of GLUT1 and GLUT4. **Biochemical Journal**, Oct 1; 295 (Pt. 1): 287-293.

Kuo I, Ehrlich B. (2015). Signaling in muscle contraction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 7(2).

Laker R, Drake J, Wilson R, Lira V, Lewellen B, Ryall K, Yan Z. (2017). Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. **Nature Communications**, 8 (1).

Lamboley CR, Murphy RM, MacKenna MJ, Lamb GD. (2013). Endogenous and maximal sarcoplasmic reticulum calcium content and calsequestrin expression in type I and type II human skeletal muscle fibers. **Journal of physiology**, 591 (23): 6053-6068.

Leal NS, Schreiner B, Pinho CM, Filadi R, Wiehager B, Karlström H, Pizzo P, Ankarcona M. (2016). Mitofusin-2 knockdown increases ER-mitochondria contact and decreases amyloid  $\beta$ -peptide production. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 20 (9): 1686-95.

Lee C, Dagnino-Acosta A, Yarotsky V, Hanna A, Lyfenko A, Knoblauch M, Hamilton S. (2015).  $Ca^{2+}$  permeation and/or binding to CaV1.1 fine-tunes skeletal muscle  $Ca^{2+}$  signaling to sustain muscle function. **Skeletal Muscle**, 5 (1), 4.

Leitman J, Shenkman M, Gofman Y, Shtern N, Ben-Tal N, Hendershot L, Lederkremer G. (2014). Herp coordinates compartmentalization and recruitment of HRD1 and misfolded proteins for ERAD. **Molecular Biology of the Cell**, 25, 1050–60.

Li H, Rao A, Hogan P. (2011). Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. **Trends in Cell Biology**, 21 (2), 91–103.

Liang G, Li Q, Tang Y, Kokame K, Kikuchi T, Wu G, Chen X. (2008). Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. **Human Molecular Genetics**, 17 (8), 1109–19.

Lieberman M.A, Marks, A. (2008). Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach (Lippincott Williams & Wilkins).

Liu J, Farmer J, Lane W, Friedman J, Weissman I, Schreiber S, Clardy J. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. **Cell**, 66 (4), 807–15.

Liu Y, Palanivel R, Rai E, Park M, Gabor T, Scheid M, Sweeney G. (2015).

Adiponectin stimulates autophagy and reduces oxidative stress to enhance insulin sensitivity during high-fat diet feeding in Mice. **Diabetes**, 64 (1), 36–48.

Lundsgaard, E. (1939). On the mode of action of insulin. **Upsala Läkarefören Förh**, 45, 143–152.

Ma Y, Hendershot L. (2004). Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. **Journal of Biological Chemistry**, 279 (14), 13792–13799.

Magnuson B, Ekim B, Fingar, D. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. **Biochemical Journal**, 441 (1), 1–21.

Manning B, Cantley L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. **Cell**, 129 (7), 1261–1274.

Mahfouz R, Khoury R, Blachnio-Zabielska A, Turban S, Loiseau N, Lipina C, Stretton C, Bourron O, Ferré P, Fougelle F, Hundal HS, Hajduch E. (2014). Characterising the inhibitory actions of ceramide upon insulin signaling in different skeletal muscle cell models: a mechanistic insight. **PLoS One**, Jul 24 ;9 (7): e101865.

Marette A, Richardson J, Ramlal T, Balon T, Vranic M, Pessin J, Klip A. (1992). Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. **American Journal of Physiology**, Aug; 263 (2 Pt 1): C443-52.

Mårin P, Andersson B, Krotkiewski M, Björntorp P. (1994). Muscle fiber composition and capillary density in women and men with NIDDM. **Diabetes Care**, May; 17 (5): 382-6.

Marutani T, Maeda T, Tanabe C, Zou K, Araki W, Kokame K, Komano H. (2011). ER-stress-inducible Herp, facilitates the degradation of immature nicastrin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1810 (8), 790–798.

McGuinness O, Ayala J, Laughlin M, Wasserman D. (2009). NIH experiment in centralized mouse phenotyping: the Vanderbilt experience and recommendations for evaluating glucose homeostasis in the mouse. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, 297 (4), E849–E855.

McLaughlin M, Alloza I, Quoc H, Scott C, Hirabayashi Y, Vandenberg K. (2010). Inhibition of secretion of interleukin (IL)-12/IL-23 family cytokines by 4-

trifluoromethyl-celecoxib is coupled to degradation via the endoplasmic reticulum stress protein HERP. **Journal of Biological Chemistry**, 285 (10), 6960–6969.

Medina V, Rivera E. (2010). Histamine receptors and cancer pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, 161 (4), 755–767.

Miinea C, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peränen J, Lienhard, G. (2005). AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. **The Biochemical Journal**, 391 (Pt 1), 87–93.

Mikoshiya K. (2007). IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channel: From discovery to new signaling concepts. **Journal of Neurochemistry**, 102 (5), 1426–1446.

Mitsumoto Y, Burdett E, Grant A, Klip A. (1991). Differential expression of the GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during differentiation of L6 muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 175 (2), 652–659.

Miura H, Hashida K, Sudo H, Awa Y, Takarada-Iemata M, Kokame K, Hori O. (2010). Deletion of Herp facilitates degradation of cytosolic proteins. **Genes to Cells**, 15, 843–853.

Mohankumar S, Taylor C, Zahradka P. (2012). Domain-dependent modulation of insulin-induced AS160 phosphorylation and glucose uptake by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in L6 myotubes. **Cellular Signalling**, Jan; 24 (1): 302–8.

Musarò A, McCullagh K, Naya F, Olson E, Rosenthal N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. **Nature**, 400 (6744), 581–585.

Müssig K, Fiedler H, Staiger H, Weigert C, Lehmann R, Schleicher ED, Häring U. (2005). Insulin-induced stimulation of JNK and the PI 3-kinase/mTOR pathway leads to phosphorylation of serine 318 of IRS-1 in C2C12 myotubes. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 335: 819–825.

Naon D, Zaninello M, Giacomello M, Varanita T, Grespi F, Lakshminaranayan M, Serafini A, Semenzato M, Herkenne S, Hernández-Alvarez M, Zorzano A, De Stefani D, Dorn II G, Scorrano L. (2016). Critical reappraisal confirms that mitofusin-2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. **Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America**, 113 (40): 11249-11254.

Ni Y, Wang N, Cao D, Sachan N, Morris D, Gerard R, Hill J. (2007). FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. **Proceedings of the National Academy of**

**Sciences of the United States of America**, 104 (51), 20517–20522.

Okuda-Shimizu Y, Hendershot L. (2007). Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. **Molecular Cell**, 28 (4), 544–54.

Osorio-Fuentealba C, Contreras-Ferrat A, Altamirano F, Espinosa A, Li Q, Niu W, Jaimovich E. (2013). Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3K $\gamma$ -Akt-AS160 in skeletal muscle cells. **Diabetes**, 62 (5), 1519–26.

Paredes F, Parra V, Torrealba N, Navarro-marquez M, Gatica D, Bravo-sagua R, Lavandero S. (2016). HERPUD1 protects against oxidative stress-induced apoptosis through downregulation of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor. **Free Radical Biology and Medicine**, 90, 206–218.

Pearce L, Komander D, Alessi D. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 11 (1), 9–22.

Peck G, Chavez J, Roach W, Budnik B, Lane W, Karlsson H, Lienhard G. (2009). Insulin-stimulated phosphorylation of the rab GTPase-activating protein TBC1D1 regulates GLUT4 translocation. **Journal of Biological Chemistry**, 284 (44), 30016–30023.

Peter J, Barnard R, Edgerton V, Gillespie C, Stempel K. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pig and rabbit. **Biochemistry**, 11: 2627–2633.

Pflugger P, Kabra D, Aichler M, Schriever S, Pfuhlmann K, García V, Tschop M. (2015). Calcineurin Links Mitochondrial Elongation with Energy Metabolism. **Cell Metabolism**, 22 (5), 838–850.

Poloz Y, Stambolic V. (2015). Obesity and cancer, a case for insulin signaling. **Cell Death and Disease**, 6 (12), e2037.

Quiroga C, Gatica D, Paredes F, Bravo R, Troncoso R, Pedrozo Z, Rodriguez A, Toro B, Chiong M, Vicencio JM, Hetz C, Lavandero S. (2013). Herp depletion protects from protein aggregation by up-regulating of autophagy. **Biochimica Biophysica Acta**, 1833 (12), 3295–3305.

Randhawa V, Thong F, Lim D, Li D, Garg R, Rudge R, Klip A. (2004). Insulin and hypertonicity recruit GLUT4 to the plasma membrane of muscle cells by using N-ethylmaleimidesensitive factor-dependent SNARE mechanisms but different v-SNAREs: Role of TI-VAMP. **Molecular Biology of the Cell**, 15 (12), 5565–73.

Richler C, Yaffe D. (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. ***Developmental Biology***, 23 (1), 1–22.

Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, Belaidi E, Tubbs E, Chauvin M, Ovize M. (2015). Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. ***Diabetologia***, 59 (3): 614-23.

Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. ***Nature Reviews Molecular Cell Biology***, 13 (9), 566–578.

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay F, Fogarty K, Lifshitz L, Pozzan T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Responses. ***Science***, 280 (12 June), 1763–1766.

Rodnick KJ, Piper RC, Slot JW, James DE. (1992). Interaction of insulin and exercise on glucose transport in muscle. ***Diabetes Care***, Nov; 15 (11): 1679-89.

Roland J, Lapierre L, Goldenring J. (2009). Alternative splicing in class v myosins determines association with rab10. ***Journal of Biological Chemistry***, 284 (2), 1213–1223.

Rothermel B, Vega R, Williams R. (2003). The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. ***Trends in Cardiovascular Medicine***, 13 (1), 15–21.

Rudich A, Konrad D, Török D, Ben-Romano R, Huang C, Niu W, Garg R, Wijesekara N, Germinario R, Bilan P, Klip A. (2003). Indinavir uncovers different contributions of GLUT4 and GLUT1 towards glucose uptake in muscle and fat cells and tissues. ***Diabetologia***, May; 46 (5): 649-58.

Sai X, Kokame K, Shiraishi H, Kawamura Y, Miyata T, Yanagisawa K, Komano H. (2003). The ubiquitin-like domain of Herp is involved in Herp degradation, but not necessary for its enhancement of amyloid-protein generation. ***FEBS Letters***, 553, 151–156.

Sanchez AM, Candau RB, Bernardi H. (2014). FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, May; 71 (9): 1657-71.

Sandonà D, Desaphy J, Camerino G, Bianchini E, Ciciliot S, Danielli-Betto D, Schiaffino S. (2012). Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term

microgravity in the MDS mission. *PLoS ONE*, 7 (3).

Sano H, Roach W, Peck G, Fukuda M, Lienhard G. (2008). Rab10 in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *The Biochemical Journal*, 411, 89–95.

Sapunar J. (2016). Chilean epidemiology in diabetes mellitus. *Revista Médica Clínica las Condes*, 27 (2): 146-151.

Sarbassov D, Guertin D, Ali S, Sabatini D. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307 (5712), 1098–1101.

Schiaffino S, Reggiani C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews*, 91 (4), 1447–1531.

Schulze A, Standera S, Buerger E, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Seeger M. (2005). The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *Journal of Molecular Biology*, 354 (5), 1021–7.

Sebra M, Wasmeier C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Current Opinion in Cell Biology*, 16 (4), 451–457.

Sekulić A, Hudson C, Homme J, Yin P, Otterness D, Karnitz L, Abraham R. (2000). A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Research*, 60 (13), 3504–3513.

Semsarian C, Wu M, Ju Y, Marciniak T, Yeoh T, Allen D, Graham R. (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*, 400 (6744), 576–581.

Shi L, Zhang T, Zhou Y, Zeng X, Ran L, Zhang Q, Mi M. (2015). Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin sensitivity by inducing autophagy via the AMPK-PGC-1 $\alpha$ -Sirt3 signaling pathway. *Endocrine*, 50 (2), 378–389.

Song X, Ryder J, Kawano Y, Chibalin A, Krook A, Zierath J. (1999). Muscle fiber type specificity in insulin signal transduction. *American Journal of Physiology*, Dec; 277 (6 Pt 2): R1690-6.

Spurway N, Wackerhage H. (2006). Genetics and Molecular Biology of Muscle Adaptation 1st Edition (Churchill Livingstone).

Stein S, Woods A, Jones N, Davison M, Carling D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *The Biochemical Journal*, 345 Pt

3, 437–43.

Stuart C, Wen G, Gustafson W, Thompson E. (2000). Comparison of GLUT1, GLUT3, and GLUT4 mRNA and the subcellular distribution of their proteins in normal human muscle. ***Metabolism: Clinical and Experimental***, 49 (12), 1604–1609.

Stuart C, Yin D, Howell M, Dykes R, Laffan J, Ferrando A. (2006). Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. ***American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism***, 291 (5), E1067-73.

Stump C, Henriksen E, Wei Y, Sowers J. (2006). The metabolic syndrome: Role of skeletal muscle metabolism. ***Annals of medicine***, 38: 389-402.

Sun Y, Bilan P, Liu Z, Klip A. (2010). Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 107 (46), 19909–14.

Sun Y, Chiu T, Foley K, Bilan P, Klip A. (2014). Myosin Va mediates Rab8A-regulated GLUT4 vesicle exocytosis in insulin-stimulated muscle cells. ***Molecular Biology of the Cell***, 25 (7), 1159–70.

Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, Stefani D, Wieckowski M, Cavagna D., Rizzuto R. (2006). Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. ***Journal of Cell Biology***, 175 (6), 901–911.

Tajhya R, Hu X, Tanner M, Huq R, Kongchan N, Neilson J, Rodney G, Horrigan F, Timchenko L, Beeton C. (2016). Functional KCa<sub>1.1</sub> channels are crucial for regulating the proliferation, migration and differentiation of human primary skeletal myoblasts. ***Cell death and Disease***, Oct 20; 7 (10):e2426.

Talior-Volodarsky I, Randhawa V, Zaid H, Klip A. (2008). Alpha-actinin-4 is selectively required for insulin-induced GLUT4 translocation. ***Journal of Biological Chemistry***, 283 (37), 25115–25123.

Taniguchi C, Emanuelli B, Kahn C. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. ***Nature Reviews. Molecular Cell Biology***, 7 (2), 85–96.

Torrealba N, Navarro-Marquez M, Garrido V, Pedrozo Z, Romero D, Eura Y, Lavandero S. (2017). Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor degradation. ***Scientific Reports***, 7: 13402.

Trovato F, Imbesi R, Conway N, Castrogiovanni P. (2016). Morphological and

Functional Aspects of Human Skeletal Muscle. ***Journal of Functional Morphology and Kinesiology***, 1, 289-302.

Treebak J, Glund S, Deshmukh A, Klein D, Long Y, Jensen T, Wojtaszewski J. (2006). AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. ***Diabetes***, 55 (7), 2051–8.

Tubbs E, Theurey P, Vial G, Bendridi N, Bravard A, Chauvin M, Ovize M. (2014). Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Integrity Is Required for Insulin Signaling and Is Implicated in Hepatic Insulin Resistance. ***Diabetes***, 63, 3279–3294.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. ***Science***, 287: 664–666.

Vadas O, Burke J, Zhang X, Berndt A, Williams R. (2011). Structural Basis for Activation and Inhibition of Class I Phosphoinositide 3-Kinases. ***Science Signaling***, 4 (195).

Van Laar T, Schouten T, Hoogervorst E, van Eck M, van der Eb AJ, Terleth C. (2000). The novel MMS-inducible gene Mif1/KIAA0025 is a target of the unfolded protein response pathway. ***FEBS Letters***, 469 (1), 123–31.

Wilson CM, Mitsumoto Y, Maher F, Klip A. (1995). Regulation of cell surface GLUT1, GLUT3, and GLUT4 by insulin and IGF-I in L6 myotubes. ***FEBS Letters***, 368: 19–22.

Wong N, Morahan G, Stathopoulos M, Proietto J, Andrikopoulos S. (2013). A novel mechanism regulating insulin secretion involving Herpud1 in mice. ***Diabetologia***, 56 (7), 1569–76.

Wright W, Sassoon D, Lin V. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. ***Cell***, 56 (4), 607–17.

Yaffe D. (1968). Retention of differentiation potential during prolonged cultivation in myogenic cells. ***Proceedings of the National Academics of Science***, 61, 477–483.

Yaffe D, Saxel O. (1977). A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. ***Differentiation***, 7 (3), 159–66.

Yamamoto N, Ashida H. (2012). Evaluation methods for facilitative glucose transport in cells and their applications. ***Food Science and Technology***

**Research**, 18 (4), 493–503.

Yamamoto N, Ueda M, Sato T, Kawasaki K, Sawada K, Kawabata K, Ashida H. (2011). Measurement of glucose uptake in cultured cells. **Current Protocols in Pharmacology**, Chapter 12: Unit 12.14.1-22

Yan L, Liu W, Zhang H, Liu C, Shang Y, Ye Y, Li W. (2014). Ube2g2-gp78-mediated HERP polyubiquitylation is involved in ER stress recovery. **Journal of Cell Science**, 127, 1417–27.

Yip C, Ottensmeyer P. (2003). Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. **Journal of Biological Chemistry**, 278 (30), 27329–27332.

Yoon MS. (2017). mTOR as a Key Regulator in Maintaining Skeletal Muscle Mass. **Frontiers in Physiology**, Oct 17; 8: 788.

Yuzefovych L, Solodushko V, Wilson G, Rachek L. (2012). Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells. **Endocrinology**, Jan; 153 (1): 92-100.

Zhang X, Chen S, Huang K, Le W. (2013). Why should autophagic flux be assessed?. **Acta Pharmacologica Sinica**, 34: 595-599.

Zhong X, Wang Q, Li J, Zhang Y, An X, Hou J. (2017). Ten-eleven translocation-2 (Tet2) is involved in myogenic differentiation of skeletal myoblast cells in vitro. **Scientific Reports**, Mar 8; 7: 43539.

Zhou Q, Yang X, Xiong M, Xu X, Zhen L, Chen W, Wang Y, Shen J, Zhao P, Liu QH. (2016). Chloroquine Increases Glucose Uptake via Enhancing GLUT4 Translocation and Fusion with the Plasma Membrane in L6 Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 38 (5): 2030-40.

Zurlo F, Larson K, Bogardus C, and Ravussin E. (1990). Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. **Journal of Clinical Investigation**, 86, 1423–1427.