

UCH-FC
DOC-BMCN
0837
C. 1

**CONVERSACIÓN CRUZADA ENTRE
RECEPTORES PURINÉRGICOS Y RECEPTOR
DE INSULINA EN CÉLULAS MUSCULARES
ESQUELÉTICAS**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**



**Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular,
Celular y Neurociencias**

Facultad De Ciencias

Por

César Alberto Osorio Fuentealba

Noviembre, 2012

Director de Tesis Dr. Enrique Jaimovich Pérez

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

CÉSAR A. OSORIO FUENTEALBA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 09 de Octubre de 2012

Director de Tesis
Dr. Enrique Jaimovich Pérez

.....


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Cecilia Vergara Montecinos

.....
C. Vergara

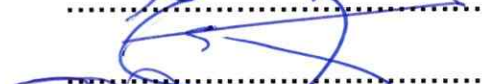
Dra. Cecilia Hidalgo Tapia

.....
C. Hidalgo

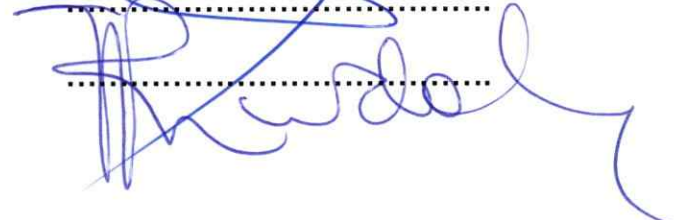
Dra. Ana Preller Simmons

.....
A. Preller

Dr. Sergio Lavandero González

.....


Dr. Juan P. Huidobro-Toro

.....




*Dedicada a con todo mi amor a
Carol, Francisco, María Elena,
Amanda y Gabriel*

AGRADECIMIENTOS

1. Agradezco a toda mi familia, en especial a mi esposa Carol por su incansable apoyo y paciencia en todos los años que hemos compartido, pero especialmente en estos últimos 4 años, a mis amados hijos por sus reconfortantes abrazos, la ternura de sus miradas y la alegría con que condimentan diariamente mi vida.

2. Al profesor Enrique Jaimovich por su incondicional apoyo, por sus sabios consejos en los momentos difíciles, por darme la libertad de tomar mis propias decisiones y brindarme un espacio para desarrollarme como científico.

3. A la profesora Amira Klip por su amistad, generosa ayuda e interés mostrado en nuestro trabajo.

4. A todo el Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo, por hacer del trabajo siempre una experiencia enriquecedora, motivante y llena de divertidas anécdotas.

5. Al Doctor Ariel Contreras por su generosidad y ayuda constante que ha permitido perfeccionar este trabajo de Tesis.

6. A las Doctoras Alejandra Espinosa, Paola Llanos, Mariana Casas y Sonja Buvinic, por su amistad y cariño.

7. A Francisco Altamirano y Carlos Wilson por su amistad y buena disposición cuando requerí de su ayuda.

8. A todo el Laboratorio de la Dra. Cecilia Hidalgo, por su amistad y energía positiva.

9. A mis compañeros de trabajo por hacer más grata una labor que a veces se torna agotadora.

A todos aquellos que me han acompañado de una u otra forma a lo largo de esta entretenida aventura que es hacer Ciencia.

Agradecer al creador y a la vida que me ha dado la oportunidad de cumplir una de las metas más anheladas en mi desarrollo profesional,

Esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Fisiología Celular del Músculo del Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y contó con el financiamiento de los siguientes proyectos:

Proyecto FONDAP 15010006 (a E.J.)

Proyecto FONDECYT 1110467 (a EJ)

Beca Doctorado Nacional Conicyt 2008 a 2012 (a CO)

Beca Apoyo Tesis AT-24100067 2011-2012 (a CO)

Beca Mecesup UCH0713 (a CO)

Esta tesis dio origen a las siguientes actividades y material de difusión:

Publicaciones:

Osorio-Fuentealba C., Contreras-Ferrat AE., Altamirano F., Espinosa E., Li Q., Niu W., Lavandero S., Klip A., Jaimovich E. (2012) Electrical Stimuli Release ATP to Increase GLUT4 Translocation and Glucose Uptake via PI3Ky-Akt-AS160 in Skeletal Muscle Cells, Diabetes, en prensa.

Boguslavsky S., Chiu T., Foley KP., **Osorio-Fuentealba C.**, Antonescu CN., Bayer KU., Bilan PJ. and Klip A. (2012) Myo1c binding to sub-membrane actin mediates insulin-induced tethering of GLUT4 vesicles, Mol Biol Cell. 23 (20): 4065-78.

Presentaciones a congresos internacionales:

César Osorio-Fuentealba, Ariel Contreras-Ferrat, Amira Klip and Enrique Jaimovich "Electrical stimuli release ATP to increase glucose uptake and GLUT4 translocation vía PI3Ky-Akt-AS160 in skeletal muscle cells" International Postgraduate Workshop 2012 (IPW 2012), Santiago, Chile.

César Osorio-Fuentealba, Ariel Contreras-Ferrat, Amira Klip and Enrique Jaimovich "Novel mechanisms to ATP-dependent glucose uptake in skeletal muscle cells" Experimental Biology 2012, APS 2012, Annual Meeting, San Diego CA., USA.

Paola Llanos, Ariel Contreras-Ferrat, **César Osorio-Fuentealba**, Alejandra Espinosa, Cecilia Hidalgo and Enrique Jaimovich. "Glucose uptake and insulin resistance in Skeletal Muscle is determined by cell Cholesterol levels" Experimental Biology 2012, ASBMB 2012, Annual Meeting, San Diego CA., USA.

Osorio-Fuentealba C., Altamirano F., Espinosa A. and Jaimovich E. "ATP release induced by electrical stimulation increases glucose uptake via Akt in skeletal muscle". Experimental Biology 2011, ASBMB 2011, Annual Meeting. Washington DC., USA.

Osorio-Fuentealba C., Espinosa A. and Jaimovich E. "ATP released by electrical stimulation improve PKB activation induced by insulin". 2009, *LII* Reunión Anual, Sociedad de Biología de Chile, II Congreso Iberoamericano de Ciencias Fisiológicas, XXIII Congreso Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, XXIV Reunión Anual, Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, 16TH Symposium on Ca²⁺- binding proteins and Ca²⁺ function in health and disease. Pucón-Chile.

Espinosa A., **Osorio-Fuentealba C.** and Jaimovich E. "Hydrogen peroxide and calcium effect in glucose uptake induced by insulin in skeletal muscle cells". 2009, *LII* Reunión Anual, Sociedad de Biología de Chile, II Congreso Iberoamericano de Ciencias Fisiológicas, XXIII Congreso Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, XXIV Reunión Anual, Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, 16TH Symposium on Ca²⁺-binding proteins and Ca²⁺ function in health and disease. Pucón-Chile.

Presentaciones a congresos nacionales:

Llanos P., Contreras-Ferrat AE., **Osorio-Fuentealba C.**, Espinosa E., Hidalgo C. and Jaimovich E. "Cholesterol involvement in Skeletal Muscle glucose transport" 2011, Reunión anual de Biología Celular de Chile, Puerto Varas-Chile.

Osorio-Fuentealba C., Contreras-Ferrat AE., Altamirano F., Espinosa A. and Jaimovich E "Novel mechanisms to ATP dependent glucose uptake in Skeletal Muscle Cells." 2011, XXV Reunión anual de Biología Celular de Chile, Puerto Varas-Chile.

Osorio-Fuentealba C., Espinosa A. and Jaimovich E. "ATP released by electrical stimulation induces glucose uptake in skeletal muscle". 2010, XXIV Reunión anual de Biología Celular de Chile, Pucón-Chile.

Pasantía en laboratorio internacional:

Laboratorio de la Dra. Amira Klip, Cell Biology program, Research Institute, The Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada. Enero-Marzo 2012. Beca Mecesus UCH0713 (CO), Proyecto CIHR-MT12601 (a AK).

Distinciones y Premios:

ASBMB 2011 Annual Meeting Thematic Best Poster Award, Metabolism and Disease Theme.

Graduate/Postdoctoral travel award to attend the ASBMB 2011, Annual Meeting.

Mención Honrosa comunicación en paneles de Doctorado, XXV Reunión Biología Celular de Chile 2011.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
1. ABREVIATURAS	x
2. RESUMEN	xii
3. ABSTRACT	xv
4. INTRODUCCIÓN	1
4.1 Señalización por Insulina y músculo esquelético	2
4.1.2 Vía de señalización PI3-quinasa/Akt.	6
4.2 Papel de adenosina y ATP sobre la incorporación de glucosa durante la contracción muscular.....	9
4.3 Regulación del transporte de glucosa inducido por insulina	12
4.4 Mecanismos de señalización que estimulan la incorporación de glucosa durante la contracción muscular.	16
4.5 Participación del Ca ²⁺ en la contracción muscular y como segundo mensajero.	18
4.5.1 Señales de Ca ²⁺ producidas por insulina en el músculo esquelético.	20
5. HIPÓTESIS.....	23
6. OBJETIVO GENERAL	24
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
8. MATERIALES Y MÉTODOS	26
8.1 Reactivos.....	26
8.2 Cultivo primario de músculo esquelético de rata.....	27
8.3 Cultivo de fibras musculares adultas.	28
8.4 Obtención de extractos proteícos totales.	28
8.5 Western Blot.....	29
8.6 Preparación de DNA plasmidial.....	31
8.7 Amplificación de plasmidios.	31
8.8 Purificación de DNA Plasmidial.....	31
8.9 Transfección de mioblastos.	32
8.10 Determinación de ATP por ensayo Luciferina/luciferasa	33
8.11 Detección de GLUT4myc en la superficie celular.....	33
8.12 Transducción de miotubos	34
8.13 Medición de la internalización de GLUT4myc (endocitosis)	35
8.14 Medición de la internalización y exocitosis de GLUT4myc (reexocitosis)....	36
8.15 Detección de GLUT4myc-eGFP en la superficie celular en célula única.	36

8.16 Incorporación 2-NBDG	37
8.17 Incorporación 2-deoxi- ³ H-glucosa (³ H-2DG).....	38
8.18 Expresión de resultados y análisis estadístico	38
 9. RESULTADOS	 40
9.1 Estimulación eléctrica tetánica induce la incorporación de glucosa 2-NBDG, de manera dependiente de ATP en miotubos de rata neonata.	40
9.2 Estimulación eléctrica tetánica induce liberación de ATP al medio extracelular induciendo el transporte de glucosa 2-NBDG en miotubos.	43
9.3 Efecto del ATP exógeno sobre la incorporación de glucosa ³ H-2DG en miotubos de rata.	47
9.4 El ATP exógeno promueve la translocación de los transportadores GLUT4 a la superficie celular	50
9.5 Determinación de la dinámica de transportadores GLUT4 en células L6GLUT4 <i>myc</i> estimuladas con ATP exógeno.....	54
9.6 Estimulación eléctrica tetánica induce aumento en la fosforilación de Akt... ..	57
9.7 ATP exógeno requiere la activación de la vía PI3Kγ/Akt, para la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática	61
9.8 ATP exógeno tiene un efecto sinérgico con insulina sobre transporte de glucosa en miotubos de rata	72
9.9 La señalización del ATP río abajo de Akt se dirige hacia AS160 y Rab8A.....	75
9.10 El receptor para dihidropiridinas (DHPR) juega un papel clave en el transporte de glucosa 2-NBDG, inducido por estimulación eléctrica	78
9.11 El transporte de glucosa dependiente de ATP ocurre a través de receptores purinérgicos P2Y, en miotubos	80
9.12 El transporte de glucosa requiere parcialmente de la vía de señalización de IP3 en miotubos de rata	82
9.13 El transporte de glucosa 2-NBDG dependiente de ATP exógeno es un mecanismo presente en fibras adultas.....	84
 10. DISCUSIÓN	 88
 11. CONCLUSIONES	 102
 12. REFERENCIAS	 103
 13. ANEXOS	 113

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	5
FIGURA 2.....	42
FIGURA 3.....	45
FIGURA 4.....	49
FIGURA 5.....	53
FIGURA 6.....	56
FIGURA 7.....	60
FIGURA 8.....	67
FIGURA 9.....	69
FIGURA 10.....	70
FIGURA 11.....	71
FIGURA 12.....	74
FIGURA 13.....	77
FIGURA 14.....	79
FIGURA 15.....	81
FIGURA 16.....	83
FIGURA 17.....	86
FIGURA 18.....	87
FIGURA S1.....	113
FIGURA S2.....	114
FIGURA S3.....	114

1. ABREVIATURAS

2 – NBDG: 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)-2-deoxiglucosa).
Análogo fluorescente de glucosa.
³H-2DG: 2-deoxi-³H-glucosa. Análogo radioactivo de glucosa.
Ad: adenovirus
Akt: proteína quinasa B
AMPK: proteína quinasa activada por AMP.
Ara C: Arabidósido de citosina
AS160: sustrato de Akt de 160 KDa
βark-CT: carboxilo terminal del péptido βark
BSA: albúmina de suero de bovino
BS: suero de bovino
CaMK: calcio/calmodulina kinasa
DAG: diacilglicerol
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
DMEM-F12: Dulbecco's modified Eagle medium-F12
DHPR: Receptor de dihidropiridinas
DMSO: dimetilsulfoxido
DS: desviación estándar
DTT: ditioneitol
eGFP: proteína fluorescente verde
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGTA: ácido etilenglicol-bis-(b-aminoetileter)-N,N,N,N-2 etanosulfónico
ERC: compartimento retículo endoplasmico
ERK: proteína kinasa regulada extracelularmente
FBS: suero fetal bovino
FoxO: Forkhead box protein O
GAPDH: gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
GLUT1: transportador de glucosa 1.
GLUT4: transportador de glucosa 4.
GLUT4–myc–eGFP: GLUT4–myc–asociado a la proteína fluorescente verde.
GSK-3β: glicógeno sintasa quinasa 3β
GSV: vesícula almacenadora de GLUT4
HEPES: ácido N-2 hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
IGF-1: Factor de crecimiento análogo a Insulina
IgG: inmunoglobulina G
IL-6: interleuquina 6
IP3: inositol 1,4,5- trisfosfato
IP3R: receptor de IP3
IRAP: aminopeptidasa regulada por insulina

IRR: Receptor relacionado al Receptor de Insulina
IRS: Sustrato del Receptor de Insulina
JNK: quinasa N-terminal de c-jun
KDa: kiloDalton
LB: medio Luria
Luc: luciferasa
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
MOI: multiplicidad de infección
NADPH: nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NOX: oxidasa de NADPH
P2: Receptores Purinérgicos P2
P38 MAPK: proteína quinasa de 38 Kda activada por mitógenos
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDK1: quinasa dependiente de fosfatidil-inositoles
PI3-K: fosfatidilinositol 3 quinasa
PIP₂: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP₃: fosfatidilinositol-3-4,5-bifosfato
PKB: proteína quinasa B
PKC: proteína quinasa C
PLC: fosfolipasa C
RLU: unidades relativas de luz
RNA: ácido ribonucleico
ROI: región de interés
ROS: especies reactivas del oxígeno
RS: retículo sarcoplasmático
Rya: ryanodina
RyR: receptor de ryanodina
SAPK: proteína quinasa regulada por estrés
SBF: suero bovino fetal
SDS: dodecil sulfato de sodio
SERCA: bomba de calcio del retículo sarco/endoplasmático
SH2: dominio con homología Src
siRNA: RNA interferente pequeño
SOD: enzima superóxido dismutasa
TBE: tris-borato-EDTA
TBS: tampón tris salino
TE: tris EDTA
TeTx: toxina tetánica
TfR: Receptor de Transferrina
TGN: Red de tans-Golgi
Tris: tris-(hidroximetil)-aminoetano
TSC2/mTOR: complejo tubero esclerosis 2/blanco de rapamicina de mamíferos
UA: unidades arbitrarias
VAMP2: proteína asociada a la membrana de vesículas

2. RESUMEN

El músculo esquelético es el principal tejido blanco de la insulina en el organismo. La unión de insulina a su receptor, desencadena la activación de varias vías de señalización que han sido bien caracterizadas; en cambio, las señales involucradas en la incorporación de glucosa durante la contracción muscular son menos conocidas.

La contracción muscular libera ATP al medio extracelular, señalizando de manera autocrina y paracrina, través de receptores purinérgicos. Esta tesis investigó si la liberación de ATP al medio extracelular por estimulación eléctrica aumenta la translocación de GLUT4 y la incorporación de glucosa en células musculares esqueléticas. Para ello se sometieron miotubos de rata en cultivo a estimulación eléctrica tetánica, a insulina (100 nM) o a ATP (100 μ M). La captación de un análogo fluorescente de glucosa, 2-NBDG, se midió en tiempo real y las posibles vías de señalización involucradas fueron blancos selectivos de diferentes inhibidores farmacológicos y de inhibición mediante herramientas genéticas.

La estimulación eléctrica, el ATP exógeno y la insulina aumentaron la captación de 2-NBDG en los miotubos, pero sólo la incorporación de 2-NBDG dependiente de la estimulación eléctrica y ATP se inhibió por apirasa, enzima que degrada el ATP extracelular y por suramina un antagonista de los receptores purinérgicos. La estimulación eléctrica aumentó transitoriamente el

ATP extracelular causando la fosforilación de Akt, efecto aditivo al inducido por insulina e inhibido por suramina. En miotubos que expresan GLUT4 myc -eGFP el ATP exógeno estimuló la translocación de GLUT4 a la superficie celular, efecto reducido en miotubos co-transfectados con un dominante negativo de Akt y la cadena liviana de la toxina Tetánica. Contrariamente, la co-transfección con una isoforma miristoilada de Akt aumentó fuertemente la presencia en la superficie celular de GLUT4, tanto en condiciones basales como en miotubos estimulados con ATP exógeno.

Por otra parte la expresión de β ark-CT, un péptido que interactúa con las subunidades G $\beta\gamma$ abolió parcialmente la incorporación de 2-NBDG dependiente de ATP, mientras que AS605240, inhibidor de PI3-K γ , bloqueó el aumento en la incorporación de 2-NBDG. La co-transfección con GLUT4 myc -EGFP y PI3-K γ mutante con dominio quinasa inactivo, bloqueó la exposición del epítipo *myc* en la superficie inducido por ATP exógeno, en células no permeabilizadas. Contrariamente, ATP aumentó la translocación del GLUT4 en miotubos co-transfectados con PI3-K γ WT y PI3-K γ -*myr* estos últimos mostraron un aumento basal de la exposición extracelular del epítipo *myc*.

Paralelamente en células musculares L6GLUT4 myc estimuladas con ATP exógeno, se observó un aumento en la exocitosis y una disminución de la velocidad de endocitosis de los transportadores GLUT4. El ATP exógeno activó la vía de señalización PI3-K/Akt/AS160, involucrando a la proteína Rab8A en la translocación de GLUT4 a la membrana. Podemos concluir que el ATP liberado

durante la actividad muscular es un importante mediador de la incorporación de glucosa, a través de un mecanismo que implica al eje receptor purinérgico P2Y/PI3-K γ /Akt/AS160/Rab8A.

3. ABSTRACT

Skeletal muscle is the main target of insulin in the organism. Once insulin binds to its specific receptor, several well characterized downstream signaling pathways are activated, whereas signals involved in contraction-induced glucose uptake are less known. ATP is released from skeletal muscle by contractile activity and can paracrine or autocrinely signal through purinergic receptors. The aim of this thesis was to investigate whether ATP released by electrical stimulation induces glucose uptake in myotubes. Rat myotubes in primary culture were exposed to either tetanic electric field stimulation, 100 nM insulin or 100 μ M ATP. The uptake of the fluorescent hexose 2-NBDG was assayed in real time and the signalling pathways were selectively targeted by chemical and molecular inhibition.

Electrical stimulation, exogenous ATP and insulin each increased 2-NBD-glucose (2-NBDG) uptake in skeletal myotubes, but only electrical stimulation- and ATP-dependent 2-NBDG uptake were inhibited by apyrase, an enzyme that metabolizes extracellular ATP to AMP and by suramin, a purinergic receptor blocker. Electrical stimulation transiently elevated extracellular ATP and caused Akt phosphorylation that was additive to insulin and was inhibited by suramin. In myotubes GLUT4*myc*-eGFP express exogenous ATP induced an increase in translocation of glucose transporter (GLUT4) to the cell surface, these effect was reduced by dominant negative Akt and Tetanus toxin co-

transfection. Contrary, co-transfection with a myristoylated form of Akt strongly increase cell surface GLUT4 myc -eGFP in ATP-independent fashion. Finally, the expression of β ark-ct, a G β γ subunits interacting peptide, partially abolished ATP-dependent 2-NBDG uptake, while AS605240, a new PI3-K γ inhibitor, totally blocked the intracellular fluorescence increase. In myotubes co-transfection with GLUT4- myc -eGFP and PI3-K γ kinase inactive mutant, ATP can not induce exofacial exposure of myc epitope in non-permeabilized cells. On the other hand, ATP induce a more significant increase of GLUT4 translocation in PI3-K γ WT co-transfected myotubes and PI3-K γ - myr shown a basal increase in extracellular myc exposure that was potentiated in ATP stimulated cells.

Parallel similar results were observed on the translocation of GLUT4 to the cell surface and PI3-K/Akt/AS160 activation pathways in muscle cells L6GLUT4 myc stimulated with exogenous ATP. In this model, well characterized for studying the dynamics of GLUT4 glucose transporters, we studied whether the increased exposure of the exofacial myc epitope on the cell surface is mediated only by an exocytosis mechanism, as suggested by results in myotubes, or is also involved a decreased rate of endocytosis of GLUT4 transporters. In this model there a decreased rate of endocytosis in cells stimulated with exogenous ATP. Also Rab8A protein plays an important role in the translocation of GLUT4 to the membrane, which is dependent on exogenous ATP.

We conclude that ATP is an important extracellular mediator of glucose uptake during muscle activity, through a mechanism that involves a purinergic receptor P2Y/PI3-K γ /Akt/AS160/Rab8A axis mechanism.

4. INTRODUCCIÓN

El músculo esquelético es un tejido plástico con una gran capacidad de responder y adaptarse a los cambios fisiológicos y metabólicos producidos por la actividad contráctil (Bassel-Duby y Olson, 2006), jugando un papel crítico en la homeostasis energética. Bajo condiciones postprandiales, el músculo esquelético controla el 75% de la glucosa disponible y de esta forma es un tejido clave implicado en la homeostasis de la glucosa del organismo completo. Las propiedades metabólicas del músculo son altamente maleables, adaptándose a la disponibilidad de nutrientes y cambiando la utilización de sustratos energéticos entre glucosa y ácidos grasos. Esta capacidad y flexibilidad son centrales en la regulación del balance energético del organismo. Dada la contribución del músculo al consumo calórico total (energético), alteraciones en la respuesta metabólica del músculo esquelético se han asociado con enfermedades metabólicas.

Por otra parte el ejercicio físico y la estimulación eléctrica producen numerosos cambios fenotípicos en la fibra muscular, como la expresión de genes metabólicos, involucrados en la diferenciación al tipo de fibra muscular (oxidativa o glicolítica), la biogénesis mitocondrial, la homeostasis de glucosa y la hipertrofia (Rockl y col., 2008).

La mayoría de los estudios relacionados con la plasticidad muscular se han centrado en entender las vías de señalización tempranas que se activan en

el músculo esquelético luego del ejercicio. Existen numerosos trabajos publicados que muestran los cambios de expresión génica que ocurren en células musculares frente a estímulos de ejercicio o despolarización. Sin embargo, los mecanismos moleculares que median dicha adaptación aún permanecen poco conocidos.

4.1 Señalización por Insulina y músculo esquelético.

La insulina es una molécula de 5.734 Da, constituida por dos cadenas peptídicas, alfa y beta. La cadena alfa esta compuesta de 21 aminoácidos y la cadena beta de 30 aminoácidos (White y Kahn, 1994). La principal función de esta hormona es regular los niveles de glucosa sanguínea (glicemia). En humanos los niveles normales van desde los 80 hasta los 126 mg/dl manteniéndose estables en condiciones de ayuno, mediante glucogenólisis y neoglucogénesis, procesos en los que está involucrado el tejido muscular esquelético (Saltiel y Kahn, 2001). La insulina posee también acciones anabólicas, estimula el crecimiento, la diferenciación celular y promueve la formación de depósitos de triglicéridos en tejido adiposo, hígado y músculo esquelético, estimulando lipogénesis, síntesis de glicógeno y proteínas (Saltiel y Kahn, 2001).

El músculo esquelético es uno de los principales órganos blanco para la acción de la insulina; los efectos que produce esta hormona están relacionados principalmente con síntesis de proteínas (Kimball y col., 2002) y con el transporte de glucosa (Pereira y Lancha, 2004). El estudio de las vías

intracelulares que activa la insulina en el músculo esquelético ha llevado a conocer detalles acerca de la regulación tanto en el metabolismo como en la expresión génica. A la fecha, se ha logrado establecer la relación entre la activación de diversas vías y su efecto a nivel celular. Un ejemplo, es la activación de la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K), que participa en la captación de glucosa mediante la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática (Furtado y col., 2002). Sin embargo, existen componentes moleculares que no son del todo conocidos. Los efectos intracelulares de la insulina se desencadenan por la unión de la hormona a su receptor ubicado en la membrana plasmática. El receptor de insulina (RI) pertenece a la superfamilia de receptores de transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca, que además incluyen al receptor para el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I; *Insulin-like Growth Factor tipo I*) y receptores relacionados al receptor de insulina (IRR; *Insulin-Receptor-related Receptor*) (Saltiel y Kahn, 2001). A diferencia de los otros integrantes monoméricos de esta familia, el receptor de insulina es un heterodímero de la forma $(\alpha\beta)_2$, unido por puentes disulfuro. La subunidad α , de 135 kDa, está orientada hacia el espacio extracelular siendo la encargada de sensar los niveles circulantes de insulina. En cambio la subunidad β , de 95 kDa, contiene una porción extracelular, una región de transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Yip y Ottensmeyer, 2003). La unión de insulina a su receptor induce un cambio conformacional de la proteína que permite la

transfosforilación de las subunidades β , estimulando su actividad tirosina quinasa intrínseca y produciendo finalmente la activación de su cascada de transducción de señales. El RI activado fosforila a los sustratos 1, 2, 3 y 4 del receptor de insulina (IRS-1, -2, -3 y -4), proteínas adaptadoras asociadas a la activación de dos principales vías transduccionales: la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K) clase I/proteína quinasa B (PKB, también conocida con la sigla Akt) y la cascada Ras-Raf-MEK-ERK. Ambas vías son responsables de las acciones metabólicas de insulina, regulando la expresión de genes relacionados al metabolismo, crecimiento y diferenciación celular (Gual y col., 2005; Hirsch y col., 2007). La activación de la PI3-K lleva a la generación de los segundos mensajeros fosfatidilinositol (3,4) bisfosfato (PI(3,4)P₂) y fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato (PI(3,4,5)P₃). Estos segundos mensajeros inducen la activación de Akt (White y Kahn, 1994). Akt es una proteína quinasa altamente conservada que juega un papel importante en la estimulación de la proliferación celular, la síntesis de proteínas y procesos metabólicos (Kimball y col. 2002).

Aún no está claro cómo la insulina produce una diversidad de efectos finales, a partir de la activación de una vía común como PI3-K, por lo cual debe existir un mecanismo de señalización intracelular que entrega especificidad a sus señales. Un candidato es el Ca²⁺. Un aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular [Ca²⁺]_i podría regular estas señales, dirigiéndolas hacia la producción de un efecto u otro. Recientemente se ha demostrado que la insulina también induce la generación de especies reactivas del oxígeno en adipocitos (Mahadev y col., 2004) y en cultivos de células musculares

esqueléticas (Espinosa y col., 2009).

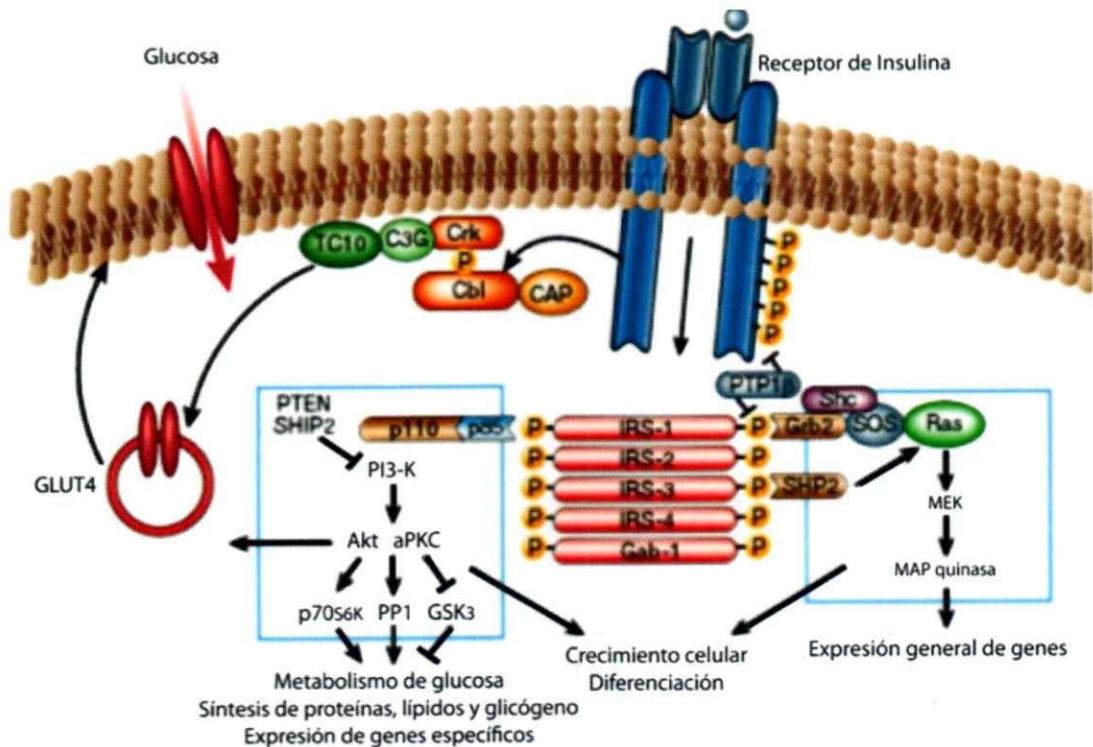


Figura 1. Transducción de señales generadas por insulina. El receptor para insulina es una proteína con actividad tirosina quinasa que sufre autofosforilación y cataliza la fosforilación de proteínas tales como miembros de la familia IRS-1. Posterior a su fosforilación estas proteínas interactúan mediante sus dominios SH₂, activando una serie de vías de señalización intracelular, incluyendo la vía de PI3K y río abajo, proteínas quinasas dependientes de PtdIns(3,4,5)P₃, Ras y la cascada de las ERK. Estas vías actúan de manera concertada para coordinar la regulación del tráfico vesicular de transportadores de glucosa a la membrana de la célula, la síntesis proteica, la activación de enzimas metabólicas, la expresión génica, lo que finalmente se traduce en la regulación del metabolismo de la glucosa, lipídico y proteico. Tomado y modificado de Saltiel y Kahn, 2001.

El transporte de glucosa se realiza a través de los transportadores de glucosa (GLUT). El músculo esquelético expresa principalmente la isoforma 4 (GLUT4), que en condiciones basales se encuentra predominantemente en el intracelular. Varios estudios en músculo esquelético de rata han demostrado que GLUT4 transloca a la membrana desde depósitos intracelulares en respuesta a insulina (Klip y col., 1990; Klip y col., 1992; Napoli y col., 1995)

como a contracción y ejercicio (Douen y col., 1990; Nedachi y col., 2008) aumentando la captación de glucosa (Pereira y Lancha, 2004). Se ha propuesto que en la célula muscular existen dos reservorios de vesículas con transportadores GLUT4, un grupo de transportadores transloca en respuesta a insulina pero no a contracción y el otro grupo responde a contracción muscular solamente. (Pereira y Lancha, 2004). Las vías de señalización intracelular que provocan la incorporación de glucosa a la célula son diferentes; la incorporación de glucosa inducida por insulina es dependiente de la activación de la vía PI3-K/Akt (Furtado y col., 2002). Ambas enzimas no se requieren para la incorporación de glucosa dependiente de la contracción muscular (Brozinick y Birnbaum, 1998).

4.1.2 Vía de señalización PI3-quinasa/Akt.

Las enzimas fosfatidil inositol-3-quinazas (PI3-K) son una familia de quinazas de lípidos que catalizan la adición de una molécula de fosfato a la posición 3 del anillo de inositol del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂), generando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) que actúan como segundos mensajeros controlando una amplia gama de vías de transducción en respuesta a estímulos extracelulares (Fruman y col., 1998; Engelman y col., 2006). La superfamilia de PI3-K está compuesta por un gran número de enzimas estructuralmente relacionadas, que difieren en el tipo de sustrato y el mecanismo de regulación, agrupándose en tres clases, I, II y III (Fruman y col., 1998; Engelman y col., 2006). Las PI3-K clase I son activadas directamente por

receptores celulares de superficie. Las PI3-K de clase I se han subdividido en las clase IA que son activadas por receptores tirosina quinasa (RTKs), receptores acoplados a proteína G (GPCRs) y oncoproteínas y las clase IB enzimas que son reguladas preferentemente por GPCRs mediante interacción con las subunidades $\beta\gamma$, sin embargo, es posible que también interactuen con subunidades α (Katso y col., 2001). La PI3-K clase I es capaz de fosforilar fosfatidilinositol (PtdIns) a fosfatidilinositol 3P (PtdIns(3)P); PtdIns(4)P a PtdIns(3,4)P₂ y PtdIns(4,5)P₂ a PtdIns(3,4,5)P₃, siendo PtdIns(4,5)P₂ el sustrato lipídico preferido *in vivo* (Foster y col., 2003), molécula que sirve como sitio de anclaje para un subgrupo de proteínas que tiene dominios con homología a pleckstrina (PH). La función de las PI3-K de clase II es menos conocida, se sabe que operan río abajo de receptores de superficie y se han asociado con clatrina, su principal función es convertir PtdIns a PtdIns(3)P y PtdIns(4)P a PtdIns(3,4)P₂ (Wymann y Marone, 2005). La PI3-K de clase III sólo es capaz de fosforilar fosfatidil inositol, dando origen a fosfatidil inositol 3 fosfato y ha sido implicada en transporte vesicular entre los compartimentos endosomales en mamíferos y levaduras (Simonsen y col., 2001; Foster y col., 2003).

La generación de PIP₂ y PIP₃ promueven el reclutamiento y activación de Akt en la membrana plasmática (Hirsch y col., 2007). Dentro de los blancos intracelulares de Akt se encuentran reguladores de la síntesis de proteínas, del metabolismo de glicógeno y del ciclo celular (Hirsch y col., 2007). Akt puede ser

activada por receptores activados por factores de crecimiento y la contracción muscular (Rommel y col., 2001; Sakamoto y col., 2002; Sakamoto y col., 2003). Esta proteína es una serina(S)/treonina(T) quinasa con tres isoformas Akt1, Akt2 y Akt3 todas ellas expresadas en músculo esquelético (Walker y col., 1998), es un componente señalizador crítico para la regulación del metabolismo celular, crecimiento y supervivencia. Akt es activada por factores de crecimiento, insulina y estrés celular siendo blanco río abajo de la señalización por PI3-K. Akt es activada en la membrana plasmática al unirse al PIP₃ a través del dominio PH, permitiendo un cambio conformacional que permite la fosforilación en T308 por la quinasa dependiente de fosfatidil-inositoles (PDK1). La completa activación de Akt se produce a través de una segunda etapa de fosforilación en la S473 del *loop* hidrofóbico, por un mecanismo poco conocido dependiente de PIP₃ (Hirsch y col., 2007). Akt es una quinasa que regula diversos procesos celulares, dentro de los que se destacan la captación de glucosa, síntesis de glicógeno, la síntesis de proteínas, a través de sus blancos río abajo AS160 (sustrato de Akt 160), GSK-3 β (glicógeno sintasa quinasa 3 β) y el factor TSC2/mTOR (*tuberous sclerosis complex/mammalian target of rapamycin*), respectivamente (Cross y col., 1995; Inoki, y col., 2002; Kramer y col., 2006). AS160 contiene un dominio con actividad GTPasa para la activación de Rabs, las cuales son proteínas G pequeñas requeridas para el tráfico de membranas (Jessen y Goodyear, 2005); se ha sugerido que AS160 podría ser el sitio de integración de la señal para insulina y contracción muscular para la

translocación de GLUT4 (Jessen y Goodyear, 2005).

4.2 Papel de adenosina y ATP sobre la incorporación de glucosa durante la contracción muscular

La energía química en forma de trifosfato de adenosina (ATP) es esencial para mantener la contracción del músculo esquelético. El consumo de ATP se incrementa en aproximadamente 100 veces desde un estado de reposo a contracciones de máxima intensidad. Esta demanda energética muscular es satisfecha generalmente sin agotar el ATP intracelular. Los principales consumidores de energía en el músculo esquelético son los procesos de recaptación de calcio por el retículo sarcoplásmico y la interacción actina-miosina (Szentesi y col., 2001).

Por otra parte, el ATP es liberado durante el ejercicio intenso y la contracción muscular (Forrester, 1972; Cunha y Sebastiao, 1993). Esta liberación ocurre tanto en la unión neuromuscular como desde fibras aisladas (Vizi y col., 2000), evidenciando que la liberación de ATP ocurre tanto desde el nervio como el músculo. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de diferentes receptores de ATP en músculo esquelético, y que la expresión de estos receptores varía durante la diferenciación de las células musculares (Ryten y col., 2002; Ryten y col., 2004), activando diversas vías de señalización implicadas en la diferenciación de células musculares, estos resultados sugieren que ATP podría ejercer una función en el músculo desde el medio extracelular, como un factor trófico autocrino y paracrino. Adicionalmente, un

conjunto de enzimas capaces de degradar el ATP extracelular se han detectado en el sarcolema y en el túbulo-T; estas enzimas serían las encargadas de terminar la señalización por ATP (Delgado y col., 1997).

Estos estudios indican que el ATP extracelular puede ser necesario para una variedad de funciones en el músculo esquelético, aunque los mecanismos y la distribución de los elementos específicos de estas vías de señalización no son bien conocidos. Datos de nuestro laboratorio han demostrado la liberación de ATP en cultivo primario de células musculares inducido por estímulo eléctrico. Se determinó una primera liberación después de la estimulación con un máximo a los 15 segundos de 25 veces respecto al basal y una segunda liberación a los 15 min que luego llega a niveles basales a los 30 min post-estimulación (Buvinic y col., 2009). Los mecanismos de liberación de ATP en músculo esquelético no han sido estudiados, sin embargo, se ha descrito que los hemicanales de panexina pueden ser activados por despolarización de membrana, estrés mecánico o calcio intracelular constituyendo una vía de salida de ATP en diversos tipos celulares (Bao y col., 2004; Shestopalov y Panchin, 2008).

En músculo esquelético se produce adenosina en respuesta a la disminución del suministro de oxígeno o aumento de la demanda de éste, tal y como ocurre durante la contracción o en condiciones de hipoxia (Derave y Hespel, 1999). Parte de la adenosina producida se acumula en el intersticio donde puede actuar de manera local uniéndose a varios tipos de receptores de adenosina en la superficie de las células adyacentes al sitio de acumulación. La

estimulación de receptores de adenosina A_1 potencia la estimulación de la captación de glucosa en respuesta a insulina en músculos oxidativos (Vergauwen y col., 1994), en músculo cardíaco y adipocitos. La remoción de adenosina con adenosina deaminasa o el bloqueo de los receptores de adenosina produce una disminución en la captación de glucosa estimulada por insulina (Han y col., 1998; Thong y col., 2007).

ATP es una molécula que también es liberada por diferentes tipos de células bajo condiciones de hipoxia/isquemia y por estímulos mecánicos o bioquímicos (Burnstock, 1997; Lazarowski y col., 2000). Es sabido que ATP actúa como una señal extracelular implicada en varios procesos regulatorios como proliferación celular, contracción muscular, diferenciación y comunicación neuronal (Burnstock, 1997). La respuesta biológica frente al ATP extracelular es mediada por dos tipos distintos de receptores P2, los P2X son receptores ionotrópicos que al activarse por ATP actúan como canales catiónicos no selectivos que permean sodio, potasio y principalmente calcio (North, 2002). La otra familia de receptores purinérgicos son los receptores metabotrópicos P2Y los que se dividen en dos grupos funcionales: los que activan a fosfolipasa C (P2Y 1, 2, 4, 6, y 11) produciendo la liberación de calcio intracelular; y los que activan a la adenilato ciclasa (P2Y 12, 13 y 14) modificando los niveles intracelulares de cAMP. Éstos receptores muestran un bajo grado de homología a nivel de secuencia peptídica (19-55% idénticos) y en consecuencia, muestran diferencias significativas en sus características farmacológicas y operativas (Harden y col., 1995; Ralevic y Burnstock, 1998).

La estimulación de receptores P2X y P2Y lleva a una entrada de Ca^{2+} y activación de la familia de las MAPK, ERK 1/2, p38 y JNK en varios tipos celulares (Harden y col., 1995; Ralevic y Burnstock, 1998). Cinco receptores P2Y (P2Y 1, 2, 4, 6 y 11) están acoplados a fosfolipasa C (PLC) a través de proteína Gq, resultando en la formación de DAG e IP3 (Communi y col., 2000). Estos segundos mensajeros activan la proteína quinasa C (PKC), modulando la concentración intracelular de Ca^{2+} . Otros receptores P2Y están acoplados a adenilato ciclasa a través de tanto proteína Gi (P2Y 2 y 4) como de proteína Gs (P2Y 11) regulando de esta forma la generación de AMPc (Communi y col., 2000).

En una línea celular muscular de ratón C2C12 se demostró que, ATP a través de receptores P2 estimula la velocidad de transporte de glucosa y también se demostró un incremento en la translocación de GLUT1 y GLUT4 a la superficie celular (Kim y col., 2002). De manera contraria Fischer y col., reportaron que ATP a través de los receptores P2 inhibe el transporte de glucosa basal y estimulado por insulina en cardiomiocitos (Fischer y col., 1999).

4.3 Regulación del transporte de glucosa inducido por insulina

Los GLUTs actúan como transportadores que movilizan glucosa a favor de la gradiente química a través de la membrana plasmática. En mamíferos, estos transportadores facilitativos se diferencian por su distribución tisular, propiedades cinéticas y por su localización intracelular (Medina y Owen, 2002; Thong y col., 2005). Muchos tejidos, como por ejemplo el cerebro, tienen un



requerimiento alto de glucosa y evolutivamente han sido provistos de transportadores que se expresan continuamente en la superficie celular (como los GLUT1 y GLUT3). Al contrario, tejidos muscular y adiposo, han adquirido una alta especialización en relación a los sistemas de transporte de glucosa, pudiendo regular muy rápidamente la velocidad del transporte entre 10 y 40 veces por minuto en respuesta a la exposición de ciertos estímulos (Shepherd y Kahn, 1999). Este mecanismo es indispensable durante el ejercicio, ya que, la demanda metabólica del músculo esquelético puede incrementarse más de 100 veces y es fundamental durante los períodos de absorción de nutrientes, ya que facilita el rápido almacenamiento de glucosa en músculo, hígado y tejido adiposo, lo que previene las grandes fluctuaciones en los niveles de azúcar circulante. Desde el clonamiento del gen para GLUT4 en 1989, numerosos estudios se han focalizado en determinar los mecanismos moleculares básicos involucrados en la regulación de su actividad, ya sea por insulina, contracción o estrés osmótico, llegando a ser en la actualidad un importante campo de investigación en una gran variedad de modelos (Li y col., 2001). En condiciones basales, el GLUT4 se encuentra en un ciclo hacia y desde la membrana plasmática a través de una lenta exocitosis y una rápida endocitosis, esta última tiene un tiempo medio de 3,5 min (Satoh y col., 1993; Li y col., 2001; Dugani y Klip, 2005). Diversas aproximaciones microscópicas han localizado al GLUT4 en estructuras túbulo-vesiculares, en la región perinuclear y en diferentes zonas del citoplasma celular (Slot y col., 1991; Malide y col., 2000). La fracción del GLUT4 ubicado en la región perinuclear, colocaliza parcialmente con

marcadores de retículo endoplásmico (ERC), el complejo de Golgi y la red del *trans*-Golgi (TGN) (Bryant y col., 2002; Ploug y Ralston, 2002.). Dado el comportamiento dinámico del GLUT4, no es fácil determinar por análisis microscópico si los compartimientos perinucleares, citoplasmáticos u otros, son los facilitadores del transporte de glucosa sensibles a insulina. Posteriores estudios que utilizaron la eliminación química de los compartimientos que contienen al receptor de transferrina (TfR), usando TfR unido a peroxidasa (Martin y col., 1996; Zeigerer y col., 2002) identificaron consistentemente dos poblaciones de GLUT4: uno vinculado a TfR, el cual es un marcador de compartimientos de retículo endoplasmático (ERC), y otro que se encuentra alejado de ahí (no-ERC pool). Actualmente existe consenso en relación a que insulina moviliza GLUT4 desde el pool independiente de ERC, el cual ha sido conocido como el compartimiento especializado en GLUT4 o como el compartimiento que almacena las vesículas sensibles a insulina cargadas con GLUT4 (GSV).

Algunos estudios recientes han modificado conceptualmente la definición de la naturaleza bioquímica de los GSV. La aminopeptidasa que responde a insulina (IRAP) es co-segregada con GLUT4 y posee una distribución similar en membrana citoplasmática. Aunque IRAP podría regular la retención y/o el secuestro de las vesículas con GLUT4 (Hosaka y col., 2005), no identifica un pool especializado de GLUT4, sólo lo distribuye a través de dichos compartimientos (Keller, 2003). Un marcador selectivo de GSV podría ser la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP2) unida a receptores

proteicos (v-SNARE) que son requeridos para la fusión de GLUT4 con la membrana citoplasmática en respuesta a insulina. VAMP2 se encuentra sólo en una subpoblación de vesículas con GLUT4, que muestran una segregación lejana al TfR (Bryant y col., 2002; Watson y col., 2004 b). Más aún, estímulos como el estrés hiperosmótico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) no lograron que VAMP2 incrementara los niveles de GLUT4 en la superficie celular, la que fue dependiente de v-SNARE y VAMP7 (Randhawa y col., 2004; Torok y col., 2004). Futuros trabajos podrían confirmar si GSV constituye un compartimiento preformado de VAMP2 y GLUT4 o si las vesículas con GLUT4 adquieren VAMP2 durante la translocación a la membrana plasmática por estímulos de insulina.

Existen nuevos antecedentes que GGA (proteína de unión a Arf- γ), localizada en el Golgi, se requiere para direccionar el transportador GLUT4 recién formado desde el TGN hacia el GSV (Watson y col., 2004 b). GGA interacciona con sortilina, proteína del TGN y de la membrana del endosoma, necesaria y suficiente para la formación de pequeñas vesículas enriquecidas en GLUT4 (Shi y Kandor, 2005). La coexpresión de sortilina y GLUT4 marcado con un epítopo myc en adipocitos 3T3-L1, generó vesículas cargadas con transportadores. Contrariamente, la reducción de sortilina endógena a través de RNA de interferencia (RNAi), impidió la formación de vesículas cargadas con transportador de glucosa en estos adipocitos. Se necesitan nuevos estudios para determinar qué otras características de GSV permiten la formación de

vesículas cargadas con GLUT4 y el enriquecimiento de VAMP2 en respuesta a insulina.

4.4 Mecanismos de señalización que estimulan la incorporación de glucosa durante la contracción muscular.

Los mecanismos moleculares subyacentes al transporte de glucosa en músculo esquelético mediados por insulina y ejercicio físico son distintos. La señalización por insulina implica la fosforilación rápida del receptor de insulina, el sustrato para el receptor de insulina (IRS) 1 y 2 en residuos de tirosina y la activación de PI3-quinasa (Goodyear y col., 1995). Contrariamente a los efectos de insulina recién descritos, el ejercicio y la contracción muscular no tienen efecto en la fosforilación en residuos de tirosina del receptor de insulina, IRS o la actividad de PI3-quinasa (Goodyear y col., 1995). Estudios recientes han investigado la hipótesis de que la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) es una molécula crítica para la regulación metabólica, transcripcional y de síntesis proteica durante la contracción muscular. AMPK es miembro de una familia de proteínas quinasas siendo el homólogo en mamíferos de la proteína quinasa de SNF-1 de *Saccharomyces cerevisiae*, que es crítica para la adaptación de levaduras a estrés nutricional (Mitchell y col., 1994; Stapleton y col., 1994; Hardie, y col., 1998; Kemp y col., 1999). AMPK es un heterotrímero compuesto por las subunidades α , β y γ las cuales tienen dos o más isoformas distintas (Hardie y col., 1998; Kemp y col., 1999). Las principales isoformas

expresadas en músculo esquelético son α_2 , β_2 y γ_1 o γ_3 . La subunidad α de AMPK tiene actividad catalítica, mientras que las subunidades β y γ parecen ser importantes en la especificidad del sustrato y el mantenimiento de la estabilidad del heterotrímero (Hardie y col., 1998; Kemp y col., 1999). AMPK es activada por un incremento en la razón AMP/ATP y creatina/fosfocreatina a través de un complejo mecanismo que implica modificaciones alostericas y fosforilaciones (Hardie y col., 1998; Kemp y col., 1999). La actividad contráctil altera el estado energético de la célula muscular, dependiendo de la intensidad de las contracciones puede disminuir significativamente la concentración de ATP y fosfocreatina intracelular.

La contracción muscular se inicia con la despolarización de la membrana plasmática y los túbulos T, gatillando la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico. Esta elevación del Ca^{2+} intracelular ha sido propuesta como una señal en la iniciación del transporte de glucosa estimulado por contracción y translocación de GLUT4 (Jessen y Goodyear, 2005). El mecanismo por el cual el Ca^{2+} estimula el transporte de glucosa en condiciones de ejercicio es desconocido (Jessen y Goodyear, 2005). Potenciales candidatos que participarían en el mecanismo de transducción de señales que media este fenómeno son calmodulina y la familia de proteínas quinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina (CaMKs) y PKC, ya que el uso de inhibidores farmacológicos para cada una de las proteínas señaladas reduce la incorporación de glucosa estimulada por contracción muscular (Jessen y

Goodyear, 2005).

En nuestro laboratorio se ha descrito que en cultivos primarios de células musculares esqueléticas, modelo bien caracterizado, el estímulo eléctrico es capaz de generar contracción muscular (Jaimovich y col., 2000; Araya y col., 2003; Eltit y col., 2004). Tal como se señaló previamente, el ejercicio físico conlleva una gran variedad de cambios fisiológicos en el músculo esquelético. El año 2008 Nedachi y colaboradores caracterizaron un modelo de células C2C12 (miotubos) en el cual manipularon los transitorios de calcio intracelular mediante estimulación eléctrica pulsátil (EPS), confiriendo a este modelo de cultivo celular propiedades contráctiles similares al tejido muscular *in vivo*. Además describieron activación de AMPK y quinasas activadas por estrés así como una mayor respuesta a insulina (Nedachi y col., 2008). De esta manera el estímulo eléctrico induce respuestas similares al ejercicio físico. Considerando estos antecedentes es posible estudiar el estímulo eléctrico como un modelo simplificado de ejercicio físico y la manera como este estímulo se relaciona con los cambios metabólicos que produce la insulina.

4.5 Participación del Ca^{2+} en la contracción muscular y como segundo mensajero.

El acoplamiento excitación-contracción es definido como el proceso que permite que el potencial de acción (excitación) genere contracción muscular en una fibra de músculo estriado (Dulhunty, 2006). Esto se logra cuando la despolarización de la membrana es transmitida a través de los túbulos T,

produciendo un cambio conformacional en el receptor de dihidropiridinas (DHPR), sensor de voltaje, que está acoplado mecánicamente al canal receptor de Ryanodina (RyR) en el retículo sarcoplasmático (Tanabe y col., 1990). Esto promueve la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma estimulando la contracción muscular (Dulhunty, 2006).

En nuestro laboratorio, se ha demostrado que el aumento de Ca^{2+} inducido por despolarización por altas concentraciones de K^+ o la estimulación eléctrica en células musculares esqueléticas, es un evento complejo que involucra dos componentes (Jaimovich y col., 2000; Araya y col., 2003; Eltit y col., 2004). El primer componente corresponde a la señal rápida de Ca^{2+} localizada en el citoplasma y se relaciona con el acoplamiento excitación-contracción explicado anteriormente. Mientras que el segundo aumento o la señal lenta de Ca^{2+} se produce por la liberación de éste ión desde reservorios intracelulares sensibles a IP_3 y está asociada a la regulación de la expresión génica (Araya y col., 2003; Juretic y col., 2006; Juretic y col., 2007).

Los mecanismos moleculares involucrados en la generación de la señal lenta de Ca^{2+} involucran la activación, dependiente del DHPR, de una proteína G sensible a toxina *pertussis*, la activación de fosfatidil inositol 3 quinasa γ (PI3-K γ), y la subsecuente activación de fosfolipasa $\text{C}\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$). Esta última enzima promueve la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP_2) a inositol 3-fosfato (IP_3) que es necesario para producir la señal lenta de Ca^{2+} (Eltit y col., 2006).

La isoforma PI3-K γ corresponde a una PI3-K de clase IB, que es la única

isoforma activada por receptores acoplados a proteína G y que es regulada por las subunidades $G\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas del subtipo G_i (Hirsch y col., 2007). La enzima PI3-K cataliza la adición de una molécula de fosfato a la posición 3 del anillo de inositol del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2), generando fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP_3).

Los productos de las PI3-K de clase I controlan una amplia gama de procesos celulares, debido a que generan fosfolípidos que actúan como sitios de anclaje para proteínas que contienen dominios de unión a lípidos, como el dominio de homología a pleckstrina (PH) (Lemmon, 2007). Dentro de las proteínas con este dominio se encuentra la quinasa Akt (ver sección 4.1), PLC γ 1 y GTPasas pequeñas de la familia de Rho y Arf (Hirsch y col., 2007).

4.5.1 Señales de Ca^{2+} producidas por insulina en el músculo esquelético.

La interacción entre la estimulación de la célula muscular y su respuesta contráctil ocurre a través de un mecanismo llamado acoplamiento excitación-contracción, en el cual la despolarización de la membrana plasmática (sarcolema) produce un aumento rápido (10 mseg) de la concentración de Ca^{2+} intracelular, debido a la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático. Estos eventos son controlados por el receptor para dihidropiridinas, el que constituye un sensor de voltaje y un canal de Ca^{2+} tipo L (Lamb, 2002).

Es reconocido que el ión Ca^{2+} juega diversos papeles controlando diferentes funciones en la célula muscular, incluyendo la activación de diversas

vías metabólicas, diferenciación, hipertrofia y cambios en la expresión génica, (Semsarian y col., 1999; Jaimovich y Carrasco, 2002; Carrasco y col., 2003). La regulación de la concentración intracelular de Ca^{2+} involucra la entrada de este catión a través de la membrana plasmática, la liberación desde depósitos intracelulares y su extrusión activa desde el citoplasma tanto a los depósitos intracelulares como hacia fuera de la célula, a través de bombas de Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular ocurre a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC), canales de Ca^{2+} operados por depleción de almacenes internos o activados por receptor (SOCE y ROC, respectivamente), mientras que la liberación de Ca^{2+} desde depósitos internos sólo ocurre por la activación de canales de Ca^{2+} sensibles a IP_3 o ryanodina (Berridge y col., 2000). La regulación efectiva y la presencia de fluctuaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular está íntimamente ligada a diversos procesos celulares tales como proliferación y diferenciación, metabolismo celular, citotoxicidad y apoptosis (Berridge y col., 2000).

Los efectos inducidos por la insulina en el músculo esquelético son producidos por la activación de cascadas de transducción de señales similares a las descritas en otros tipos celulares. Muchas de ellas son potencialmente sensibles a los aumentos de concentración de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, no existe evidencia clara de que los efectos de insulina sobre el músculo esquelético sean dependientes de cambios en la concentración de Ca^{2+} . Tal como IGF-1, insulina también produce liberación de Ca^{2+} desde el canal sensible a ryanodina, caracterizada por un aumento rápido y transitorio

(Espinosa y col., 2004). Existen datos que indican que la insulina produce aumentos localizados de Ca^{2+} en la vecindad del sarcolema de fibras musculares aisladas. Este aumento es debido a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular siendo necesario para la incorporación de glucosa a la fibra muscular (Bruton y col., 1999; Lanner y col., 2006). Por otra parte existe evidencia, basada en el uso de quelantes intracelulares, que indican que las fluctuaciones en la concentración de Ca^{2+} intracelular son necesarias para que se produzcan algunos efectos inducidos por la insulina, tales como la inhibición de la fosforilación en serina y treonina de IRS-1, la fosforilación de Akt y las MAP quinasas ERK1/2 en adipocitos. También se ha observado que el vaciamiento de depósitos intracelulares de Ca^{2+} mediante tapsigargina (inhibidor de la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplasmático), bloquea tanto el transporte de glucosa como la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática (Worrall y Olefsky, 2002). Trabajos realizados en cardiomiocitos, indican que insulina e IP_3 potencian la duración de la liberación de Ca^{2+} mediada por potenciales de acción en ratones (Fauconnier y col., 2005). En nuestro laboratorio recientemente se demostró que en miotubos Insulina es capaz de inducir liberación de Ca^{2+} a través del receptor de IP_3 . Esta liberación de calcio es modulada por ROS, tanto la generación de ROS como la liberación de Ca^{2+} fueron dependientes de la activación de la PI3-K y de PKC.

5. HIPÓTESIS

El ATP liberado al medio extracelular en respuesta a un estímulo eléctrico tetánico, actúa de manera autocrina y paracrina sobre receptores purinérgicos, activando la vía de señalización PI3-quinasa/Akt, reguladora clave de la señalización por insulina y promoviendo la captación de glucosa, vía GLUT4, en cultivos primarios de células musculares esqueléticas de rata.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la vía de señalización intracelular involucrada en la incorporación de glucosa, mediada por el ATP liberado al medio extracelular en respuesta a estimulación eléctrica, en células musculares esqueléticas de rata.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7.1 Determinar la translocación de transportadores GLUT4 a la membrana celular e incorporación de glucosa inducida por estímulo eléctrico y ATP extracelular en células musculares de rata.

7.2 Caracterizar la vía de señalización involucrada en el aumento del transporte de glucosa dependiente del ATP liberado al medio extracelular en respuesta a estímulo eléctrico en células musculares de rata.

7.3 Determinar si el ATP liberado al medio extracelular por estímulo eléctrico actúa de manera independiente a la señalización PI3-K/Akt inducida por insulina en células musculares de rata.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Reactivos.

2-NBDG fue obtenida de Invitrogen (Eugene, OR, USA). 2-deoxy- [^3H] glucosa fue obtenido de NEN Radiochemicals Perkin Elmer (Waltham, MA, USA). Indinavir, Merck; U-73122, DMEM, insulina, Suramina, Apirasa, EDTA, EGTA, NaVO_4 , PMSF, glicerol, DTT, Tween-20 fueron obtenidos desde *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO). KCl, 2-mercaptoetanol, TEMED, BSA, sacarosa obtenidos de Winkler (Santiago, Chile). Citocalasina B, Akt-inhibitor VIII, LY-294002 fueron obtenidos desde *Calbiochem* (La Jolla, CA). Colagenasa tipo II y IV desde *Worthington Biochemical Corporation* (Lakewood, CA). Xestospongina B fue obtenida del Laboratorio del Dr. Jordi Molgó, Membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA), las películas fotográficas fueron obtenidas desde *Amersham Biosciences* (Piscataway, NJ). Sustrato quimioluminiscente *Supersignal West Pico* fue obtenido desde *Pierce Biotechnology* (Rockford, IL). Otros reactivos: reactivo de Bradford (BioRad, USA), Dako (Dako Cytomation, CA, USA), western Lightning se adquirió en PerKinElmer Life Sciences, Inc (Boston, USA). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

8.2 Cultivo primario de músculo esquelético de rata y líneas celulares musculares L6.

El método utilizado fue el descrito por Carrasco y col., 2003. Ratas neonatas (0-24 h) se sacrificaron por decapitación, obteniéndose células de las extremidades posteriores mediante disección fina y disgregación mecánica del tejido muscular en un pequeño volumen de una solución estéril de PBS. El tejido se sometió a digestión enzimática en 8 ml de 0,1% p/v de colagenasa en PBS durante 15 min con agitación suave a 37°C, deteniendo la reacción mediante la adición de igual volumen de medio de cultivo DMEM/Ham F12 (1:1 v/v), 10% de suero bovino, 2,5% de suero fetal, penicilina (100 mg/l), estreptomina (50 mg/l) y fungizona B (2,5 mg/l) (medio completo). El tejido parcialmente digerido se filtró en mallas de nytex, y las células colectadas por centrifugación se resuspendieron en 10 ml de este mismo medio de cultivo. Se realizó pre-plaqueo de 50 min en cápsula de Petri de 150 mm, donde los fibroblastos que se adhieren más rápido a la placa son eliminados parcialmente. Las células se sembraron en placas gelatinizadas de 6 cm en medio completo. A las 72 h se trataron con Ara-C para disminuir los fibroblastos. Para diferenciación, se eliminó el suero del medio de cultivo. De este modo, se obtienen miotubos bien formados y con actividad contráctil al cabo de 6 o 7 días.

Células musculares L6 que expresan el transportador GLUT4 con un epítipo *myc* exofacial (L6GLUT4*myc*) se cultivaron como fue descrito por Wang y col 1998. Para crear mioblastos L6GLUT4*myc* que expresan de manera

estable la proteína AS160 humana (cDNA regalado por el Dr. G.E. Lienhard, Dartmouth Medical School, NH), el cDNA se clonó en un vector retroviral pQXIP (BD Biosciences). Los cultivos infectados se trataron con puromicina (2,5 mg/l) por aproximadamente 7 días para crear un pool estable de clones (L6GLUT4myc-hAS160).

8.3 Cultivo de fibras musculares adultas.

Se utilizaron ratones C57BL/6 (5-7 semanas) para la disección. Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (100 mg/Kg) y xylazina (10 mg/Kg) intraperitoneal y sacrificados por dislocación cervical. Las fibras musculares aisladas, se obtuvieron enzimáticamente a partir del músculo *flexorum digitorum brevis* (FDB). Luego, fueron mantenidas por 30 min en medio de cultivo para su adhesión y estabilización antes de la realización de los experimentos. Las fibras se estimularon con ATP exógeno (100 μ M), insulina (100 nM) o ambos.

8.4 Obtención de extractos proteicos totales.

Los miotubos cultivados en placas de cultivo de 35 ó 60 mm de diámetro se estimularon con estímulo eléctrico tetánico, Insulina (100 nM) y/o ATP (100 μ M) en presencia o ausencia de inhibidores. Posteriormente, las células se lavaron en tampón fosfato salino frío y se les agregó una solución de lisis consistente en Tris-HCl (20 mM, pH 7,5), 1% Tritón X-100, EDTA (2 mM), NaF (20 mM), $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (1mM), 10% glicerol, NaCl (150 mM), Na_3VO_4 (10 mM),

PMSF (1 mM) y mezcla de inhibidores de proteasas (*Roche Applied Science*, Indianapolis, IN). Los lisados se incubaron durante 30 min en hielo y luego centrifugados a $15.000 \times g$ por 10 min a 4°C. La determinación de proteínas totales se realizó con el reactivo *Comassie Plus Reagent* (*Pierce Biotechnology*, Piscataway, NJ). El sobrenadante que contenía las proteínas fue alicuotado y congelado a -20°C hasta su utilización.

8.5 Western blot (WB).

La separación de proteínas por electroforesis se llevó a cabo por métodos estándares. Los extractos proteicos totales se denaturaron a 100°C en una solución tampón conteniendo Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8), 10% glicerol, 2% dodecil sulfato de sodio, DTT (100 mM) y 0,01% azul de bromofenol. Las proteínas (40-60 µg) se separaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% utilizando un equipo de electroforesis *Mini-Protean III* (*Bio-Rad*, Hercules, CA). Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (*Millipore*, Bedford, MA) usando un sistema de transferencia húmeda *Mini-Trans Blots* (*Bio Rad*, Hercules, CA) a 400 mA durante 2 h a 4°C. Luego las membranas fueron lavadas tres veces con solución TBS-T (Tris-HCl (20 mM) [pH 7,6], NaCl (150 mM), 0,05% Tween) y posteriormente incubadas con solución de bloqueo (3% de leche en polvo baja en materia grasa en TBS-T ó 3% BSA) a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: antifosfo(Thr308), antifosfo(Ser473)-Akt

(1:1.000; *Cell Signaling*), anti-Akt (1:1.000; *Cell Signaling*), antifosfo (Tyr1150/1151)-Receptor de Insulina β (1:1.000; *Cell Signaling*), antifosfo (Ser318) - AS160, antifosfo (Ser341) - AS160, antifosfo (Ser571) - AS160, antifosfo (Ser588) - AS160, antifosfo (Thr751) - AS160 (1:1000 Division of Signal Transduction at University of Dundee, Dr. James Hastie) antifosfo (Thr642) - AS160 (1:1.000; *Cell Signaling*, anti-AS160 (1:1.000; *Cell Signaling*); anti Rab8, Anti Rab10 (1:1.000; *Cell Signaling*). En algunos casos se utilizó β -actina (1:10.000; *Sigma*) o anti-Actinina I (1:1.0000; *Cell Signaling*), como control de carga. Luego, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T durante 10 min. a temperatura ambiente e incubadas con anticuerpos secundarios específicos conjugados a peroxidasa (*Pierce Biotechnology*, Piscataway, NJ), por 1 h a temperatura ambiente a razón de 1:2.000 en solución de bloqueo. La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con un kit *Supersignal West Pico* (*Pierce Biotechnology*, Piscataway, NJ) y la detección se realizó con películas fotográficas (*Amersham Biosciences*, Piscataway, NJ). Una vez finalizado este procedimiento las membranas de PVDF se trataron con una solución consistente en glicina (200 mM, pH 2), β -mercaptoetanol (100 mM) y 0,05 % Tween, a temperatura ambiente por 30 min, para remover los anticuerpos unidos. Las membranas fueron lavadas con TBS-T, bloqueadas por 1 h con solución de bloqueo e incubadas con anticuerpos dirigidos contra las formas totales de las proteínas o β -actina, como control de carga de proteínas en el gel. Las imágenes digitalizadas de los WB se utilizaron para los análisis densitométricos con el software Image J (NIH).



8.6 Preparación de DNA plasmidial.

Transformación de bacterias: Bacterias *E. coli* DH5a electrocompetentes (25 μ L D.O. 0,6-0,8 nm) se electroporaron en presencia de 0.01 μ g del plasmidio. A esta mezcla se agregó 1 ml de medio TB (Terrific Broth) y se incubó a 37°C por 30 min con agitación. 10 y 50 μ l de la suspensión de bacterias se esparcieron sobre una placa con agar 1% en medio Luria (LB) que contenía ampicilina 50 μ g/ml, como antibiótico de selección y se incubó toda la noche a 37° C. Las bacterias que completaron exitosamente la transformación formaron colonias discretas, las cuales se seleccionaron y expandieron en medio LB con ampicilina para luego ser congeladas a -80° C en glicerol al 50%.

8.7 Amplificación de plasmidios.

La amplificación de plasmidios se llevó a cabo según procedimientos estándares. Brevemente 500 ml de medio LB con ampicilina (50 μ g/ml) se inocularon con bacterias almacenadas en glicerol y se incubaron durante toda la noche a 37° C con agitación. Posteriormente las bacterias se colectaron por centrifugación a 3000 rpm por 10 min a 4° C.

8.8 Purificación del DNA plasmidial.

Se llevó a cabo mediante el kit "Plasmid Midi Kit" (QIAGEN). La determinación de la concentración de cada plasmidio se realizó determinando su absorbancia a 260/280 nm. La calidad del DNA plasmidial se evaluó en gel

de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio y se comparó con el estándar 1 Kb DNA Mass Ladder.

8.9 Transfección de mioblastos.

Los mioblastos de rata se sembraron y crecieron hasta alcanzar un 70% de confluencia aproximada al tercer día post-plaqueo. La transfección se realizó en medio DMEM-F12 sin suero y sin antibióticos, utilizando 3 μ l de FuGENE 6 (Roche), 0,9 μ g de vector reportero y 0,1 μ g de vector de normalización por placa en un volumen de 1.5 ml de medio DMEM-F12 por placa de 60 mm. Transcurrido 16 h (overnight) a 37° C, el medio se reemplazo por medio de diferenciación. Células L6GLUT4*myc* se transfectaron con siRNAs para Rab8A y Rab 10 usando jetPrime, Polyplus-Transfection, Inc. por 24 h y cultivados por 48 h.

Para introducir los plasmidios GLUT4*myc*-eGFP, PI3-K γ WT, PI3-K γ KD, PI3-K γ -myr, Akt-my (donados por Dr. TR Jackson, University de Newcastle, UK) o la cadena liviana de toxina tetánica (TeTx), en los mioblastos, las células se sembraron sobre cubreobjetos circulares de vidrio de 25 mm de diámetro en placas de 6 pocillos (1.000.000 células por cubreobjeto). En el día 2, los mioblastos se transfectaron con el plasmidio GLUT4*myc*-eGFP en lipofectamina (1:2) en medio de transfección (DMEM: M199 = 4:1, en ausencia de SFB y antibióticos). Luego de 4 h de transfección, las células se suplementaron con 10% de SFB y 1% de penicilina – estreptomina por 24 h.

8.10 Determinación de ATP por ensayo Luciferina/luciferasa.

Cincuenta microlitros de muestras de medio extracelular se añadieron a 20 μ L de *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Luego se incubaron por 10 min en oscuridad, las muestras se cuantificaron en un luminómetro Berthold F12. En paralelo, se realizó una curva estándar a partir de 1 fmol a 100 pmol ATP utilizando el mismo kit. Los valores obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva estándar para determinar las concentraciones de ATP en cada condición, concentración de ATP que se normalizó por el contenido de proteínas totales de la placa respectiva.

8.11 Detección de GLUT4myc en la superficie celular

Este ensayo fue descrito por Wang y col. Brevemente, las células L6GLUT4myc fueron crecidas en placas de 24 pocillos y privadas de SFB durante 3 h previas al inicio de los experimentos. Luego de distintos tiempos de estimulación con insulina o ATP extracelular, las células se lavaron con PBS 1X suplementado con CaCl_2 (1 mM) y MgCl_2 (1 mM, pH 7.4) a 4° C y bloqueadas con suero de cabra al 5% en PBS 1X durante 15 min, posteriormente fueron incubadas con anticuerpo polyclonal anti-myc (1:500) por 1 h a 4°C. Posteriormente se procedió a lavar 10 veces con PBS 1X suplementado con CaCl_2 (1 mM) y MgCl_2 (1 mM, pH 7.4) y fijadas con paraformaldehído al 4% - PBS 1X a 4° C por 15 min y tratadas posteriormente con glicina (100 mM) por 10 min a 4° C. Se realizaron 5 lavados rápidos con PBS 1X suplementado con

CaCl₂ (1 mM) y MgCl₂ (1 mM, pH 7.4) e incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:1000) durante 1 h a 4°C. Las células se lavaron 10 veces e incubadas con 1 ml del reactivo o-phenylenediamine a temperatura ambiente, la reacción se detuvo agregando 0,25 ml por pocillo de HCl 3 M. El sobrenadante de cada pocillo se recolectó y se midió la absorbancia a 492 nm. La absorbancia basal fue obtenida en ausencia del anticuerpo primario anti-*myc* y se restó de todos los valores.

8.12 Transducción de miotubos

Las placas de 35 mm con 1×10^6 miotubos, se transdujeron con multiplicidades de infección (MOI) de 5000 del adenovirus β ark-ct (Ad β ark-ct), Adenovirus Akt miristoilado (AdAkt-myr), Akt dominante negativo (AdAkt-dn). Como control se utilizó un adenovirus vacío (AdVacío). Como reportero de transducción se utilizó un adenovirus que expresa la proteína fluorescente verde GFP (AdGFP). Las células se incubaron por 48 h a 37°C en cámara humidificada 5% CO₂/95% aire. GFP y β ark-ct fueron gentilmente donados por el Dr. WJ. Koch, (Duke University, Durham, NC). AdAkt-myr, AdAkt-dn y Advacío fueron donados gentilmente por el Dr. Joseph A Hill (University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas). El Ad β ark-ct expresa una porción aminoterminal de la quinasa del receptor β -adrenérgico que une subunidades $\beta\gamma$ de proteína G heterotrimérica (G $\beta\gamma$), actuando como un inhibidor dominante negativo de la señalización G $\beta\gamma$ (Koch y col. 1994).

La eficiencia de transducción empleando adenovirus fue superior al 95%, monitorizado con AdGFP.

8.13 Medición de la internalización de GLUT4myc (endocitosis).

La internalización de GLUT4myc se midió como se describió en el punto anterior, con leves modificaciones. Brevemente, mioblastos L6GLUT4myc se estimularon con ATP o insulina, para inducir la translocación de los transportadores a la superficie celular. Las células se lavaron con PBS 1X suplementado con CaCl₂ (1 mM) y MgCl₂ (1 mM, pH 7.4) a 4°C y bloqueadas con suero de cabra al 5% en PBS 1X durante 10 min, posteriormente se incubaron con anticuerpo policlonal anti-myc (1:250) a 4°C por 1 h. Los transportadores GLUT4myc marcados con el anticuerpo se estimularon a internalizarse mediante el recalentamiento a 37°C durante distintos tiempos tanto en presencia o ausencia de los estímulos respectivos. En los tiempos indicados, las placas con las células se colocaron en hielo y se lavaron tres veces con PBS frío y posteriormente fijadas con 4% PFA durante 10 min y tratadas posteriormente con glicina (100 mM) por 10 min a 4°C e incubadas con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a HRP (1:750) durante 1 h a 4°C. La cantidad de GLUT4myc remanente en la superficie celular a cualquier tiempo después del recalentamiento fue determinado usando el ensayo de absorbancia OPD para ello el sobrenadante de cada pocillo se recolectó y se midió la absorbancia a 492 nm. La absorbancia basal fue obtenida en ausencia del anticuerpo primario anti-myc y se restó de todos los valores, los que fueron

expresados como porcentaje respecto del nivel de GLUT4*myc* en la superficie celular a tiempo 0.

8.14 Medición de la internalización y exocitosis de GLUT4*myc* (reexocitosis).

La reexocitosis de GLUT4*myc* se midió utilizando como base el procedimiento descrito para la exocitosis de GLUT4, con leves modificaciones. Brevemente, mioblastos L6GLUT4*myc* se estimularon con insulina (100 nM) durante 15 min, este estímulo permite la translocación de los transportadores GLUT4*myc* a la superficie celular, siendo marcados con el anticuerpo primario, anti-*myc* (1:250) a 4°C durante una hora. Las células se lavaron con PBS en hielo, posteriormente las células con los transportadores GLUT4*myc* marcados fueron recalentadas a 37°C durante 2 h para inducir endocitosis del complejo GLUT4*myc*/anticuerpo. Finalmente las células se estimularon con insulina o ATP exógeno y el ensayo OPD fue realizado a distintos tiempos, tal como se señaló en el párrafo precedente.

8.15 Detección de GLUT4*myc*-eGFP en la superficie celular en célula única.

48 h después de la transfección del plasmidio GLUT4*myc*-eGFP, los miotubos se privaron de SFB por 12 h antes de realizar los experimentos. Luego del tiempo de estimulación con insulina o ATP extracelular, las células fueron lavadas con PBS 1X suplementado con CaCl₂ (1 mM) y MgCl₂ (1 mM, pH

7.4) a 4° C, fijadas con PFA al 3%-PBS 1X por 10 min y tratadas posteriormente con glicina (100 mM) por 10 min a 4° C. Se realizaron 3 lavados rápidos con PBS a 4° C, para luego ser bloqueadas con albúmina de suero bovino al 1% en PBS 1X por 1 h a temperatura ambiente. Se incubó el anticuerpo anti-*myc* (ratón, 1:100 en PBS 1X) durante toda la noche (12-16 h). Luego de la incubación, las células se lavaron e incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado al fluoróforo Alexa-fluor 546 (1:500 en PBS 1X). A través de microscopía confocal (Carl Zeiss Pascal LSM 5) se realizaron cortes focales en el eje z en células únicas (al menos 10 células por cada condición, por cultivo), para detectar el epítipo *c-myc* en la membrana plasmática. Todos los materiales empleados estuvieron libres de cualquier tipo de detergente para evitar la permeabilización de los miotubos.

8.16 Incorporación 2-NBDG.

Para evaluar la captación de glucosa por estimulación eléctrica tetánica, insulina y ATP exógeno, las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro en placas de 6 pocillos (700.000 células por cubreobjeto). Tras el estímulo correspondiente, los miotubos se incubaron en medio Krebs-Ringer sin glucosa por 5 min y posteriormente incubados con el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (300 μ M) por 15 min a 37° C, evitando la exposición a la luz. La emisión fluorescente se recolectó en células únicas (al menos 30 células por cada condición experimental, por cultivo) a través de un microscopio confocal (microscopio Carl Zeiss Axiovert 135 M-LSM

Microsystems), realizando 3 ROI circulares de 50 x 50 píxeles se obtuvieron las intensidades de fluorescencia al interior de los miotubos, estos valores se promediaron y la fluorescencia fuera de los miotubos (background) se sustrajo al momento de realizar el análisis de las imágenes.

8.17 Incorporación 2-deoxi-³H-glucosa (³H-2DG).

Para determinar la captación de ³H-2DG, los miotubos se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos (1,5 millones de células por pocillo). Luego del estímulo insulina o ATP o ambos, las células se lavaron con tampón HEPES frío y posteriormente incubados con ³H-2DG (1 µCi) disuelto en una solución de HEPES y 2-deoxiglucosa (30 mM) por 15 min a 4° C. Luego se realizaron lavados rápidos con HEPES y los miotubos se lisaron con NaOH (0,05 M). Se añadió líquido de centelleo y se leyeron las cuentas radioactivas por minuto (CPM) de cada condición experimental en triplicado, a través de un contador de centelleo líquido Beckman LS-6000TA (Beckman Instruments Corp., Fullerton, CA).

8.18 Expresión de resultados y análisis estadístico.

Los datos experimentales son presentados como el promedio ± desviación estándar (DS) de un número de experimentos indicados como (n) o como resultados representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y las comparaciones entre los grupos se llevaron a cabo a través de *ANOVA-Bonferroni*, mediante el uso

del programa *GraphPad Prism 4.*(*GraphPad Software, San Diego, CA*). Un valor $p < 0.05$ se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

9. RESULTADOS

9.1 Estimulación eléctrica tetánica induce la incorporación de glucosa 2-NBDG, de manera dependiente de ATP en miotubos de rata neonata.

Para evaluar el efecto de la estimulación eléctrica tetánica sobre la incorporación de glucosa en miotubos, se utilizó la incorporación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (300 μ M) luego de estimulación eléctrica tetánica (400 pulsos, 1 ms, 45 Hz.) (Fig. 2A y 2B). Esta Herramienta ha sido validada cinéticamente como un método confiable para estudiar el transporte de glucosa en células únicas en cultivo (Barros y col., 2009). La Figura 2A muestra una imagen representativa de la incorporación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG, para estímulo eléctrico tetánico (EE) e insulina (Ins). La cuantificación de la señal fluorescente se realizó como se explicó en Materiales y Métodos. En la Figura 2B se muestra la cuantificación de los ensayos de incorporación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG. En ella se observa que posterior a un estímulo eléctrico tetánico, aumenta la incorporación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG $2,5 \pm 0,5$ veces respecto a miotubos no estimulados. Adicionalmente, como control positivo de la captación de 2-NBDG se utilizó insulina (100 nM) induciendo un aumento de $2,87 \pm 0,41$ veces sobre el nivel basal (miotubos no estimulados) (Figs. 2A y 2B).

El aumento del transporte de glucosa 2-NBDG inducido por estimulación eléctrica tetánica fue bloqueado completamente al incubar los miotubos 30 min

previo y durante la estimulación eléctrica con apirasa (2U/mL) ($1,07 \pm 0,23$), ectonucleotidasa que degrada ATP, o Suramina (100 μ M) ($1,02 \pm 0,44$), un antagonista general de los receptores purinérgicos P2, Figuras 2C y 2D respectivamente. Este resultado sugiere que el estímulo eléctrico tetánico aumenta la incorporación de glucosa 2-NBDG mediada por la liberación de ATP al medio extracelular y la activación de receptores Purinérgicos (P2) de manera autocrina.

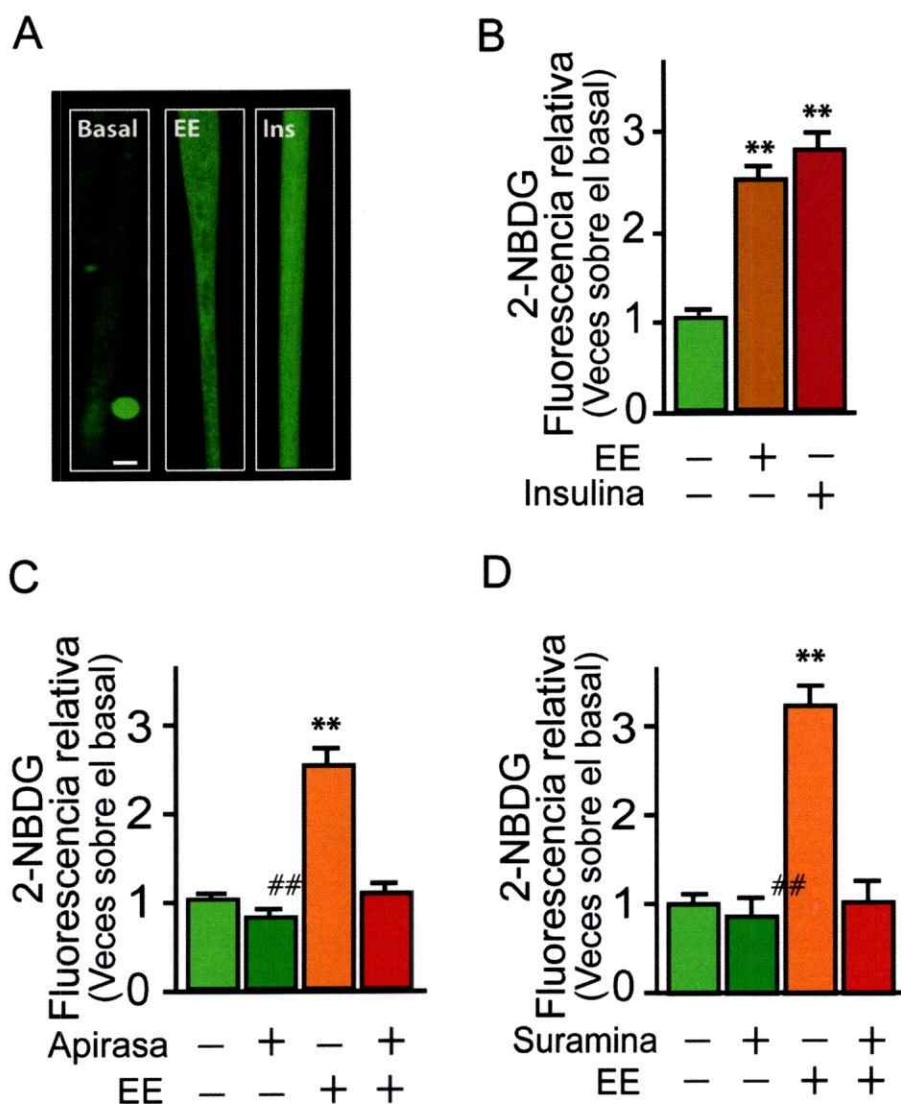


Figura 2 Estimulación eléctrica tetánica induce la incorporación de glucosa 2-NBDG, de manera dependiente de ATP en miotubos de rata neonata.

Células en cultivo primario de músculo esquelético de rata neonata, se estimularon eléctricamente con un estímulo tetánico (EE) (400 pulsos, 1 ms, 45 Hz.) o insulina (100 nM). La incorporación de glucosa 2-NBDG fue realizado como se señaló en Materiales y Métodos **A**) Fotografía representativa de incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por, estimulación eléctrica e insulina, el tiempo de registro corresponde a 15 min posterior a los estímulos correspondientes. **B**) Cuantificación del transporte de glucosa 2-NBDG. **C**) Los miotubos se preincubaron en medio Krebs-Ringer con o sin apirasa (2 U/mL) la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por EE se bloqueó totalmente por apirasa. **D**) Miotubos fueron preincubados en medio Krebs-Ringer con o sin suramina (100 μ M) la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por EE se bloqueó totalmente por suramina. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, El análisis estadístico se realizó con la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por post-test de Bonferroni ** $p < 0,001$ vs del basal (no estimulado) ## $p < 0,001$ respecto a la condición estimulado en ausencia del inhibidor. Datos de 5 experimentos independientes, correspondiente a 150 células por condición, la barra de calibración corresponde a 10 μ m.

9.2 Estimulación eléctrica tetánica induce liberación de ATP al medio extracelular induciendo el transporte de glucosa 2-NBDG en miotubos.

Para confirmar que la estimulación eléctrica tetánica induce liberación de ATP al medio extracelular, miotubos de rata se sometieron a estimulación eléctrica tetánica y alícuotas del medio extracelular fueron extraídas a distintos tiempos, cuantificándose la concentración de ATP en el medio extracelular mediante ensayo luciferina/luciferasa, tal como se señaló en Materiales y Métodos. Se observó que a partir de los 15 seg, post estimulación eléctrica tetánica se produce un aumento significativo en los niveles de ATP extracelular, alcanzando la máxima liberación de ATP al minuto post estimulación y mostrando una tendencia a volver al nivel basal entre los 5 y 15 min post estímulo (Fig. 3A). Este fenómeno observado se correlaciona con el transporte de glucosa 2-NBDG inducido por estímulo eléctrico (Fig. 2). Sin embargo, a fin de determinar si el ATP exógeno induce incorporación de glucosa 2-NBDG de manera dependiente de receptores Purinérgicos P2, miotubos de rata neonata se expusieron a ATP exógeno (100 μ M). Se observó un aumento del transporte de glucosa 2-NBDG ($2,73 \pm 0,52$) sobre la condición basal, insulina (100 nM) se utilizó como control positivo para el ensayo de incorporación de glucosa 2-NBDG (Figs. 3B y 3C respectivamente). Para confirmar que el efecto del ATP exógeno fuera a través de la activación de receptores purinérgicos, se utilizó apirasa (2U/mL) y suramina (100 μ M). En ambos casos el transporte de glucosa 2-NBDG se inhibió totalmente, sin afectar el transporte basal de glucosa (Fig. 3D y 3E respectivamente). El transporte de glucosa inducido por insulina, no fue

afectado por la presencia de apirasa (2U/mL) en el medio extracelular (Fig. S1, anexo).

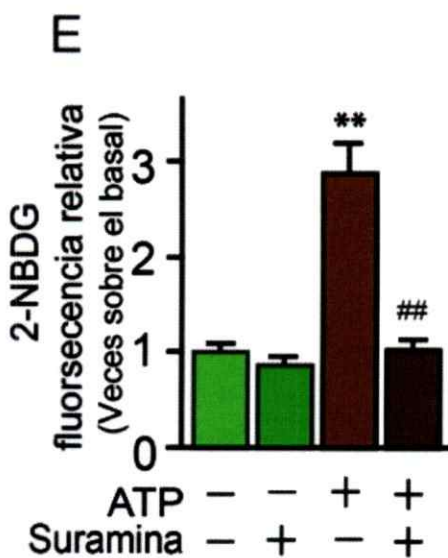
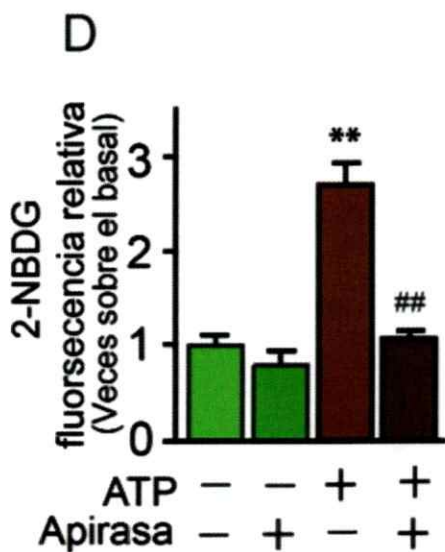
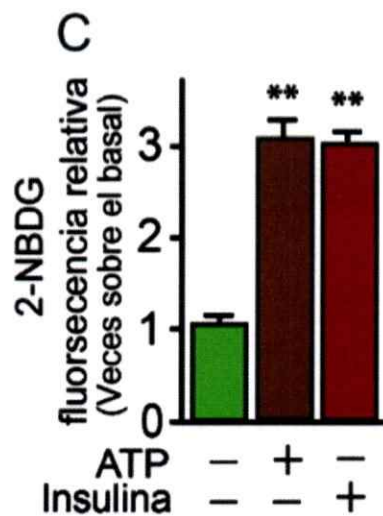
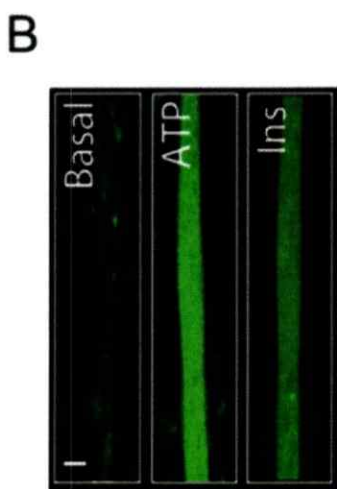
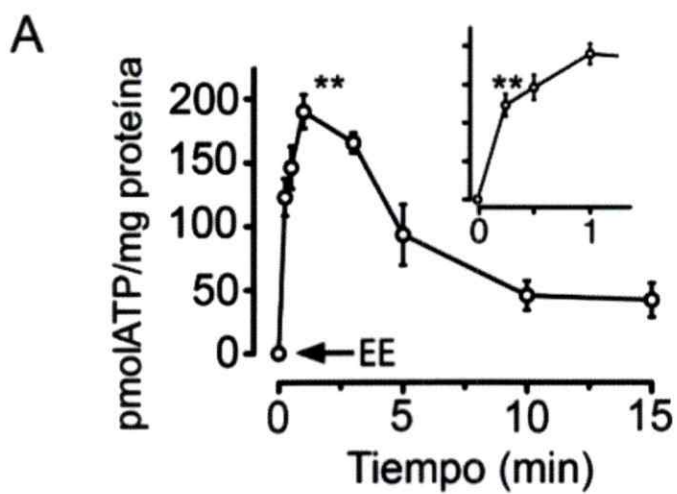


Figura 3 La estimulación eléctrica tetánica induce liberación de ATP al medio extracelular induciendo el aumento de la incorporación de glucosa 2-NBDG en miotubos de rata neonata.

Miotubos de rata neonata en cultivo primario, se estimularon eléctricamente con un estímulo tetánico (EE) (400 pulsos, 1 ms, 45 Hz.), insulina (100 nM) o ATP exógeno (100 μ M). La incorporación de glucosa 2-NBDG se realizó como se señaló en Materiales y Métodos. **A)** Liberación de ATP al medio extracelular luego de la estimulación mediante estímulo eléctrico tetánico (EE), se cuantificó mediante ensayo luciferina/luciferasa como se describió en Materiales y Métodos, la concentración de ATP extracelular se normalizó respecto de la concentración de proteína del extracto total de células. **B)** Fotografía representativa de incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por, ATP exógeno e insulina, el tiempo de registro corresponde a 15 min posterior a los estímulos correspondientes. **C)** Cuantificación del transporte de glucosa 2-NBDG. **D)** Los miotubos se preincubaron en medio Krebs-Ringer con o sin Apirasa (2 U/mL) la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por ATP exógeno fue bloqueado totalmente por apirasa. **E)** Miotubos se preincubaron en medio Krebs-Ringer con o sin suramina (100 μ M) la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por ATP exógeno fue bloqueado totalmente por suramina. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, El análisis estadístico se realizó con la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por post-test de Bonferroni ** $p < 0,001$ vs del basal (no estimulado), ## $p < 0,001$ respecto a la condición estimulado en ausencia del inhibidor. Datos de a lo menos 4 experimentos independientes, correspondiente a 80 células por condición, la barra de calibración corresponde a 10 μ m.

9.3 Efecto del ATP exógeno sobre la incorporación de glucosa ^3H -2DG en miotubos de rata.

El método para medir la incorporación de glucosa usado en esta Tesis, es un método novedoso, descrito por Barros y col., el año 2009, y no constituye el "golden estándar" para cuantificar el transporte de glucosa. Con el fin de validar el método de incorporación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (300 μM), se evaluó la captación de glucosa radioactiva ^3H -2DG tras estimulación con ATP exógeno (100 μM) (Fig. 4). Se obtuvo un aumento estadísticamente significativo con respecto a la condición basal (no estimulada) ($p < 0,001$). Como control positivo de la captación de ^3H -2DG se utilizó insulina (100 nM) durante 5 min. Para confirmar que el aumento en el transporte de ^3H -2DG inducido por ATP exógeno ocurre por la activación de receptores purinérgicos P2 se utilizó suramina (100 μM), observándose que en células incubadas durante 30 min previos y al momento de ser estimuladas con ATP exógeno (100 μM) el transporte de glucosa ^3H -2DG se redujo de manera significativa ($p < 0,01$) en comparación con su control estimulado con ATP exógeno (100 μM) en ausencia de suramina.

Para determinar la participación de la familia de transportadores GLUT4 en la captación de glucosa inducida por ATP exógeno, se utilizó indinavir (100 μM), un bloqueador inespecífico del transporte de glucosa a través de la familia transportadores de glucosa GLUT4. Indinavir bloqueó el incremento de la incorporación de glucosa ^3H -2DG inducida por ATP exógeno. Este resultado sugiere fuertemente que la incorporación de glucosa ocurre a través de la

familia de transportadores GLUT4 (Fig. 4). Este mismo ensayo con glucosa tritiada se realizó de forma paralela con insulina como control positivo (Fig. S2, anexo)

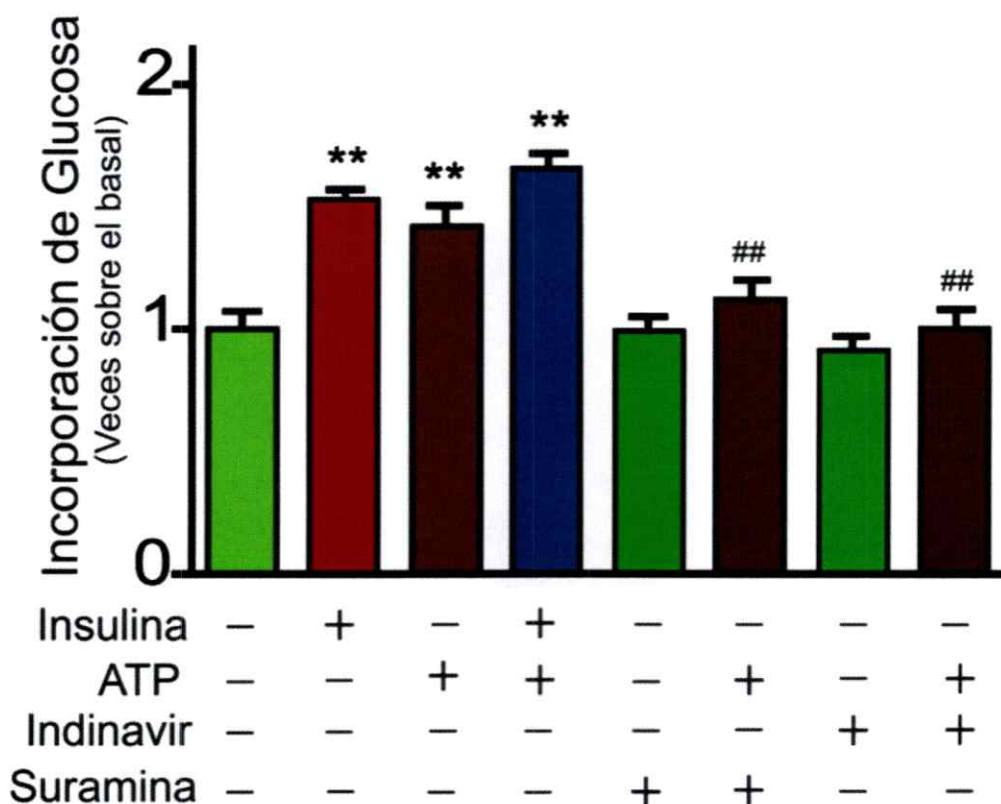


Figura 4 Efecto del ATP exógeno sobre la incorporación de glucosa ^3H -2DG

En miotubos de rata neonata se ensayó la incorporación de ^3H -2DG luego de la estimulación con ATP exógeno (100 μM) o Insulina (100 nM), control positivo. Se observa un bloqueo de la incorporación de ^3H -2DG en miotubos preincubados con suramina (100 μM) e indinavir (100 μM), 30 min previo y durante la estimulación. En miotubos estimulados con ATP exógeno (100 μM) e insulina (100 nM), no se observa un efecto sumatorio en el transporte de ^3H -2DG. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$ respecto del basal (no estimulado), ## $p < 0,001$ respecto de la condición estimulado en ausencia del respectivo inhibidor. El análisis estadístico se realizó con la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.

9.4 El ATP exógeno promueve la translocación de los transportadores GLUT4 a la superficie celular.

Para que la incorporación de glucosa frente a un estímulo apropiado, ya sea estimulación eléctrica, insulina o ATP exógeno pueda ocurrir se requiere la translocación de los transportadores de glucosa GLUT4. Éstos deben ser movilizados desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática de las células. Como se mostró en la Figura 3, al estimular miotubos con ATP exógeno se produce aumento en el transporte de glucosa y los resultados obtenidos en los ensayos de incorporación de glucosa ^3H -2DG sugieren la participación de transportadores de la familia GLUT4 en este proceso de transporte dependiente de ATP exógeno. Considerando ambos resultados, se evaluó la distribución celular de los transportadores GLUT4 frente a la estimulación con ATP exógeno (100 μM) y para ello los miotubos se transfectaron con el plasmidio quimérico GLUT4 myc -eGFP. Este plasmidio contiene el gen humano de la proteína GLUT4, el cual fue modificado con un epítipo *myc*. Una vez que el transportador se inserta en la membrana plasmática queda expuesto hacia la cara extracelular. Adicionalmente, el plasmidio porta el gen de la proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, eGFP), herramienta útil para verificar el nivel de expresión del plasmidio. En presencia de estímulos apropiados que promueven la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, la detección del epítipo *myc* mediante inmunofluorescencia en células musculares no permeabilizadas, permite diferenciar la población de transportador GLUT4 que se encuentra en la

superficie celular, de aquella que se encuentra al interior de la célula. Esto es un criterio de que la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática ha ocurrido (Antonescu y col., 2009, Contreras-Ferrat y col., 2010). La Figura 5A muestra la distribución celular del epítipo *myc* en miotubos transfectados con el plasmidio GLUT4*myc*-eGFP, por medio de inmunofluorescencia y microscopía confocal (cortes confocales). Se observó que la estimulación con ATP exógeno (100 μ M) indujo la movilización del epítipo *myc* a la superficie del miotubo ($2,5 \pm 0,3$), como se muestra en la cuantificación de la Figura 5B, esta distribución del transportador GLUT4 no fue observada en miotubos control (sin estímulo). Como control positivo de la translocación del epítipo *myc* a la superficie celular se utilizó insulina (100 nM) (Fig. 5A y 5B). Para la cuantificación relativa de la población del epítipo *myc* en la superficie celular, se sumaron las emisiones fluorescentes de cada plano focal del eje z donde hubo detección del epítipo *myc* acoplado al fluoróforo Alexa546, lo cual fue normalizado por la suma de la emisión fluorescente de la proteína GFP en los mismos planos focales, estableciendo la razón Alexa546/eGFP como un parámetro de cuantificación relativa del epítipo *myc* en la membrana plasmática. Con los datos obtenidos en la Figura 5A, se decidió evaluar funcionalmente la participación de los transportadores de glucosa GLUT4 en el transporte de glucosa inducido por ATP. Para ello se realizaron experimentos de incorporación de 2-NBDG en miotubos de rata neonata, en presencia de indinavir, droga que actúa como bloqueador inespecífico del transporte de glucosa a través de transportadores de tipo GLUT4. Las células se incubaron

con indinavir (100 μ M), durante 30 min previo y durante la estimulación con ATP exógeno, en esta condición el transporte de 2-NBDG fue bloqueado completamente (Fig. 5C).

En mioblastos L6GLUT4*myc*, modelo celular bien caracterizado para el estudio de la dinámica de los transportadores GLUT4, el ATP exógeno (100 μ M) aumentó la translocación de GLUT4 a la superficie celular, siendo significativo el aumento del transportador GLUT4 en la superficie de la membrana, a partir de los 5 min de estimulación. Estos resultados sugieren fuertemente que el ATP exógeno induce la translocación de GLUT4, evidenciado en el aumento de la presencia de los transportadores GLUT4 en la superficie de miotubos de rata neonata y mioblastos L6GLUT4*myc*. Sin embargo, este tipo de ensayo de translocación no permite discriminar si el aumento de marca en la membrana de la célula para el epítipo *myc* pueda estar influenciado por una disminución de la endocitosis del transportador.

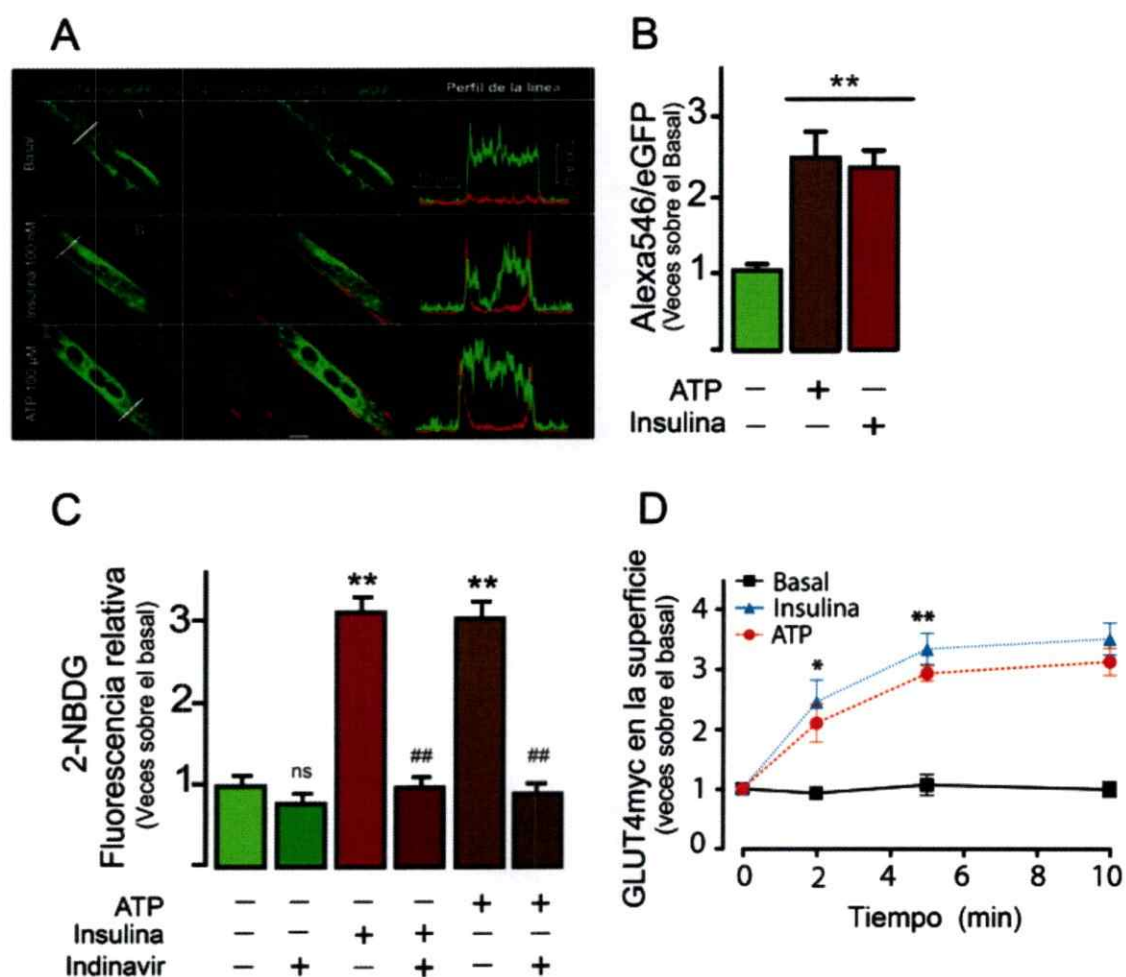


Figura 5 ATP exógeno aumenta el transporte de glucosa 2-NBDG a través de la translocación GLUT4 a la superficie celular.

Miotubos de rata neonata se transfecaron transitoriamente con GLUT4myc-eGFP, por 24 h y fueron estimulados con ATP exógeno (100 μ M) o insulina (100 nM). La exposición extracelular del epítipo *myc* fue detectado por inmunofluorescencia en células no permeabilizadas como se describió en Materiales y Métodos. **A)** ATP exógeno indujo un aumento en la razón Alexa546:eGFP. En el panel de la izquierda se observa la expresión de la proteína GFP, en el segundo panel de la izquierda se muestra la detección del epítipo *myc*, el tercer panel muestra la superposición de ambas señales, eGFP y *myc*. El panel de la derecha muestra el perfil de las señales fluorescentes detectada del epítipo *myc* y GFP. **B)** Cuantificación del panel A. **C)** Los miotubos se preincubaron en medio Krebs-Ringer con o sin indinavir (100 μ M) 30 min previo y durante la estimulación, la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por ATP exógeno e insulina fue bloqueada totalmente por indinavir. **D)** En mioblastos L6GLUT4myc, estimulados con ATP exógeno o insulina, durante 2 min, 5 min y 10 min. Se observó un aumento en la translocación de GLUT4myc a la superficie celular, para ambos estímulos a partir de los 5 min. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$ respecto del basal (no estimulado) ## $p < 0,001$ respecto a la condición estimulado en ausencia del inhibidor. El análisis estadístico se realizó con la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA). Datos de 4 experimentos independientes.

9.5 Determinación de la dinámica de transportadores GLUT4 en células L6GLUT4myc estimuladas con ATP exógeno.

El aumento de GLUT4 en la superficie celular puede ser el resultado de un incremento de la exocitosis y/o una disminución de la endocitosis. Para determinar cuál de los procesos “prima” en el incremento de GLUT4 en la superficie mostrado, en la Figura 5, se cotransfectaron transitoriamente miotubos de rata con dos plasmidios que codifican para GLUT4myc-eGFP y la cadena liviana de la toxina Tetánica (TeTx) respectivamente. Esta toxina induce la proteólisis de la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP-2), proteína V-SNARE que media el anclaje y la fusión de vesículas que almacenan GLUT4 sensibles a insulina (GSV) con la membrana plasmática (Randhawa y col., 2004; Randhawa y col., 2008). En condiciones basales (sin estímulo), la presencia de GLUT4myc en la superficie celular fue prácticamente indetectable y la distribución intracelular de GSV fue difusa, formando agrupamientos en la región perinuclear de los miotubos (Fig. 6A). La cuantificación para cada condición ensayada se muestra en la Figura 6B. ATP exógeno indujo un claro aumento de la señal del epítipo *myc* en la superficie celular, esta respuesta fue claramente atenuada en miotubos que expresan TeTx (Fig. 6A).

La velocidad de endocitosis de GLUT4myc fue determinada en células L6GLUT4myc, modelo bien caracterizado para este tipo de determinaciones, ya que, se requiere de un gran número de células que expresen homogéneamente GLUT4myc (Wang y col., 1998). ATP causó una pequeña reducción de la endocitosis de GLUT4myc, en comparación con células estimuladas con

insulina o células no tratadas (control) (Fig. 6C). La velocidad de exocitosis fue determinada después de permitir que los transportadores GLUT4*myc* presentes en la superficie celular marcados con un anticuerpo anti-*myc* fueran internalizados y se equilibraran con los pools intracelulares de GLUT4. La estimulación con ATP exógeno causó un incremento significativo en la translocación de GLUT4*myc* a la superficie celular a partir de los 2 min, con una cinética similar a la inducida por insulina (Fig. 6D), adicionalmente se produjo una disminución en la velocidad de endocitosis en los primeros 5 min (Fig. 6C). Estos resultados sugieren que ATP exógeno induce un aumento de GLUT4*myc* en la superficie celular, a través de mecanismos de exocitosis y una discreta pero significativa disminución de la endocitosis a tiempos cortos (Fig. 6C). En la ruta exocítica parece estar implicada GSV que depende de VAMP-2 y su regulación sería altamente parecida a la regulación de GSV por insulina.

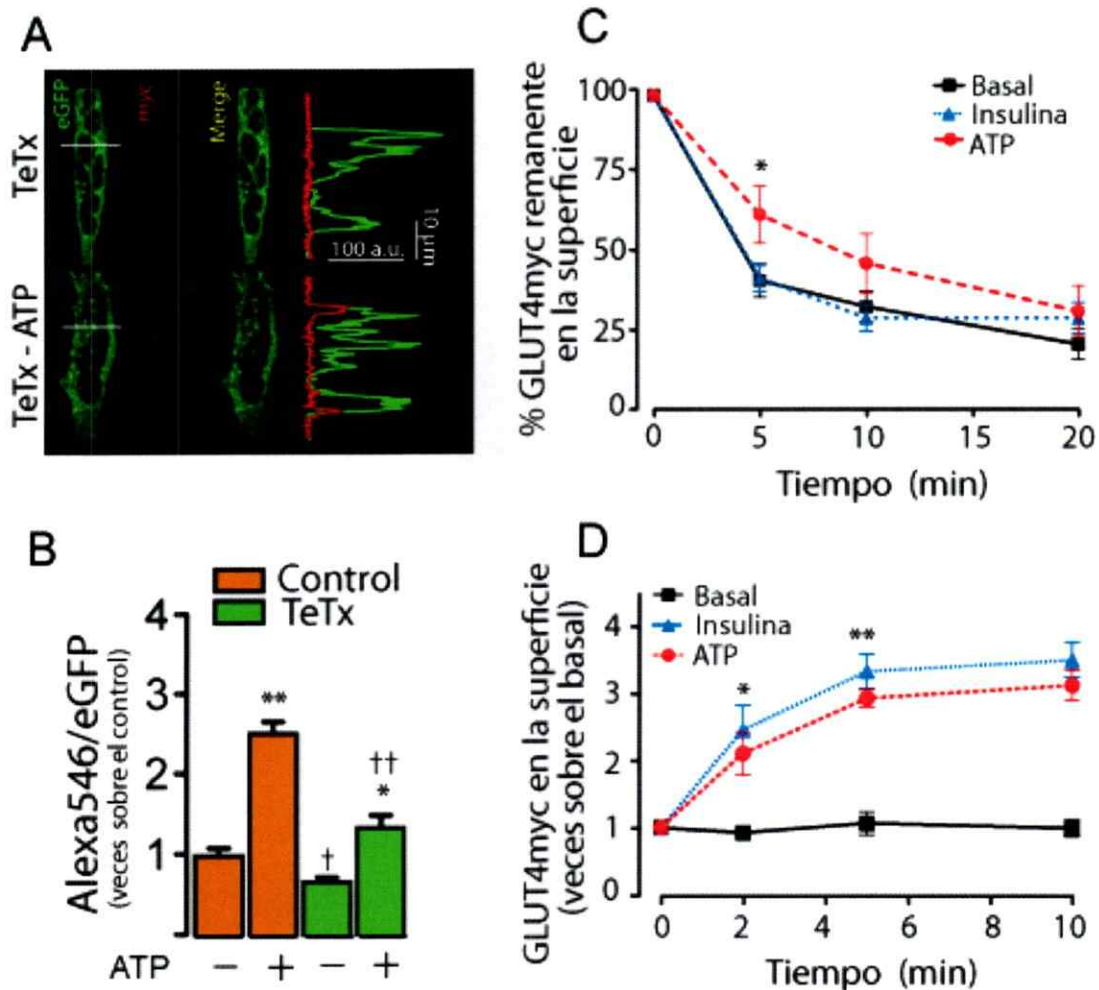


Figura 6. La exposición exofacial de epítipo *myc* dependiente de ATP exógeno requiere de VAMP-2 en miotubos y la inhibición de la endocitosis en mioblastos L6GLUT4myc.

Miotubos de rata se cotransfectaron transitoriamente con GLUT4myc-eGFP y TeTx por 24 h y estimulados con ATP (100 μ M) durante 10 min. El efecto de la cadena liviana de la toxina tetánica en la exposición exofacial del epítipo *myc* dependiente de ATP en célula única es mostrado en **A**) y cuantificado en **B**). **C**) Mioblastos L6GLUT4myc, se estimularon con ATP o insulina, induciendo la translocación de los transportadores a la superficie celular, los transportadores GLUT4myc fueron marcados con un anticuerpo anti-*myc* y a través del calentamiento a 37°C durante 5, 10 y 20 min en presencia o ausencia de ATP o insulina, se estimularon a internalizarse. La cantidad de GLUT4myc remanente en la superficie celular a cualquier tiempo después del recalentamiento fue determinado usando el ensayo de absorbancia OPD y los valores se expresaron como porcentaje respecto del nivel de GLUT4myc en la superficie celular a tiempo 0. **D**) Mioblastos L6GLUT4myc se estimularon con 100 nM de insulina por 10 min y enfriados a 4°C. GLUT4myc en la superficie fue marcado con anticuerpo anti-*myc*. Las células fueron incubadas a 37°C durante 2 h en ausencia de estímulo, para inducir la internalización. Posteriormente, las células fueron estimuladas con ATP o insulina durante 2, 5 y 10 min. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto del basal (no estimulado) †† $p < 0,001$; † $p < 0,01$ respecto a la condición control (miotubos no transfectados). Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.

9.6 Estimulación eléctrica tetánica induce aumento en la fosforilación de Akt.

Una vez determinado que la estimulación eléctrica tetánica induce liberación de ATP al medio extracelular aumentando la incorporación de 2-NBDG en miotubos de rata (Fig. 3), se evaluó el mecanismo de señalización intracelular a través del cual el estímulo eléctrico podría promover la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en los miotubos. En la literatura se han descrito dos vías de señalización intracelular como las responsables de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática: estas vías de señalización son PI3-K/Akt y la vía CaMKII/AMPK. Reportes previos en relación a que el estímulo eléctrico induce la fosforilación de la proteína Akt, han sido controversiales (Soos y col., 2001; Vanhaesebroeck y col., 2001; Yano y col., 2011). Por otra parte, el transporte de glucosa inducido por estimulación eléctrica se ha relacionado con la activación de AMPK (Treebak y col., 2010). Para evaluar la posible vía de señalización intracelular involucrada en el aumento de la incorporación de 2-NBDG inducida por estímulo eléctrico tetánico, miotubos de rata neonata se estimularon con 400 pulsos, 45 Hz. 1 ms duración, para determinar mediante *Western blot* el estado de fosforilación de la proteína Akt en el residuo Ser473 (Fig. 7A). La estimulación eléctrica induce un aumento transitorio en la fosforilación de Akt en Ser473, alcanzando un máximo de fosforilación entre los 15 y 30 min posteriores al estímulo. Como se mostró en la Figura 3A, la estimulación eléctrica tetánica indujo liberación de ATP al medio extracelular. Por esta razón se estimularon miotubos de rata en presencia de

suramina (100 μM), para determinar la posible participación del ATP liberado al medio extracelular en el aumento de la fosforilación de Akt en Ser473. Como se observa en la Figura 7B, suramina bloquea completamente el aumento de la fosforilación de Akt en Ser473 inducido por estimulación eléctrica, sin afectar los niveles basales de la fosforilación de la proteína. A partir de este resultado que involucra a los receptores purinérgicos en el aumento de fosforilación de Akt en Ser473, se decidió estimular con ATP exógeno (100 μM) y determinar los niveles de fosforilación de Akt en Ser473 inducidos por este estímulo. Se observó un aumento transitorio en la fosforilación de Akt Ser473 entre los 15 y 30 min, retornando a niveles basales a los 60 min post estimulación (Fig. 7C).

Cómo se mostró en la Figura 5D, ATP exógeno aumentó la translocación del transportador GLUT4 myc a la membrana plasmática en mioblastos L6GLUT4 myc . Se decidió entonces evaluar la vía de señalización intracelular involucrada en este modelo celular. Para ello se evaluó la fosforilación de Akt en los residuos Thr308 y Ser473, sitios que han sido descritos ser necesarios para la activación de esta quinasa. ATP exógeno (100 μM), aumentó la fosforilación de ambos residuos (Fig. 7D), como control positivo se utilizó insulina (100 nM) observándose un aumento en la fosforilación de Akt en ambos residuos, tal como era esperado.

Para la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática se requiere la activación de Akt, proteína que ha sido considerada clave en la señalización para insulina y transporte de glucosa, tanto en músculo como en tejido adiposo. Como se señaló previamente, uno de los blancos río abajo de Akt es la proteína

AS160, proteína Rab-GAP que es fosforilada en múltiples sitios, disminuyendo su actividad GAP, permitiendo finalmente la translocación de los transportadores GLUT4 a la membrana celular. En células musculares L6 que sobreexpresan la proteína AS160 humana, se realizaron experimentos de translocación de GLUT4 a la membrana inducido por ATP exógeno (Fig. S3, anexo) y se estudió la fosforilación de AS160 en varios epítomos regulados por insulina. Entre ellos, se analizaron los fosfoepítomos de Ser318, Ser341, Ser570, Ser588, Thr642 y Thr751. En todos estos residuos el ATP exógeno aumentó la fosforilación de manera similar a insulina (Fig, 7D).

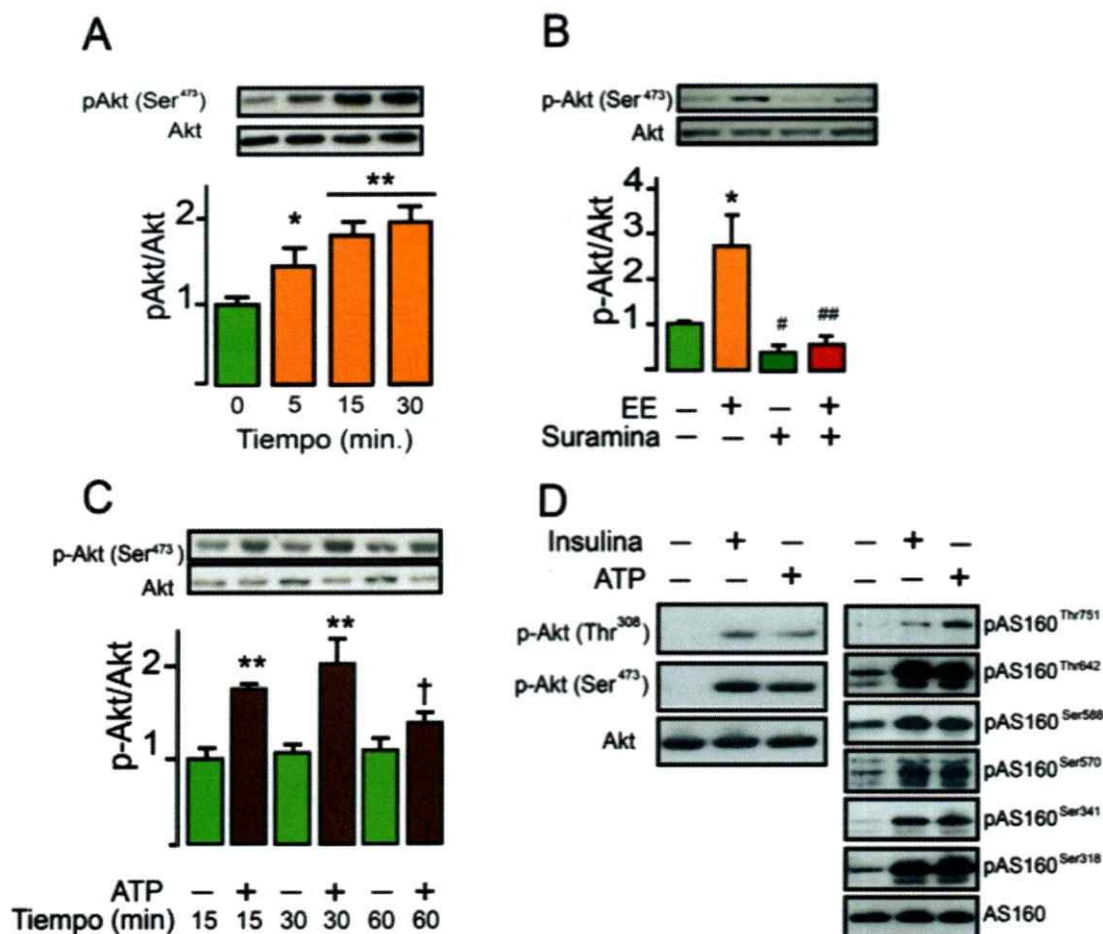


Figura 7. Fosforilación de Akt y AS160 por estimulación eléctrica tetánica y ATP exógeno en miotubos y células L6GLUT4myc-hAS160.

Miotubos de rata neonata se estimularon eléctricamente, células L6 GLUT4myc-hAS160 y miotubos se estimularon con ATP exógeno durante 5 min. La detección de la fosforilación de Akt en residuos Thr 308 y Ser 473 y de las formas fosforiladas de AS160 en los epítomos señalados se realizó mediante *Western blot* desde extractos proteicos totales usando anticuerpos dirigidos contra las formas fosforiladas de Akt y AS160. La fosforilación de Akt y AS160 se normalizaron respecto a sus proteínas totales. Los análisis densitométricos indican la razón de la forma fosforilada/proteína total. **A)** Estimulo eléctrico y **C)** ATP exógeno aumentan transitoriamente la fosforilación de Akt en Ser 473 en miotubos de rata. **B)** Los miotubos fueron preincubados en medio Krebs-Ringer con o sin suramina (100 μ M) 30 min previo y durante la estimulación, la fosforilación de Akt en Ser473 fue abolida para la estimulación eléctrica. **D)** La fosforilación de Akt en Thr308 y Ser473; la fosforilación de AS160 en residuos Thr751; Thr642, Ser588, Ser570, Ser341 y Ser318 se indujo en mioblastos L6GLUT4myc-hAS160 tanto por ATP exógeno como por insulina. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto del basal (no estimulado), † $p < 0.01$ respecto a EE 30 min. Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos representativos de 3 experimentos independientes.

9.7 ATP exógeno requiere la activación de la vía PI3-K γ /Akt, para la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática.

En el músculo esquelético, la expresión de GLUT1 está normalmente vinculada a la incorporación basal de glucosa y GLUT4 se asocia a la captación de glucosa inducida por insulina y la contracción muscular en células musculares L6 (Konrad y col., 2005). Como se mostró en las Figuras 5A y 5D, el ATP exógeno estimuló la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, tanto en miotubos como en células L6GLUT myc . Por otra parte, ATP exógeno aumentó la fosforilación de Akt en Thr308, Ser473 y de AS160 en diferentes epítomos lo que sugiere que ATP podría inducir la incorporación de glucosa en forma dependiente de la vía de señalización PI3-K/Akt en miotubos de rata y en células L6. Para corroborar esto, los miotubos se pre-trataron con LY294002 (10 μ M), inhibidor general de las PI3-K de clase I, II y III, el inhibidor VIII de Akt (10 μ M) inhibidor selectivo de Akt 1/2, ambos inhibidores se agregaron 30 min previo y durante la estimulación con ATP exógeno. La inhibición de PI3-K, mediante LY294002 no bloqueó completamente la captación de 2-NBDG inducida por ATP exógeno, pero si bloqueó el transporte de glucosa inducido por insulina (Fig. 8A), dato que sugiere la participación de más de una vía de señalización en el aumento del transporte de glucosa 2-NBDG inducido por ATP exógeno. Por otra parte el uso del inhibidor VIII de Akt (10 μ M) bloqueó completamente el aumento de la incorporación de glucosa 2-NBDG inducido

tanto por ATP exógeno como por insulina (Fig. 8B), sugiriendo que Akt juega un papel clave en la señalización involucrada en el transporte de glucosa inducido por ambos estímulos; ATP exógeno e insulina. El resultado de la Figura 8A sugiere que probablemente el tipo de PI3-K involucrada en la activación de Akt sea distinta para cada estímulo. Con estos antecedentes, se decidió utilizar un nuevo inhibidor, AS605240 (40 nM) que tiene una selectividad mayor para la PI3-K γ , como se muestra en la Figura 8F, este inhibidor si bloqueó completamente el transporte de glucosa mediado por ATP exógeno, sin embargo, para insulina la inhibición en el transporte de glucosa fue sólo de un 30%.

Con estos resultados y considerando que parte de la acción de inhibidores farmacológicos puede ser inespecífica, decidimos analizar mediante *Western blot* el efecto de estos inhibidores sobre la señalización, tanto para insulina, como ATP exógeno. Para ello utilizamos como marcador de la vía de señalización la proteína Akt, por ser el regulador clave en el transporte de glucosa para ambos estímulos (Fig. 8B), además su activación es dependiente de PI3-K. La fosforilación de Akt en Ser 473 inducida por ATP exógeno fue parcialmente inhibida en presencia de LY294002, (Fig. 8E), en cambio AS605240 redujo casi a niveles basales la fosforilación de Akt en Ser473 en miotubos estimulados con ATP exógeno (Fig. 8F). Como es sabido la señalización a través de receptores P2, específicamente a través de P2Y, ocurre a través de diversas vías entre las cuales se han descrito PLC/IP₃,

Ca^{2+} /PKC y PI3-K γ . La participación de PI3-K γ en la translocación de GLUT4 y el aumento en la incorporación de glucosa 2-NBDG nos llevó a investigar la participación de los activadores de esta quinasa, las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G triméricas. La sobreexpresión de β ark-ct (inhibidor de las subunidades $\beta\gamma$) abolió parcialmente el transporte de glucosa 2-NBDG dependiente de ATP exógeno (Fig. 8C). Estos resultados sugieren que la vía PI3-K γ /Akt, es necesaria para el aumento del transporte de glucosa mediado por ATP exógeno en miotubos de rata.

Tal como fue mostrado en la Figura 8B, existe una importante participación de Akt en el transporte de glucosa 2-NBDG dependiente de ATP exógeno, sin embargo, la aproximación utilizada para evaluar la participación de Akt fue de carácter farmacológico. Por ello, para visualizar la exposición de GLUT4 en la membrana plasmática en respuesta a ATP exógeno en miotubos de rata, se realizó la transfección transitoria de un DNAc que codifica una eGFP GLUT4myc quimérica. Para corroborar (molecularmente), la participación de la vía PI3-K γ /Akt en la translocación de GLUT4 hacia la membrana de la célula muscular, se co-transfectaron miotubos de rata con plasmidios que expresan isoformas de Akt dominante negativa (Akt DN) o constitutivamente activas (Akt CA), en conjunto con eGFP-GLUT4myc. Utilizando cortes de microscopía confocal, en el estado basal, los miotubos mostraron baja señal de exposición del epítipo *myc* en la superficie celular. En comparación, en miotubos estimulados con ATP exógeno se observó un aumento en la exposición

extracelular del epítipo *myc* similar a la provocada por insulina. La co-transfección con el dominante negativo de Akt (Akt-DN) redujo este aumento en la exposición exofacial de *myc* epítipo inducida por ATP, sin afectar los niveles de exposición superficiales basales de GLUT4*myc*-EGFP (Fig. 10A). Para cuantificar el efecto de ATP, se recogieron imágenes de cortes confocales en el eje z, y los resultados se expresaron como la relación de la fluorescencia en la superficie marcada con GLUT4*myc* (rojo, Alexa 546) respecto de la fluorescencia total expresado GLUT4 (verde GFP). La exposición a ATP generó un aumento de la relación *myc*: eGFP de $2,50 \pm 0,3$ en relación con las células no estimuladas (Fig. 10A), mientras que en los miotubos co-transfectados con Akt-DN la relación basal *myc*: eGFP fue de $0,82 \pm 0,06$ y el ATP exógeno elevó este valor sólo a $1,48 \pm 0,15$ veces por encima del control basal (Fig. 10A). Por otro lado, la co-transfección de una isoforma miristoilada de Akt (Akt-CA) indujo una intensidad máxima de la fluorescencia en miotubos no estimulados. En los miotubos estimulados con ATP exógeno no se observó un aumento adicional del epítipo *myc* en la superficie celular indicando que la respuesta alcanzó un máximo (Fig. 10B). Para evaluar más a fondo la participación de Akt en la estimulación de la captación de glucosa dependiente de ATP, miotubos fueron transducidos con adenovirus que codifica una forma dominante negativa de Akt (AdAkt-DN, MOI 5000. La isoforma es inactiva y su sobreexpresión interfiere con la actividad de Akt silvestre). Como control positivo se usó una forma constitutivamente activa, miristoilada de Akt (AdAkt-*myr*, MOI 5000). El vector vacío se usó como un control de transducción (Ad-

vacío, MOI 5000, isoforma que corresponde a la secuencia del vector adenoviral). La captación de 2-NBDG dependiente de ATP, en miotubos transducidos con Ad-vacío fue similar a la incorporación de 2-NBDG dependiente de ATP en miotubos no transducidos. En contraste, miotubos infectados con AdAkt-DN exhibieron una disminución significativa en la respuesta frente a ATP. La sobreexpresión de Akt miristoilada en miotubos aumentó 7 veces la incorporación basal de 2-NBDG respecto de los miotubos control no transducidos, además el ATP exógeno tuvo un efecto estimulante similar al de insulina sobre el transporte de 2-NBDG (Fig. 9). Estos resultados sugieren que el ATP exógeno induce la translocación del GLUT4 a la superficie celular por un mecanismo que induce la activación de Akt.

Al inhibir farmacológicamente la enzima PI3-K γ con el inhibidor AS605240, se observó una disminución en la incorporación de 2-NBDG inducido por ATP exógeno (Fig. 8D), por lo tanto se decidió evaluar mediante herramientas moleculares, la participación de PI3-K γ en la translocación de GLUT4. Para ello se cotransfectaron miotubos con GLUT4 myc -eGFP con diferentes plasmidios que expresan distintas isoformas mutadas de PI3-K γ : la isoforma PI3-K γ silvestre (PI3K γ -WT), la isoforma PI3-K γ con dominio de actividad kinasa inactivo (PI3K γ -KD) y una isoforma de PI3K γ constitutivamente activa (PI3K γ -*myr*). Como se observa en la Figura 11A, los miotubos transfectados con la isoforma silvestre de PI3-K γ se comportaron de manera similar a las células control. Sin embargo, en los miotubos transfectadas con el

plasmidio se observó un aumento de la translocación de GLUT4 a la superficie celular, tanto en condiciones basales como estimuladas con ATP exógeno, presumiblemente por el aumento de la masa de PI3-K γ en los miotubos transfectados. En miotubos transfectados con el plasmidio PI3-K γ -KD (Fig. 11B), se observó una disminución significativa, en la translocación de GLUT4 a la superficie celular en miotubos estimulados con ATP exógeno. Finalmente en miotubos cotransfectados con PI₃K γ -*myr* (constitutivamente activa) (Fig. 11C) se observó un aumento considerable en la translocación del GLUT4 a la superficie celular tanto en miotubos en condiciones basales (no estimuladas) como estimulados con ATP exógeno, en comparación a las condiciones control (transfectados sólo con eGFP GLUT4).

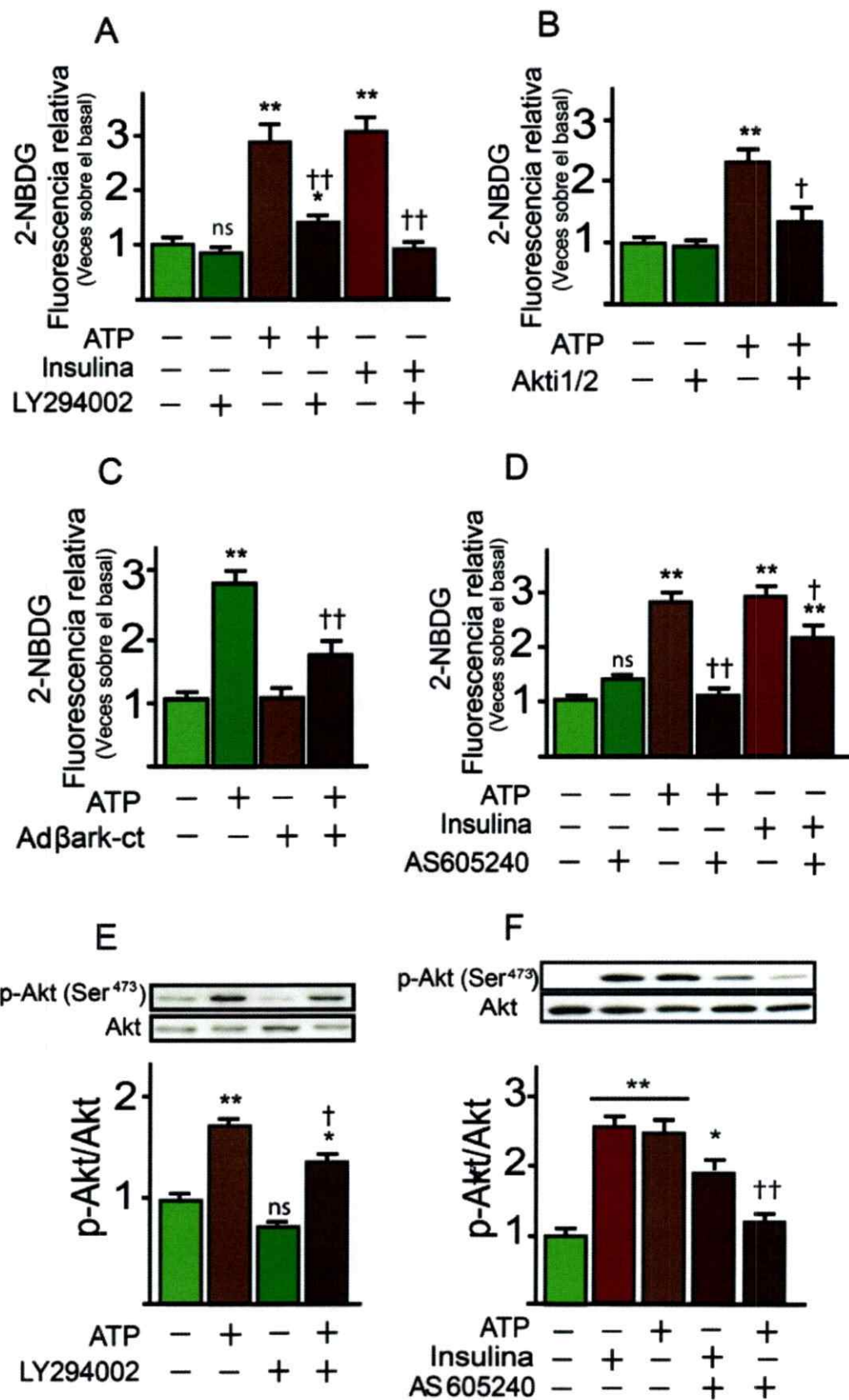


Figura 8. La incorporación de glucosa inducida por ATP exógeno es dependiente de la vía de señalización PI3-K/Akt.

En miotubos estimulados con ATP exógeno (100 μ M) o insulina (100 nM), todos los inhibidores se incubaron 30 min previo y durante el estímulo. **A)** Cuantificación del transporte de glucosa 2-NBDG inducido por ATP exógeno en presencia o ausencia del inhibidor general de las PI3-K, LY294002 (40 μ M). El inhibidor bloqueó completamente el transporte de glucosa 2-NBDG inducido por insulina, en cambio en miotubos estimulados con ATP exógeno el efecto del inhibidor es parcial. **B)** Cuantificación del transporte de glucosa 2-NBDG inducido por ATP exógeno, en presencia o ausencia del inhibidor VIII de Akt (10 μ M), se observa que el transporte de 2-NBDG dependiente de ATP es completamente bloqueado. **C)** En miotubos transducidos con Ad β ark-ct (MOI 5000) por 48 h estimulados con ATP exógeno se observa una disminución del transporte de glucosa 2-NBDG. **D)** En miotubos incubados con AS605240 (40 nM), inhibidor de PI3-K γ , se observa una inhibición total del transporte de glucosa. **E)** y **F)** La fosforilación de Akt en Ser473 se detectó mediante *Western blot*. Se observa que LY294002 inhibe parcialmente la fosforilación de Akt en Ser473 inducida por ATP exógeno, en cambio AS605240 inhibe cerca del 80% de la fosforilación de Akt en Ser473 inducido por ATP exógeno, respectivamente. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto del basal (no estimulado), † $p < 0,01$; †† $p < 0,001$ respecto su control estimulado en ausencia del inhibidor, ns no significativo. Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.

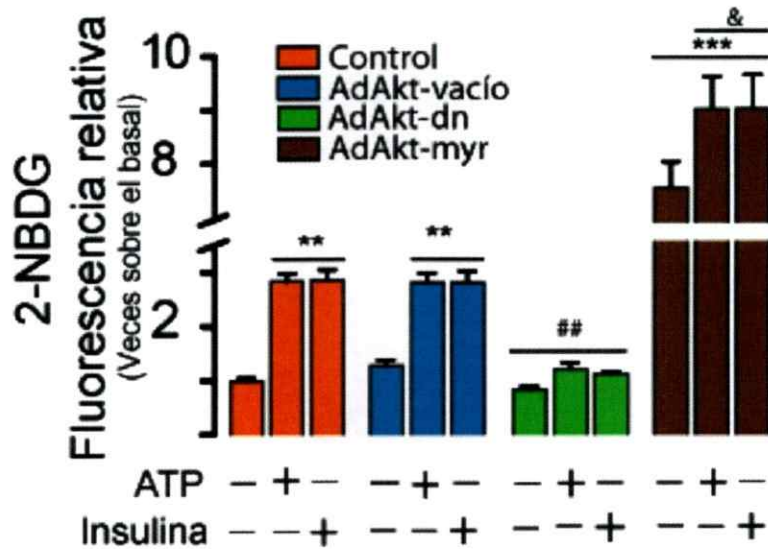


Figura 9 La incorporación de glucosa inducida por ATP exógeno es dependiente de la señalización Akt.

Miotubos de rata neonata transducidos con adenovirus que expresan distintas isoformas de Akt (MOI 5000), fueron tratados con insulina (100 nM) o ATP exógeno (100 μ M). La incorporación de glucosa 2-NBDG se realizó como se señaló en Materiales y Métodos. El transporte de glucosa 2-NBDG en condición control sin infección adenoviral (barras anaranjadas). Las barras azules muestran la incorporación de glucosa 2-NBDG en células que infectadas con adenovirus vacío (AdAkt vacío) el transporte de glucosa 2-NBDG es similar al control (no transducido). La incorporación de glucosa 2-NBDG es completamente bloqueada en miotubos que expresan una isoforma dominante negativa de la proteína Akt (AdAkt DN), tanto en la condición control como estimuladas con ATP exógeno e insulina (barras verdes). En miotubos que sobreexpresan una isoforma miristoilada de Akt (AdAkt myr), con actividad constitutiva, se observa un aumento en la incorporación de glucosa 2-NBDG tanto en condiciones basales como estimuladas con ATP exógeno e insulina (barras café). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, *** $p < 0,0001$, ## $p < 0,001$ respecto al control (no transducido); ** $p < 0,001$, & $p < 0,01$ respecto del basal (no estimulado). Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.

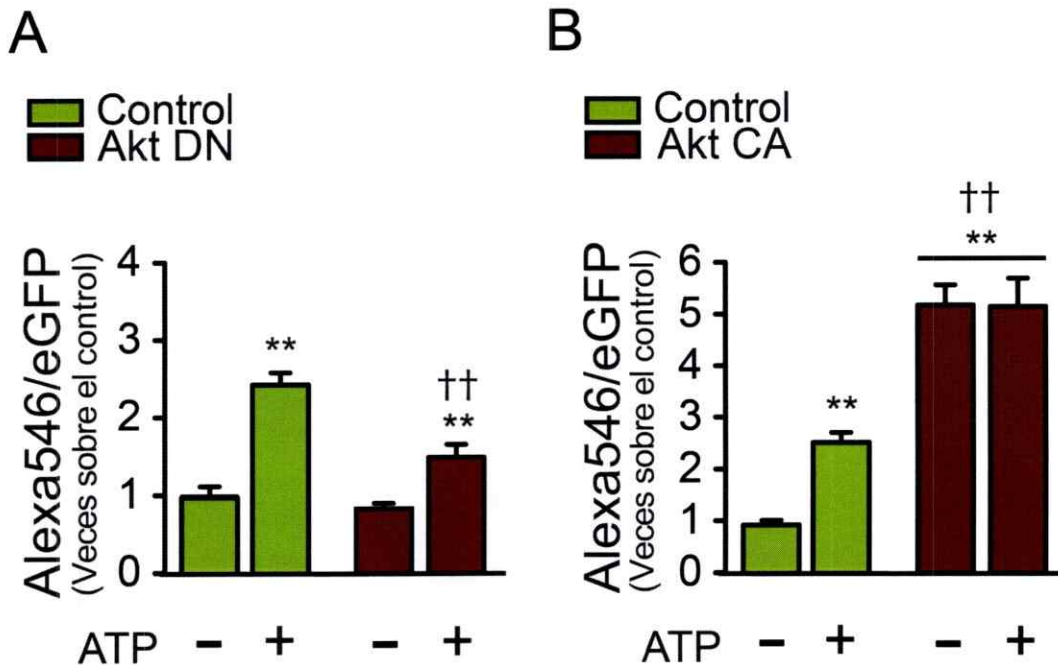


Figura 10 Participación de la vía de señalización PI3-K γ /Akt en la translocación del transportador GLUT4 a la superficie celular inducido por ATP exógeno.

Miotubos de rata cotransfectados transitoriamente con GLUT4 myc -eGFP y AktDN (dominante negativo de Akt) o Akt-CA (Akt constitutivamente activo) por 24 h y estimulados con ATP 100 (μ M). Se evaluó la localización del epítipo c - myc mediante inmunofluorescencia en células no permeabilizadas, como se describió en Materiales y Métodos. **A)** ATP exógeno indujo un incremento en la razón Alexa546:eGFP (barras celestes) esta razón fue reducida significativamente en miotubos cotransfectados con GLUT4 myc -eGFP y AktDN (barras café). **B)** En miotubos cotransfectados GLUT4 myc -eGFP y Akt constitutivamente activa (Akt CA) se observa un incremento significativo de la razón Alexa546:eGFP en condiciones basales como estimuladas con ATP exógeno (barras café). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$, respecto del basal (no estimulado); †† $p < 0,001$ respecto su control (no cotransfectado). Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.

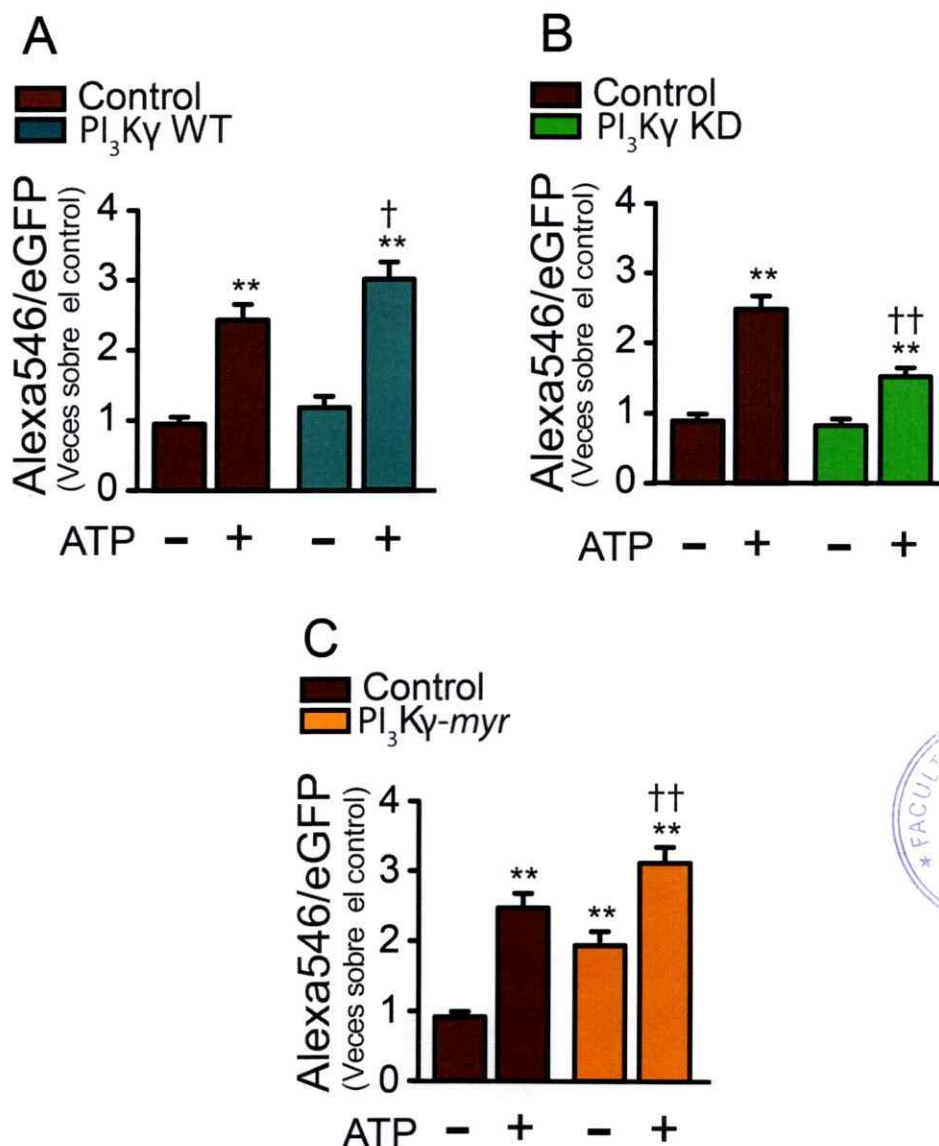


Figura 11 Participación de la vía de señalización PI3-K γ en la translocación del transportador GLUT4 a la superficie celular inducido por ATP exógeno.

Miotubos transitoriamente cotransfectados con GLUT4 myc -eGFP y la isoforma silvestre de PI3 quinasa γ (PI3-K γ WT), isoforma dominante negativa de PI3 quinasa γ (PI3-K γ DN) o isoforma miristoilada de PI3 quinasa γ (PI3-K γ -myr) por 24 h y estimulados con ATP (100 μM). Se evaluó la localización del epítipo *c-myc* mediante inmunofluorescencia en células no permeabilizadas, como se describió en Materiales y Métodos. **A**) ATP exógeno indujo un incremento en la razón Alexa546:eGFP, tanto en el control como en miotubos cotransfectados con PI3-K γ WT, en esta condición la translocación de GLUT4 myc a la superficie fue mayor. **B**) En miotubos cotransfectados con GLUT4 myc -eGFP y PI3-K γ DN (barras verdes) se observa un reducción importante en la razón Alexa546:eGFP. **C**) En miotubos que expresan la isoforma constitutivamente activa de PI3-K (PI3-K γ -myr), se observa un incremento significativo de la razón Alexa546:eGFP en condiciones basales como estimuladas con ATP exógeno. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$, respecto del basal (no estimulado); † $p < 0,01$; †† $p < 0,001$ respecto su control (no co-transfectado). Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.

9.8 ATP exógeno tiene un efecto sinérgico con insulina sobre transporte de glucosa en miotubos de rata.

Considerando que ATP exógeno e insulina estimulan la translocación de GLUT4 a la superficie celular y el transporte de 2-NBDG a través de distintas isoformas de PI3-K, se evaluó la posibilidad de que el transporte de 2-NBDG pudiese ser aditivo. Para ello se utilizaron concentraciones de insulina y ATP subumbrales. La estimulación de miotubos con insulina 25 nM no induce un aumento en el transporte de 2-NBDG, similar respuesta se observó al utilizar una concentración de ATP exógeno de 10 μ M. Sin embargo, cuando se utilizó de manera conjunta insulina 25 nM y ATP 10 μ M, se observó un potenciamiento en el transporte de 2-NBDG (Fig. 12A). Como el transporte de 2-NBDG inducido tanto por ATP exógeno como insulina involucra la fosforilación de Akt, se estudió si la estimulación eléctrica tetánica, estímulo que induce liberación de ATP al medio extracelular, es capaz de aumentar la fosforilación de Akt en Ser473 en miotubos incubados con insulina (100 nM). Se observó un aumento de 7 veces en la fosforilación de Akt en Ser473, respecto a la condición basal, doblando la fosforilación inducida por estímulo eléctrico o insulina (100 nM) por separado (Fig. 12B).

Como es conocido, la señalización de insulina requiere la fosforilación de Akt en Thr308 y Ser473, evento clave para el aumento del transporte de glucosa mediado por esta hormona. Para el transporte de 2-NBDG inducido por estimulación eléctrica (Fig. 2) y ATP exógeno (Fig. 3B y 3C). Para determinar si el efecto de ATP exógeno es específico o es capaz de transactivar el receptor

de insulina, se ensayó la fosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina 1150/1151 como se muestra en la Figura 12C, tanto para ATP exógeno como para el estímulo canónico insulina. ATP no indujo la fosforilación del receptor de insulina en los residuos señalados, a diferencia de insulina (100 nM) que aumentó $2,5 \pm 0,35$, la fosforilación del receptor de insulina en los residuos tirosina 1150/1151.

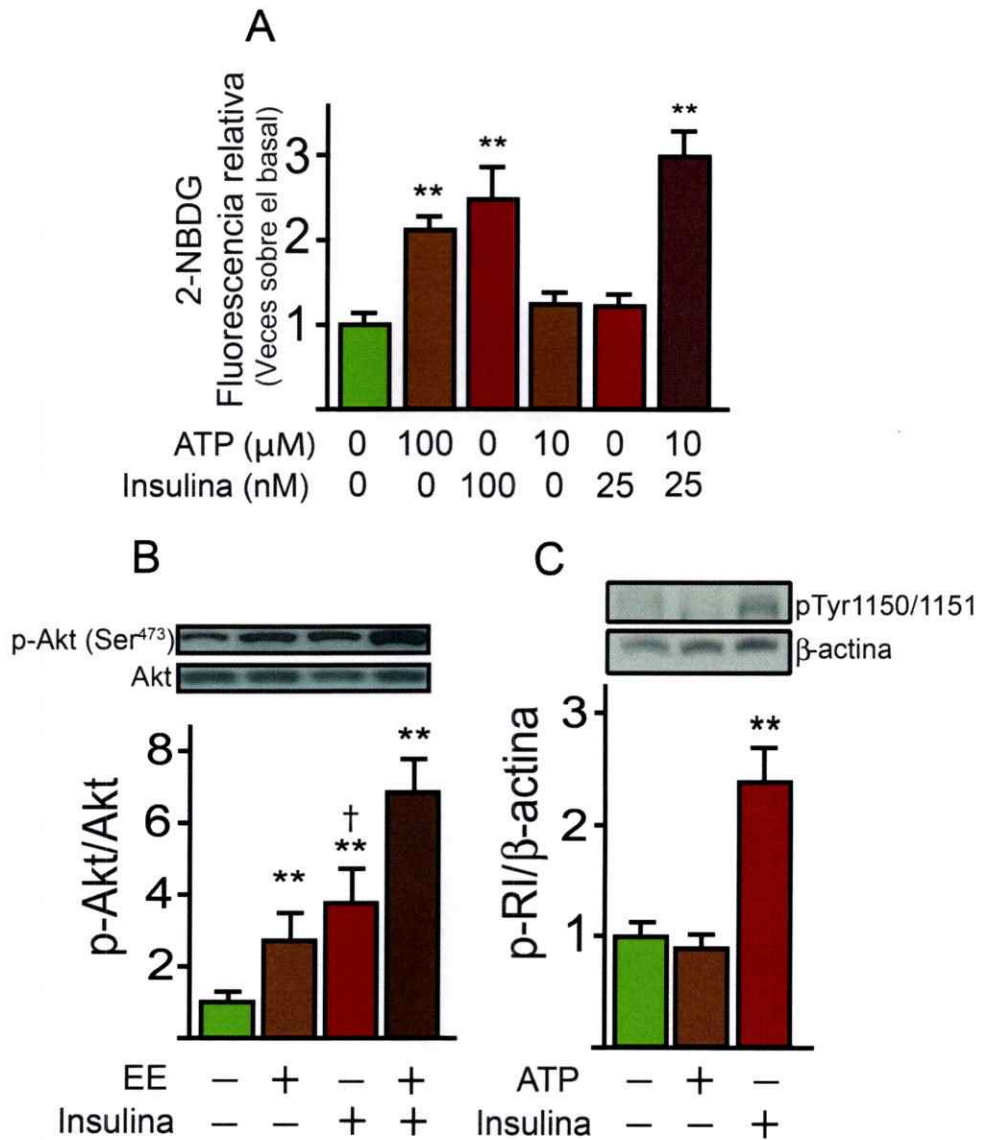


Figura 12 Efecto del ATP extracelular sobre transporte de glucosa en células musculares es sinérgico con insulina.

Miotubos de rata se estimularon con EE, ATP exógeno (100 μM) y/o insulina (100 nM). La incorporación de glucosa 2-NBDG fue determinado como se señaló en Materiales y Métodos **A)** ATP exógeno (10 μM) e insulina (25 nM) por separado no aumentaron el transporte de glucosa 2-NBDG, ambos estímulos juntos en las concentraciones señaladas producen un potenciamiento del transporte de glucosa 2-NBDG. Lisados celulares fueron separados en SDS-PAGE e incubados con pTyr1150/1151 para el receptor de insulina (1:500), β-actina (1:10000), p-Akt y Akt total (1:1000) **B)** Western blot representativo muestra una sumación en la fosforilación de Akt en Ser473 en miotubos estimulados con EE e insulina (100nM). **C)** Western blot representativo, muestra que ATP exógeno no fue capaz de la fosforilar el receptor para insulina en residuos de Tirosina 1150 y 1151. Los análisis densitométricos indican la razón de la forma fosforilada/proteína total. Los valores representan el promedio ± desviación estándar. ** $p < 0,001$ v/s control (no estimulado), †† $p < 0,001$ respecto a EE + Insulina. Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.

9.9 La señalización del ATP río abajo de Akt se dirige hacia AS160 y Rab8A.

La respuesta clásica a insulina en células musculares y adipocitos es el aumento de la fosforilación de los complejos proteicos Akt/AS160, permitiendo la activación de sus blancos río abajo, que implica una serie de proteínas GTPasas de la familia Rab que promueven la translocación de GLUT4 a la membrana celular. En células musculares L6, las Rabs activadas son Rab8A y Rab13 (Sun y col., 2010), y en adipocitos 3T3-L1 Rab10 es la Rab más importante para este proceso (Gonzalez y McGraw, 2006; Sano y col., 2008). En ambos modelos la participación de las proteínas Rabs es inducida por insulina. Como se ha mostrado en esta Tesis AS160 es fosforilada en respuesta a ATP exógeno en células musculares (Fig. 7D). Evaluamos entonces la posible participación de las principales proteínas Rabs blanco de AS160, en la translocación de GLUT4 a la membrana celular inducido por ATP exógeno. Estos experimentos fueron realizados en células musculares L6 que expresan de forma estable GLUT4 myc (L6GLUT4 myc) como se indicó en Materiales y Métodos.

En estas células, ATP induce la exposición exofacial del epítipo myc de manera significativa a los 5 min, alcanzando niveles similares a los inducidos por insulina (Fig. 5D). Para determinar la participación de Rabs en la translocación de GLUT4 myc a la membrana celular, se realizó un knockdown de Rab8A y Rab10. Como se observa en la Figura 13A, la expresión de Rab8A y Rab10 en mioblastos L6GLUT4 myc fue significativamente reducida (más del

80% de la masa total de ambas proteínas) mediante la utilización de siRNA para cada una de las respectivas proteínas. El *knockdown* de Rab8A causó una inhibición significativa de la translocación de GLUT4*myc* a la superficie de los mioblastos, dependiente tanto de insulina como de ATP exógeno (Fig. 13B). Contrariamente, el *knockdown* de Rab10 no tuvo ningún efecto sobre la translocación de GLUT4*myc* a la superficie de los mioblastos, dependiente tanto de insulina como de ATP exógeno (Fig. 13C). Este resultado sugiere la participación de Akt-AS160-Rab8A en el transporte de glucosa dependiente de ATP exógeno, de manera similar a insulina.

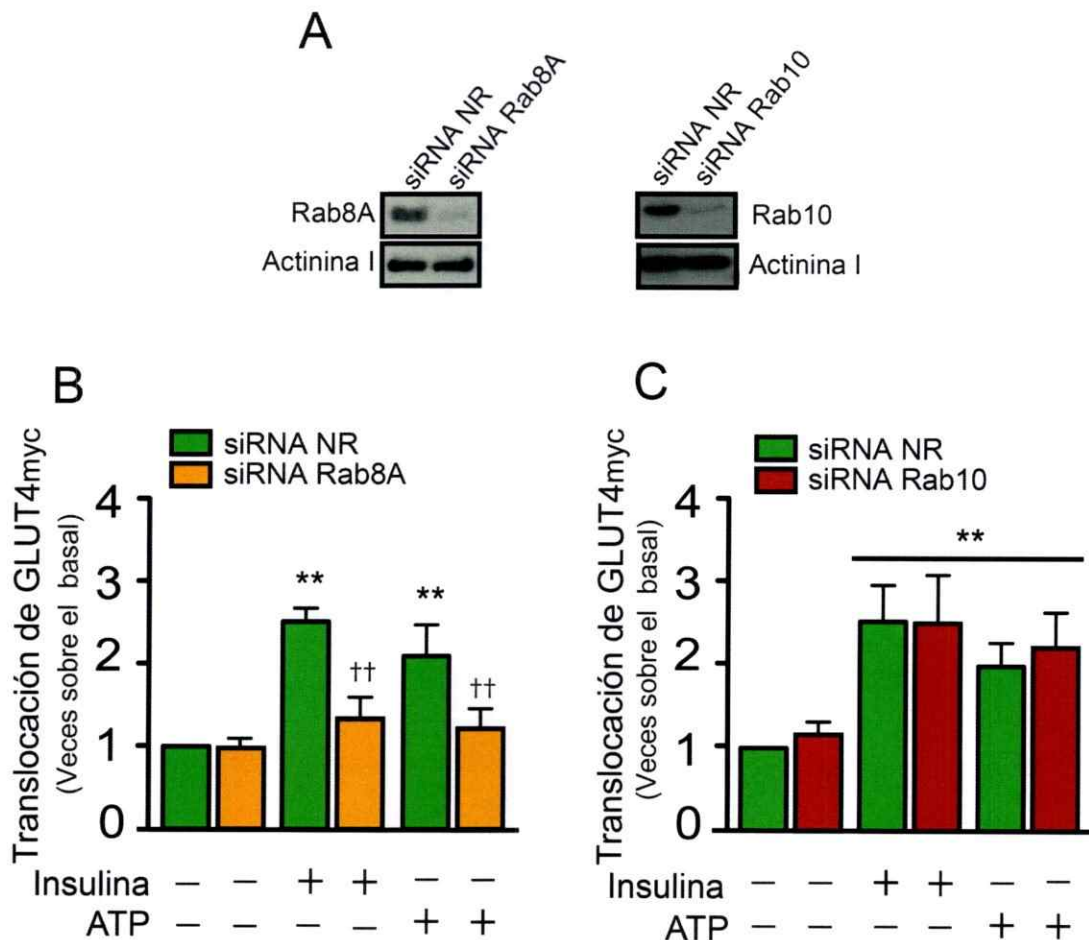


Figura 13 El transporte de glucosa 2-NBDG inducido por ATP exógeno es dependiente de la vía PI3-K/Akt/Rab8A en células musculares esqueléticas.

En mioblastos L6GLUT4myc **A)** Western blot representativo, para Rab 8A y Rab 10. Mioblastos L6-GLUT4 fueron transfectados con siRNA para Rab 8A, Rab 10 o siRNA no relacionado (NR), como se indicó en Material y Métodos. La exposición extracelular del epítipo *myc* fue detectado por ensayo OPD. **B)** El efecto del *knockdown* de Rab 8A sobre la exposición extracelular del epítipo *myc* fue cuantificado en mioblastos estimulados con ATP (100 μ M) ó de insulina (100 nM). **C)** El *knockdown* de Rab 10 no tuvo efecto en la exposición extracelular del epítipo *myc* en mioblastos estimulados con ATP exógeno e insulina. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar. ** $p < 0,001$ * $p < 0,01$ v/s control (no estimulado), †† $p < 0,01$ respecto a condición de estimulación con ATP exógeno o insulina (transfectados con siRNA no relacionado). Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 3 experimentos independientes.

9.10 El receptor para dihidropiridinas (DHPR) juega un papel clave en el transporte de glucosa 2-NBDG, inducido por estimulación eléctrica.

El receptor de dihidropiridinas (DHPR) juega un papel clave en el proceso de acoplamiento excitación-contracción (ECC) y ha sido involucrado en otros procesos moleculares, como la señal lenta de calcio; esta señal ha sido involucrada en cambios de expresión génica (Carrasco y col., 2003). Como se mostró en las Figuras 2 y 7B, el estímulo eléctrico aumentó tanto la incorporación de glucosa 2-NBDG como la fosforilación de Akt en Ser473, respectivamente, siendo el DHPR el sensor de voltaje, se decidió estimular eléctricamente miotubos de rata en presencia de Nifedipino (10 μ M), un bloqueador del DHPR. En la Figura 14A se observa que Nifedipino bloqueó completamente la fosforilación de Akt en Ser473 inducida por EE, proceso clave para inducir el transporte de glucosa 2-NBDG (Fig. 14B). En miotubos estimulados con ATP exógeno en presencia de esta droga sólo se observa una inhibición parcial del transporte de 2-NBDG en miotubos de rata (Fig. 14B).

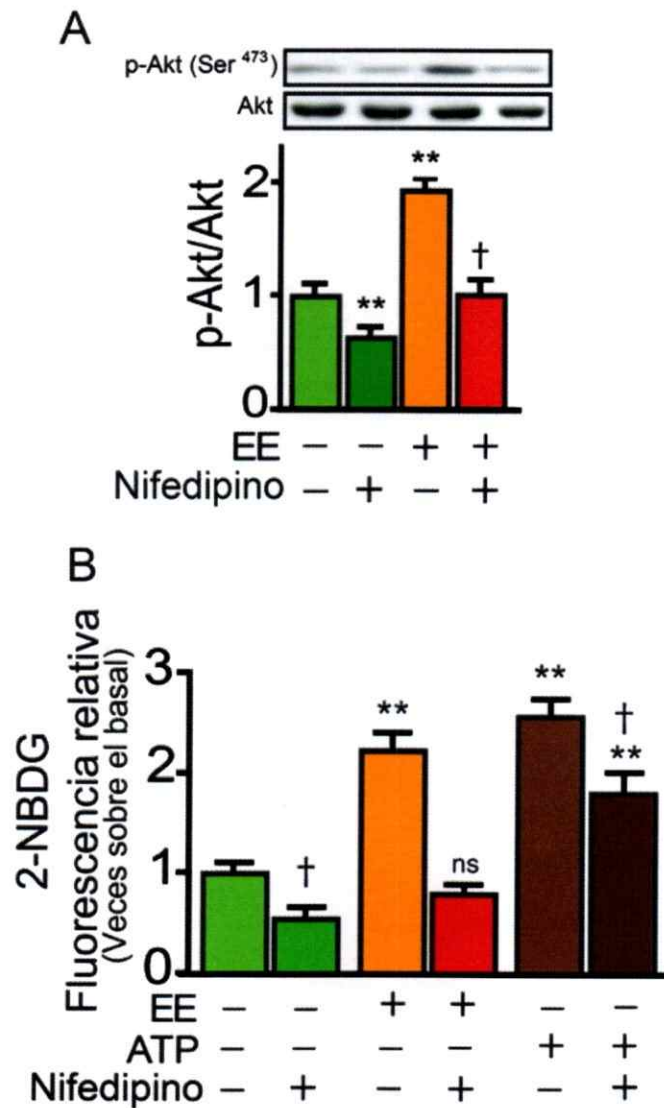


Figura 14. Papel del receptor de Dihidropiridinas en el transporte de glucosa inducido por estimulación eléctrica tetánica o ATP extracelular.

Los miotubos se estimularon eléctricamente o con ATP exógeno (100 μ M) en presencia o ausencia de Nifedipino (10 μ M). Lisados celulares fueron separados en SDS-PAGE e incubados con p-Akt y Akt total (1:1000), los análisis densitométricos indican la razón de la forma fosforilada/proteína total. **A)** Western blot representativo muestra un bloqueo en la fosforilación de Akt Ser473 en miotubos estimulados en presencia de Nifedipino. **B)** El transporte de glucosa 2-NBDG inducido por EE y ATP exógeno es bloqueado en miotubos estimulados electricamente en presencia de Nifedipino. En miotubos estimulados con ATP exógeno sólo se observa una inhibición parcial del transporte de glucosa. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar. ** $p < 0,001$; v/s control (no estimulado), † $p < 0,01$ respecto a condición estimulado con ATP exógeno. Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 3 experimentos independientes.

9.11 El transporte de glucosa dependiente de ATP ocurre a través de receptores purinérgicos P2Y, en miotubos.

Como se mencionó anteriormente existen dos subtipos de receptores purinérgicos (P2). Los ionotrópicos (P2X) y los metabotrópicos (P2Y). Como se demostró que la estimulación eléctrica induce liberación de ATP al medio extracelular, que regula el transporte de glucosa en miotubos de rata (Fig. 3A). Es razonable preguntar ¿Cuál de los 2 subtipos de receptores P2 está implicado en el transporte de glucosa en miotubos de rata? Para responder esta pregunta utilizamos algunos agonistas para los receptores P2Y como ADP y UTP. Ambos estimularon el transporte de glucosa 2-NBDG a niveles muy similares a los observados por estimulación con ATP exógeno. En la Figura 15A se muestra que UTP (100 μ M) aumentó ($2,35 \pm 0,15$) la incorporación de glucosa 2-NBDG en miotubos de rata alcanzando valores similares a los mostrados por ATP e insulina. En la Figura 15B, se observa que ADP aumenta el transporte de 2-NBDG de manera similar a ATP, sin embargo, en miotubos incubados con LY 294002 y estimuladas con ADP aún se mantiene un remanente en el transporte de 2-NBDG, probablemente por la acción de otra vía de señalización. Al comparar el transporte de 2-NBDG en miotubos estimulados con ATP exógeno, en un medio Krebs libre de calcio o con concentraciones fisiológicas de este no se observaron diferencias (Fig. 15C). Este resultado sugiere sólo la participación de receptores del tipo P2Y en el transporte de glucosa 2-NBDG y el transporte remanente observado en la Figura 15B podría estar relacionado con la activación de otra vía de señalización.

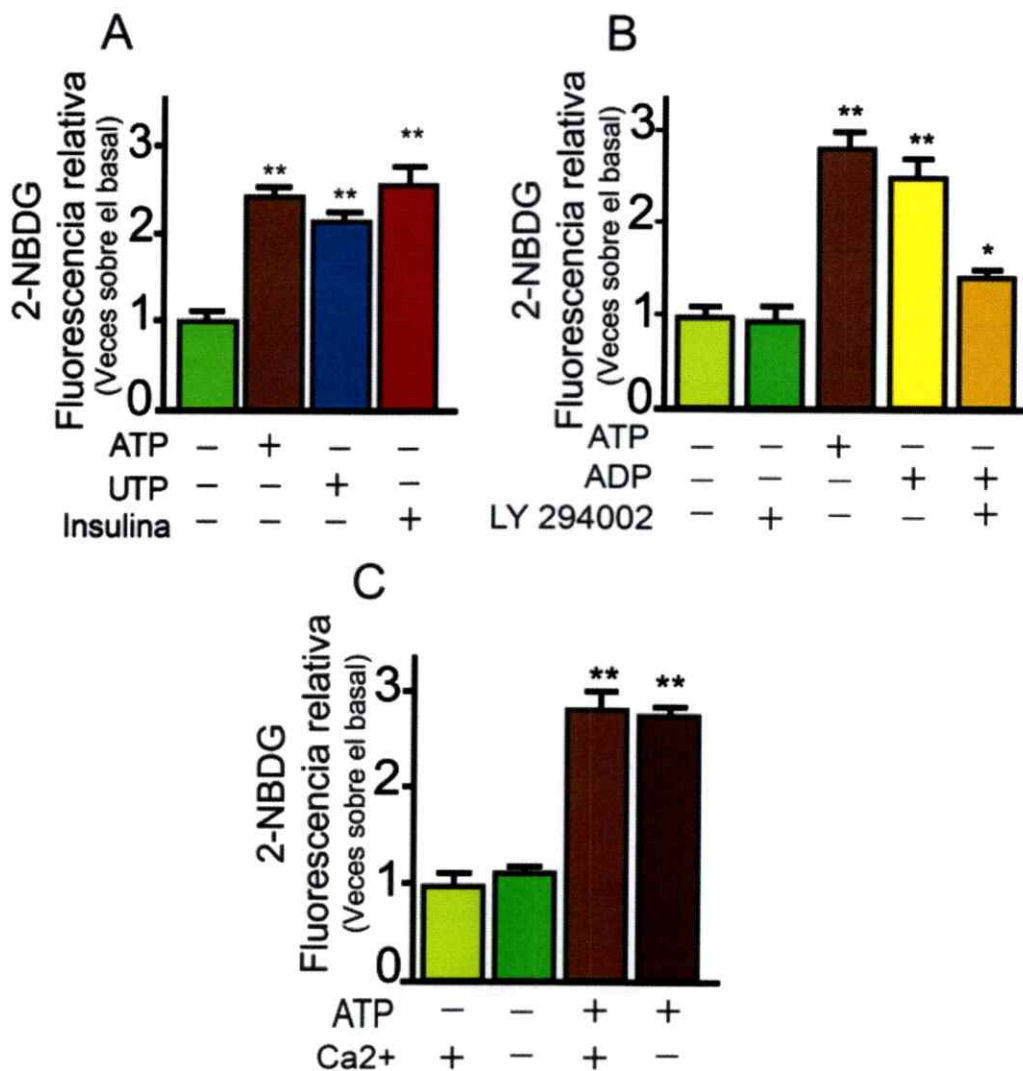


Figura 15. El transporte de glucosa 2-NBDG dependiente de ATP exógeno ocurre a través de receptores purinérgicos del subtipo P2Y.

En miotubos estimulados con ATP (100 μ M), ADP (100 μ M) o UTP (100 μ M), **A)** UTP aumenta el transporte de glucosa 2-NBDG de manera similar a ATP. **B)** ADP aumenta el transporte de glucosa 2-NBDG de manera similar a ATP, en miotubos incubados con LY 294002. Se observa inhibición parcial del transporte de glucosa 2-NBDG, para ambos estímulos. **C)** El transporte de glucosa 2-NBDG dependiente de ATP no varía en un medio libre de calcio externo. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar. ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ v/s control (no estimulado). Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 3 experimentos independientes.

9.12 El transporte de glucosa requiere parcialmente de la vía de señalización de IP3 en miotubos de rata.

Como se observó en la Figura 15B el transporte de 2-NBDG mediado por ATP exógeno, requiere de la activación de receptores P2Y. Sin embargo, al utilizar el inhibidor LY 294002 y estimular con ADP exógeno, no fue posible bloquear completamente el transporte de 2-NBDG, abriendo la posibilidad de que parte de la señalización por ATP exógeno ocurra de manera independiente de la vía P2Y-PI3-K γ /Akt y un posible candidato es la vía IP3. Para ello se estimularon miotubos con ATP exógeno (100 μ M) en presencia de U73122 (10 μ M) inhibidor de la enzima fosfolipasa C (PLC), se observó una inhibición parcial del transporte de 2-NBDG dependiente de ATP exógeno. En miotubos estimulados con insulina (100 nM), también se observa una inhibición parcial del transporte de glucosa 2-NBDG, de mayor cuantía en comparación a la inhibición observada para ATP exógeno (Fig. 16A). En la Figura 16B se muestra que Xestospongina B (10 μ M), antagonista de los receptores de IP3, produce una inhibición parcial del transporte de 2-NBDG dependiente tanto de ATP exógeno como de insulina.

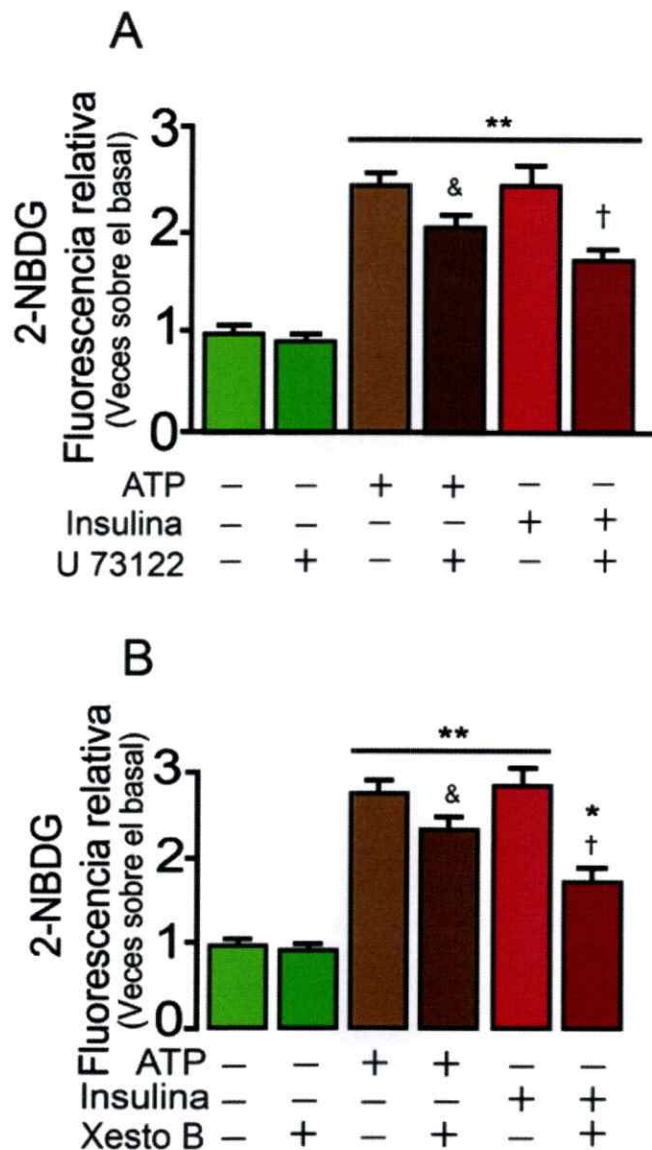


Figura 16. La vía de señalización de IP3 está involucrada en el transporte de glucosa inducido por ATP extracelular.

Células en cultivo primario de músculo esquelético de rata neonata, fueron estimuladas con ATP (100 μ M) o insulina (100 nM). La incorporación de glucosa 2-NBDG se determinó como se señaló en Materiales y Métodos. **A)** Los miotubos se preincubaron en medio Krebs-Ringer con o sin U73122 (10 μ M), la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por insulina fue parcialmente inhibida, fenómeno no observado en miotubos estimulados con ATP exógeno. **B)** Miotubos se preincubaron en medio Krebs-Ringer con o sin Xestospongina B (10 μ M) la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida ATP exógeno e insulina fue parcialmente bloqueada. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, El análisis estadístico fue realizado con la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por post-test de Bonferroni $**p < 0,001$ vs basal (no estimulado); $\dagger p < 0,01$ y $\& p < 0,05$ v/s condición estimulado con ATP. Datos de 4 experimentos independientes.

9.13 El transporte de glucosa (2-NBDG) dependiente de ATP exógeno es un mecanismo presente en fibras adultas.

Como se mostró en esta tesis, el ATP exógeno estimula el transporte de 2-NBDG en cultivo primario de músculo esquelético de rata. Modelo que ha sido bien caracterizado en el laboratorio, sin embargo, este modelo no necesariamente responde a los mecanismos que pueden operar en músculo esquelético adulto, por ello decidimos explorar si el transporte de 2-NBDG estimulado por ATP exógeno está presente en músculo adulto. Para ello en fibras adultas aisladas del músculo flexor corto de los dedos (FDB) de ratón, estimuladas con ATP exógeno (100 μM) se determinó el transporte de glucosa, utilizando el análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG (300 μM). La Figura 17A muestra una imagen representativa de los experimentos realizados para determinar la incorporación del análogo fluorescente de glucosa 2-NBDG, para los estímulos correspondientes. La Figura 17B muestra la cuantificación de los ensayos de incorporación de 2-NBDG, en ella se indica que luego de una estimulación con ATP extracelular (100 μM), se alcanzó un máximo en la captación de 2-NBDG. Como control positivo de la captación de 2-NBDG se utilizó insulina (100 nM) (Figuras 17A y 17B). Adicionalmente en la Figura 17C se muestra el fenómeno de potenciamiento entre insulina y ATP exógeno. Al utilizar concentraciones subumbrales, ya sea, de ATP o insulina por si sólo no tienen efecto sobre el transporte de glucosa, en cambio cuando se utilizan ambos estímulos juntos en dosis subumbral, se observa un potenciamiento sobre la incorporación de 2-NBDG, en comparación a las concentraciones

previamente utilizadas que corresponden a 100 μ M y 100 nM para ATP e insulina respectivamente. Considerando que el ATP exógeno aumenta el transporte de glucosa 2-NBDG, tanto en miotubos como en fibras adultas, mecanismo que podría ser funcional en sujetos que padecen resistencia a la insulina o Diabetes Mellitus tipo II, decidimos probar el efecto de ATP exógeno en un modelo animal de resistencia a insulina, para ello utilizamos ratones alimentados con dieta alta en grasa (DAG) durante 8 semanas, estos animales tienen un peso mayor y presentan resistencia a la insulina en comparación a ratones alimentados con dieta normal (control), en la Figura 17D se observa que insulina 100 nM no aumenta la incorporación de glucosa 2-NBDG en fibras musculares de animales alimentados con DAG, pero ATP exógeno produjo un aumento en la incorporación de glucosa 2-NBDG similar al ratón con dieta control.

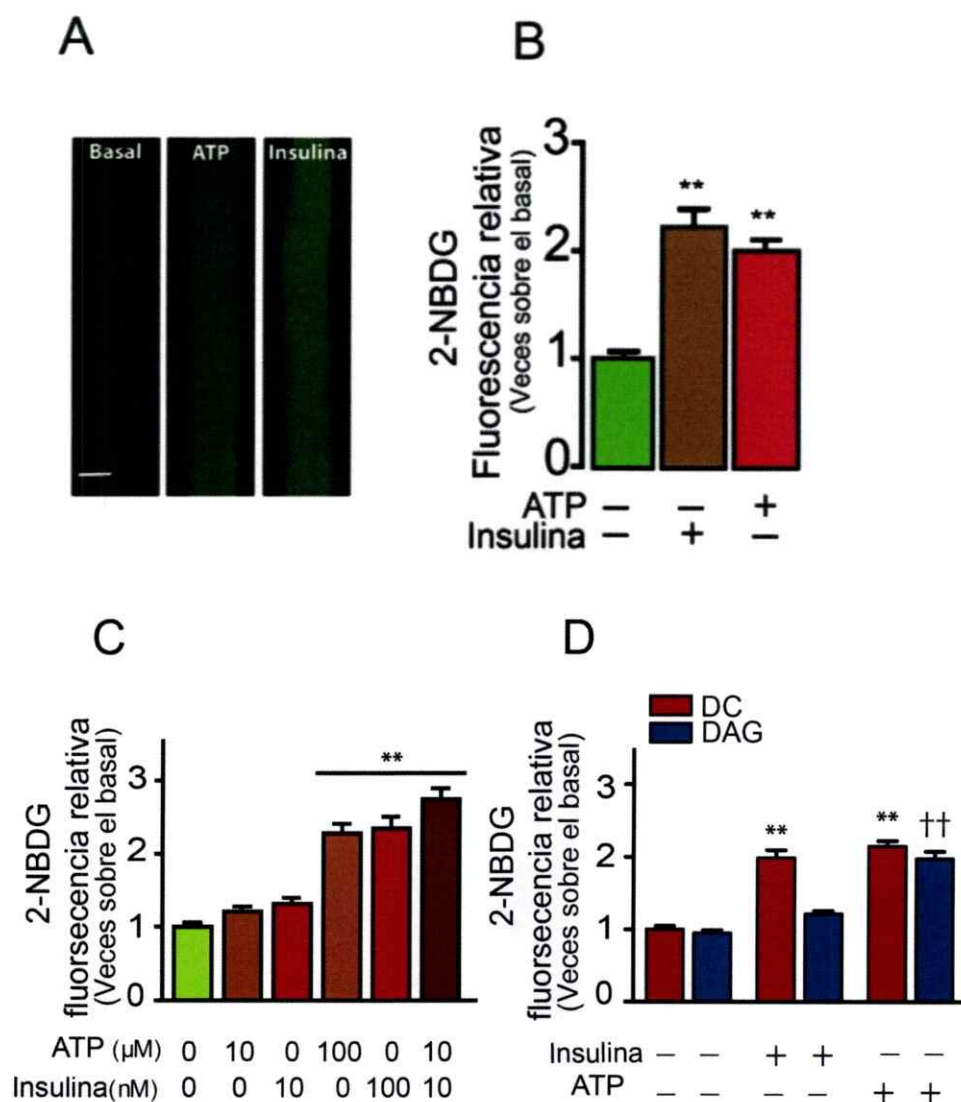


Figura 17 ATP extracelular induce el transporte de glucosa en fibras musculares adultas de ratón, de manera sinérgica con insulina.

Fibras musculares adultas de ratón estimuladas con ATP exógeno (100 μM) y/o insulina (100 nM). La incorporación de glucosa 2-NBDG fue determinada como se señaló en Materiales y Métodos **A**) Fotografía representativa de incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por, ATP exógeno e insulina, el tiempo de registro corresponde a 15 min posterior a los estímulos correspondientes. **B**) Cuantificación del transporte de glucosa 2-NBDG. **C**) Cuantificación del transporte de glucosa 2-NBDG inducido por ATP exógeno y/o Insulina en las concentraciones señaladas, se observa que al estimular conjuntamente con ATP (10 μM) e insulina (25 nM) se produce un efecto sumatorio sobre el transporte de glucosa 2-NBDG. **D**) Cuantificación del transporte de glucosa 2-NBDG. Ratones alimentados con dieta control (DC) y con dieta alta en grasa (DAG). Los valores representan el promedio ± desviación estándar, El análisis estadístico fue realizado con la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por post-test de Bonferroni ** $p < 0,001$ vs del basal (no estimulado); †† $p < 0,001$ respecto al basal (no estimulado, DAG). Datos de 4 experimentos independientes.

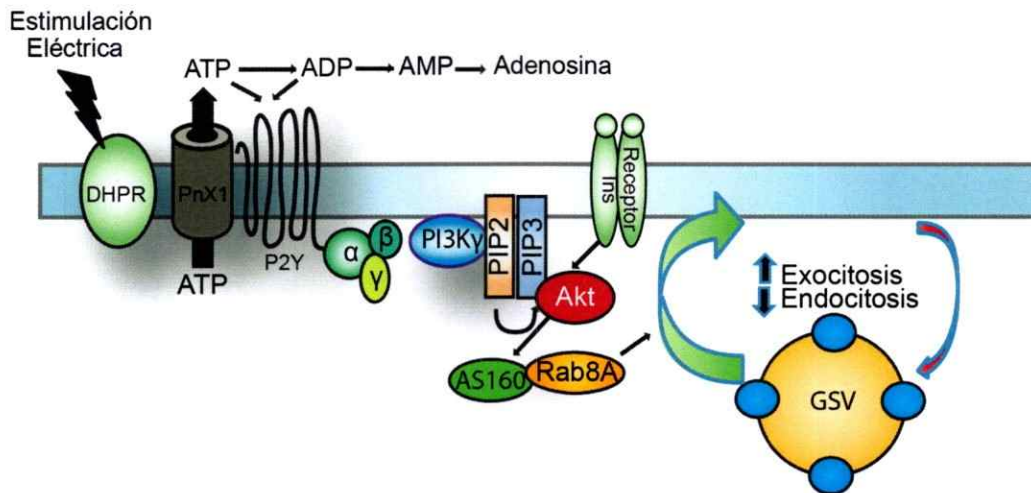


Figura 18. Modelo hipotético propuesto para el papel de ATP exógeno sobre el transporte de glucosa en células musculares esqueléticas.

La estimulación eléctrica induce la apertura de un hemicanal de Panexina, PnX1 después del cambio conformacional del DHPR adyacente. Este ATP liberado al medio extracelular induce una activación autocrina de los receptores P2Y. Una proteína G heterotrimérica posiblemente acoplada al receptor P2Y2, en respuesta a la unión de ATP (al receptor P2Y), induce la activación de las subunidades $\beta\gamma$, activando a su vez las vías PI3-K γ y Akt-AS160-Rab8A, promoviendo la translocación del GLUT4 a la superficie de la membrana y disminuyendo la endocitosis de GLUT4.

10. DISCUSIÓN

Como se señaló previamente el músculo esquelético es un tejido que posee gran capacidad de responder y adaptarse a los cambios fisiológicos y metabólicos producidos por la actividad contráctil (Bassel-Duby y Olson, 2006), jugando un papel importante en la homeostasis energética en el organismo. Por otra parte el ejercicio físico y la estimulación eléctrica producen numerosos cambios fenotípicos en la fibra muscular, como la expresión de genes que regulan el metabolismo, la diferenciación del tipo de fibra muscular (oxidativa o glicolítica), la biogénesis mitocondrial, la homeostasis de glucosa y la hipertrofia (Rockl y col., 2008).

En esta tesis se describe un nuevo mecanismo de señalización intracelular involucrado, tanto para la translocación de GLUT4 a la superficie celular como el transporte de glucosa en células musculares esqueléticas en cultivo, proceso dependiente de ATP liberado al medio extracelular posterior a una estimulación tetánica eléctrica. Tanto la estimulación eléctrica como el ATP exógeno, provocaron una serie de eventos, desencadenados por la unión del ATP a receptores purinérgicos del tipo P2Y, seguido por una importante activación de la proteína serina/treonina quinasa Akt. Ríó arriba de la proteína Akt encontramos que PI3K γ es reclutada por los receptores P2Y. Ello demuestra que cada uno de los elementos moleculares señalados

precedentemente son necesarios para la translocación de GLUT4 dependiente de ATP. Por otra parte queda al descubierto una interesante conexión entre los receptores purinérgicos tipo P2Y y la subsecuente activación de PI3-Ky y Akt, vía de señalización que ahora puede ser estudiada en el contexto del ejercicio físico en músculo esquelético adulto.

De manera interesante, hemos mostrado evidencia de que la translocación de GLUT4 a la superficie celular, dependiente de ATP, parece estar relacionada con un aumento de la exocitosis y una disminución en la tasa de endocitosis demostrado mediante diversos ensayos de exocitosis, endocitosis y reexocitosis, en células L6 GLUT4*myc*.

Recientemente se ha descrito que el ejercicio físico mejora el transporte de glucosa en músculo esquelético a través de mecanismos que son independientes del aumento en la fosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina, pero dependientes de la fosforilación de Akt en residuos de Thr308 y Ser473 (Xiao y col., 2010). Por otra parte el ejercicio físico agudo puede producir un incremento sostenido en la fosforilación de TBC1D4/AS160 (sustrato de Akt de 160 KDa) en músculo *epitrochlearis* en ausencia de insulina. Esta proteína miembro de la familia de proteínas TBC1D-Rab-GAP (proteínas Rab promotoras de la actividad GTPasas), es expresada en todos los tejidos que responden a insulina tanto en roedores como en humanos (Taylor y col., 2008; Treebak y col., 2009). La fosforilación de AS160 es un evento clave que gatilla la translocación de GLUT4 a la superficie celular (Sakamoto y col., 2002)

y por lo tanto el aumento en la fosforilación en residuos Ser318, Ser341, Ser570, Ser588, Thr642 y Ser751 son requeridas para aumentar el transporte de glucosa en adipocitos y células musculares.

Es sabido que la contracción muscular y la estimulación eléctrica, son capaces de inducir el transporte de glucosa en diferentes modelos, como músculos completos, músculo aislado, fibras musculares aisladas y líneas celulares de músculo. Sin embargo hasta ahora no había sido demostrado que la estimulación eléctrica fuera capaz de aumentar el transporte de glucosa en cultivo primario de músculo esquelético. Por otra parte el mecanismo por el cual la contracción muscular o la estimulación eléctrica son capaces de aumentar la incorporación de glucosa, no son del todo comprendidos, existiendo gran controversia en las vías de señalización intracelular involucradas en este proceso. Comúnmente es aceptado que durante la contracción muscular la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), es clave para este proceso de incorporación de glucosa en músculo esquelético y que además cumple un papel importante en la regulación metabólica, transcripcional y de síntesis proteica durante la contracción muscular. El mecanismo propuesto para la activación de AMPK es un incremento en la razón AMP/ATP y creatina/fosfocreatina a través de un complejo mecanismo que implica modificaciones alostéricas y fosforilaciones (Hardie y col. 1998; Kemp y col. 1999). De esta manera la actividad contráctil sería capaz de alterar el estado energético de la célula muscular activando esta quinasa, la cual, es capaz de fosforilar a la proteína TBC1D4/AS160. TBC1D4 (AS160) ha sido propuesta

como reguladora de las proteínas Rab implicadas en la movilización de vesículas que contienen GLUT4 a la membrana plasmática (Kane y col., 2002; Miinea y col., 2005). Sin embargo, esta idea no es completamente aceptada, ya que algunos autores han descrito que durante la contracción muscular y particularmente en la contracción muscular inducida por estímulo eléctrico se activarían otras vías de señalización que dan cuenta del aumento en la incorporación de glucosa como la quinasa dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina y proteína quinasa C (Jessen y col., 2005; Kramer y col., 2006). Por otra parte, AS160 es capaz de modular el tráfico de GLUT4, inducido por insulina tanto en adipocitos 3T3-L1 (Sano y col., 2003) como en mioblastos L6 (Thong y col., 2007). La característica estructural más importante de AS160 para su función, es la presencia de dos dominios de unión a fosfotirosinas: un dominio Rab-GAP en el carboxilo terminal y seis motivos de fosforilación (RXRXXS*/T*) que son blanco de Akt, pero no exclusivamente de Akt, estos sitios son (Ser318, Ser341, Ser570, Ser588, Thr642 y Ser751) (Kane y col., 2002; Miinea y col., 2005). Como mostramos, ATP exógeno induce la fosforilación de AS160 en Ser 318, Ser341, Ser570, Ser588, Thr642 y Ser751. Previamente se ha reportado que también pueden ser fosforilados de manera dependiente de la vía de señalización insulina-Akt (Kane y col., 2002; Miinea y col., 2005). De manera similar, el ATP exógeno induce la fosforilación de Akt en Thr308 y Ser473, en miotubos y mioblastos L6GLUT4myc y adicionalmente en células L6GLUT4myc-hAS160 (Fig 7D). En este modelo celular los niveles de fosforilación basal (no estimulado) no son detectables mediante el uso de

anticuerpos, situación que dificulta el análisis densitométrico de los geles, razón por la cual en la Figura 7D se muestra un gel representativo de un total de 4 geles y no se realizó la cuantificación de la fosforilación de las proteínas Akt y AS160. Akt induce la fosforilación de AS160 en los residuos previamente señalados de manera similar a insulina.

Recientemente se ha descrito la fosforilación de AS160 en músculo esquelético varias horas post-ejercicio físico (Treebak y col., 2010), efecto que podría ser mediado por ATP liberado durante el ejercicio físico.

AS160 (TBC1D4) y TBC1D1 han sido propuestos como sitios potenciales de convergencia para la señalización inducida por insulina y ejercicio físico en el transporte de glucosa en músculo esquelético (Cartee y col., 2007; Kramer, 2006; Taylor, 2008), sin embargo, no está claro si el ejercicio físico puede aumentar la actividad de PI3-K. Respecto a este punto en el año 1996, el grupo de Richter demostró la participación de PI3-K en el transporte de glucosa en músculo completo de rata sometido a estimulación eléctrica. Al utilizar wortmanina en concentración de 1 μ M fueron capaces de inhibir el transporte de glucosa inducido tanto por insulina como por estímulo eléctrico (Wojtaszewski y col., 1996). Otros autores han planteado la participación de receptores purinérgicos (receptor P2 y de adenosina) en la regulación de vías metabólicas a través de la formación de segundos mensajeros o la modulación de la función de canales iónicos (Andresen y col., 1999; Communi y col., 2000).

Sin embargo, los receptores purinérgicos han sido involucrados en el transporte de glucosa, fenómeno que ha sido altamente contradictorio, ya que

Fischer y cols., reportaron que ATP a través de receptores P2 inhibe el transporte de glucosa basal y el estimulado por insulina en cardiomiocitos (Fischer y col., 1999). Contrariamente en células C2C12 se demostró que el ATP a través de receptores P2 aumenta la velocidad de transporte de glucosa, a través de un incremento en la translocación de GLUT1 y GLUT4 a la superficie celular (Kim y col., 2002), este fenómeno ha sido atribuido a un aumento en la actividad de PI3-K, sin embargo, el mecanismo molecular de señalización no fue abordado y sólo utilizaron inhibidores generales de PI3-K como wortmanina, en este contexto esta tesis adquiere un valor significativo, ya que, aborda mecanísticamente la descripción realizada por Kim y col. el 2002, demostrando que la PI3-K involucrada en el aumento del transporte de glucosa es diferente a la PI3-K activada por insulina para el transporte de glucosa.

Nuestro laboratorio recientemente ha reportado que la estimulación eléctrica (45 Hz, 1 ms, 400 pulsos) induce la liberación de ATP al medio extracelular a través de hemicanales de panexina (PnX 1) (Buvinic y col., 2009), por otra parte se ha demostrado que la contracción muscular incrementa la liberación de ATP al medio extracelular en un 150% en músculos completos (Li y col., 2005) dejando en evidencia un papel del ATP extracelular en la fisiología muscular, el cual no ha sido completamente dilucidado. En esta tesis se confirmó que la estimulación eléctrica tetánica indujo la liberación de ATP al medio extracelular amentando el transporte de glucosa, sin embargo, el ATP induce la activación de receptores P2X y P2Y motivo por el cual ambos tipos de

receptores podrían estar involucrados en el aumento del transporte de glucosa. Para discriminar que tipo de receptor purinérgico participa en esta respuesta utilizamos ADP y UTP exógeno ambos compuestos agonistas de P2Y estimularon el transporte de glucosa 2-NBDG de manera similar a ATP exógeno. Además, demostramos que el ATP exógeno activa a su receptor purinérgico P2Y desencadenando la activación de la PI3-K clase I principalmente de tipo γ (p110 γ) (Figs. 8 y 11). Para ello se utilizaron dos estrategias la primera de ellas, fue utilizar un inhibidor farmacológico AS605240, inhibidor que posee una selectividad 30 veces mayor para PI3-K γ que para PI3-K δ y PI3-K β y 7 veces mayor que para PI3-K α . En presencia del inhibidor se observó una disminución de un 85% del transporte de glucosa inducido por ATP exógeno y sólo produjo una disminución de un 15% del transporte de glucosa inducido por insulina. Este importante resultado sugiere que si bien el ATP exógeno es capaz de inducir la activación de PI3-K para el transporte de glucosa el tipo de PI3-K involucrada en este proceso es distinta de la PI3-K que media el mismo proceso en respuesta a insulina. Si bien, este hallazgo es altamente novedoso, la estrategia farmacológica no es lo suficientemente fuerte como evidencia de la participación de un complejo de señalización intracelular, por ello corroboramos este interesante resultado con el uso de herramientas genéticas. Para ello se co-transfectaron miotubos con un plasmidio GLUT4 myc -eGFP y otro plasmidio que codifica para una isoforma de PI3-K γ con el dominio quinasa inactivo, es decir, no es capaz de fosforilar

fosfatidilinositoles en la cara interna de la membrana, impidiendo la posterior activación de Akt, proteína serina/treonina quinasa río abajo en la vía de señalización. La respuesta encontrada en miotubos co-transfectados con los plasmidio PI3-K γ -KD y GLUT4 myc -eGFP, estimulados con ATP exógeno fue similar a la respuesta encontrada con el inhibidor farmacológico AS605240, confirmando el hallazgo farmacológico.

Como se señaló al inicio de la discusión, el mecanismo por el cual la estimulación eléctrica induce aumento del transporte de glucosa ha sido controversial y, en general, la contracción muscular y la actividad contráctil inducida por estímulo eléctrico no han sido relacionadas con la activación de la proteína Akt. Como se demostró, PI3-K γ está involucrada en el transporte de glucosa inducido por ATP exógeno. Además de ser un regulador clave de Akt, proteína quinasa altamente conservada, que además juega un importante papel en proliferación celular, síntesis de proteínas y diversos procesos metabólicos (Kimball y col., 2002). Como se señaló precedentemente, para aumentar el transporte de glucosa, Akt activa al complejo TBC1D4/AS160, promoviendo la translocación de GLUT4 a la membrana celular. Como era de esperar existe una dependencia de Akt para el transporte de glucosa en respuesta a ATP exógeno, ya que, al utilizar el inhibidor de Akt 1/2, conocido como inhibidor de Akt VIII en una concentración 10 μ M, se produjo una inhibición completa del transporte de glucosa inducido por ATP exógeno. Este resultado fue corroborado con el uso de un adenovirus que codifica para una forma

dominante negativa de la proteína Akt. Este resultado es bastante novedoso y corrobora lo reportado por el grupo de Kai, quienes reportaron que la estimulación eléctrica de baja intensidad, es decir, con una diferencia de voltaje de 1 V/cm, 0,1 mseg de duración del impulso y 55 Hz, activó la vía de señalización PI3-K/Akt en células musculares de rata L6, además de promover el transporte de glucosa dependiente de GLUT4 en esta línea celular. Estos autores muestran además que el estímulo eléctrico no fue capaz de fosforilar a AMPK. (Yano y col., 2011). En esta tesis no fue abordada experimentalmente la activación de AMPK, mecanismo que ha sido involucrado en el transporte de glucosa mediado por contracción muscular, debido a que al utilizar el inhibidor VIII de Akt y la isoforma dominante negativa de Akt, el transporte de glucosa fue inhibido completamente, indicando de manera indirecta que la vía AMPK no participa en el aumento del transporte de glucosa mediado por ATP exógeno.

Otro aspecto altamente discutido y controversial abordado en esta tesis fue la sensibilización mostrada por el ejercicio físico o la contracción muscular y la estimulación eléctrica, sobre la señalización de insulina y la subsecuente mejora en el transporte de glucosa.

Como se señaló previamente, el (los) mecanismo(s) por el (los) cual(es) la contracción muscular induce la fosforilación de Akt aún debe(n) ser dilucidado(s) y hay aspectos en donde no existe consenso. Se ha descrito que la activación de Akt inducida por contracción muscular puede ser inhibida por bloqueadores de PI3-K (wortmanina o LY294002); fenómeno consistente con que la la activación de Akt por contracción sea dependiente de esta enzima

(Sakamoto y col., 2002). Por otra parte, la contracción no es capaz de incrementar la actividad de PI3-K de clase IA (Goodyear y col., 1995; Sakamoto y col., 2002) ni de clase II (Soos y col., 2001). Sakamoto y col., 2002 han sugerido que la contracción muscular puede activar Akt a través de una PI3-K de clase IB. Esta quinasa es activada por receptores acoplados a proteína G, en lugar de ser activada por receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, los cuales son importantes para el efecto de insulina sobre PI3-K asociadas a la proteína IRS1 (Vanhaesebroeck y col., 2002). La activación de PI3-K de clase IB inducida por ejercicio no ha sido probada experimentalmente. En relación a este punto, esta tesis entrega evidencia experimental relevante respecto al tipo de PI3-K que es activada por estimulación eléctrica, sin embargo, especular que este mecanismo opere durante la contracción muscular es arriesgado, debido a que la estimulación eléctrica utilizada en esta tesis fue un tétano de corta duración y extrapolar estos resultados a una condición de contracción muscular o ejercicio físico podría ser aventurado.

En relación a la dinámica de los GLUT4, existe una importante controversia. Se ha planteado que GLUT4 son retenidos intracelularmente en condiciones basales por mecanismos de retención (Karylowski y col., 2004; Govers y col., 2004), pero es sabido que estos transportadores reciclan continuamente entre la membrana plasmática y poblaciones de vesículas intracelulares los cuales han sido escasamente definidas (Foley y col., 2011). La retención de GLUT4 en depósitos intracelulares está mediada por diversas proteínas reguladoras, no del todo conocidas. Insulina induce la translocación

de GLUT4 a través de la vía de señalización dependiente del receptor de insulina involucrando a IRS1, PI3-K y Akt. Sin embargo, existe una serie de vías de señalización que son activadas de forma paralela, dentro de ellas podemos mencionar PKC atípica, y GTPasas de la familia Rho (Foley y col., 2011). Por otra parte la contracción muscular, depolarización de la membrana y desacoplamiento mitocondrial, son capaces de aumentar la densidad de GLUT4 en la membrana plasmática de músculo esquelético, principalmente por disminución de la velocidad de endocitosis (Wijesekara y col., 2006; Antonescu y col., 2008; Karlsson y col., 2009), principalmente vía AMPK y PKC (Klip y col., 2009; Klip, 2009). En esta tesis hemos descrito que el ATP exógeno es capaz de disminuir la velocidad de endocitosis a tiempos cortos (5 min) en células L6GLUTmyc. El mecanismo por el cual ocurre este fenómeno no fue abordado, ya que, la mayor cuantía del aumento de GLUT4 en la membrana es por activación de la ruta exocítica, tanto en miotubos como en células L6GLUTmyc de rata. En relación a los mecanismos de endocitosis de GLUT4, se sabe que son esenciales para la mantención del tamaño celular y para balancear las funciones exocíticas. Los principales tipos de endocitosis son, endocitosis mediada por clatrina (EMC) y endocitosis no mediada por clatrina. En células L6 aproximadamente la mitad de la internalización total del transportador ocurre a través de EMC y la otra mitad ocurre a través de la vía del receptor β de interleuquina 2 (IL-2R β), que utiliza una vía de endocitosis independiente de clatrina (Antonescu y col., 2008). La vida media de los transportadores GLUT4 es de 48 h (Sargeant y Paquet, 1993), por lo que una molécula de GLUT4

puede ir y volver múltiples veces a la membrana plasmática antes de ser marcada para degradación, para ello los GLUT4 deben ser destinados a vías de reciclaje (Foley y col., 2011), un aspecto no abordado en esta tesis fue la distribución en los diferentes compartimentos endosomales de los transportadores GLUT4 y de que forma esta distribución podría ser alterada por estimulación eléctrica y ATP exógeno.

En este trabajo de tesis abordamos una problemática no comprendida totalmente, que guarda relación con la participación de las proteínas Rab en la translocación de GLUT4 a la membrana celular. Se ha propuesto que las proteínas Rab son blanco de AS160, sin embargo la identidad de estas proteínas Rab es controversial y es un área de investigación activa (Rowland y col., 2011). Varias de estas Rabs han sido identificadas por inmunoprecipitación con GSV tanto en adipocitos 3T3-L1 (Larance y col., 2005; Miinea y col., 2005;) como en células musculares cardíacas (Kessler y col., 2000). Una de estas Rabs, es Rab10; el *knockdown* de esta proteína resultó en una reducción de la translocación de GSV-dependientes de insulina hacia la membrana plasmática (Sano y col., 2007). Contrariamente, en células musculares L6 Rab8A, Rab13 (Sun y col., 2010) y Rab14, pero no Rab10 son necesarias para la translocación de GLUT4 a la membrana de manera dependiente de insulina. En relación a la participación de Rabs en el tráfico de GLUT4 a la membrana plasmática mediada por ATP exógeno, pudimos corroborar que existe participación de Rab8A y no de Rab10 en la translocación de GLUT4*myc* a la superficie dependiente de ATP en células L6GLUT4*myc*. Sin

embargo, no podemos descartar la participación de otras Rabs en la translocación de GLUT4 dependiente de ATP en células L6. Entre las Rabs que podrían participar podemos señalar Rab13 y Rab14, punto que queda pendiente en esta tesis. La participación de múltiples Rabs en el tráfico de GLUT4, es un fenómeno altamente complejo y puede dar cuenta de la participación de Rabs en diferentes etapas del tráfico intracelular de GLUT4, donde su papel sea el control de etapas diferentes y sucesivas en estas rutas de tráfico de GLUT4 desde y hacia la membrana celular.

En relación a los datos que muestran una posible participación de otras vías de señalización, considerando los antecedentes de que ATP extracelular participa en la generación de señales de calcio dependientes del canal receptor de IP3 (Buvinic y col., 2009), si bien la estrategia utilizada en esta tesis fue farmacológica, los datos son consistentes con la participación de calcio liberado desde reservorios intracelulares, a través de receptores de IP3, en la incorporación de glucosa dependiente de ATP; esta participación es parcial y el papel que juega este calcio no fue abordado desde el punto de vista mecanístico, es posible que sea necesario para los procesos de anclaje de las vesículas de GLUT4 a la membrana celular. Sin embargo, el papel del calcio para el transporte de glucosa es poco conocido; el transporte de glucosa en músculo esquelético inducido por insulina no se redujo cuando se extrajo el Ca^{2+} extracelular (Wallber-Henriksson y col., 1988; Henriksen y col., 1989). En fibras musculares aisladas el calcio parece tener un papel importante en el transporte de glucosa dependiente de insulina. Al utilizar 2-APB, se observó una

disminución del transporte de glucosa inducido por insulina, sin afectar la fosforilación de Akt o ERK 1/2 (Lanner y col., 2006). Por otra parte insulina tiene un papel importante en la activación de varias isoformas de PKC en músculo esquelético. Se ha demostrado que insulina requiere de PKC ξ en miotubos de la línea celular L6 para que ocurra la translocación de GLUT4 a la membrana (Liu y col., 2006). Espinosa y col., describieron señales de Ca²⁺ inducidas por insulina en miotubos de rata, para la producción de estas señales fue necesario la activación de NADPH oxidasa, PI3-K y PKC (Espinosa y col., 2009). En el contexto de esta tesis el ATP exógeno induce la activación de una proteína G sensible a toxina *pertussis*, que a su vez es capaz de activar a PI3-K γ , induciendo la subsecuente activación de fosfolipasa C γ 1 (PLC γ 1). Esta última enzima promueve la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) a inositol 3-fosfato (IP₃) que es necesario para producir la señal lenta de Ca²⁺ (Eltit y col., 2006), involucrada parcialmente en la incorporación de 2-NBDG dependiente de ATP exógeno en miotubos de rata.

Finalmente el ejercicio físico es un potente estímulo que mejora la acción de insulina en músculos de pacientes diabéticos. Considerando los resultados obtenidos en fibras aisladas de músculo adulto de ratones alimentados con dieta alta en grasa, modelo que ha sido bien caracterizado como de resistencia a insulina, en los cuales se observó que el ATP exógeno aumenta el transporte de glucosa 2-NBDG, es posible proponer al ATP como la molécula señalizadora clave en la normalización de la glicemia mediada por ejercicio físico.

11. CONCLUSIONES

En esta tesis se describe un mecanismo novedoso que explica la translocación de GLUT4 y la incorporación de glucosa, dependiente de ATP extracelular liberado por células musculares en cultivo como respuesta a estimulación eléctrica. El estímulo eléctrico gatilla una cascada de eventos mediados por la liberación de ATP y su unión a receptores purinérgicos del tipo P2Y, actuando de manera autocrina y/o paracrina. La unión de ATP a los P2Y desencadena la activación de una PI3K γ , seguido de la activación de la proteína serina/treonina quinasa Akt, un regulador clave de la señalización para insulina. La activación de Akt induce la activación de la proteína Rab-Gap AS160 induciendo la exocitosis de vesículas que contienen GLUT4 a la membrana de la célula muscular.

El mecanismo de transporte de glucosa dependiente de ATP exógeno opera en fibras adultas aisladas de músculo de ratón al igual que en miotubos esqueléticos de rata y se encuentra funcional en fibras musculares de ratones que presentan resistencia a insulina. Este mecanismo constituye un modelo que explica el aumento del transporte de glucosa en las células musculares durante el ejercicio, tanto en sujetos sanos como en aquellos que presentan resistencia a insulina.

12. REFERENCIAS

Andresen, B.T., Gillespie, D.G. y cols. (1999). Role of adenosine A(1) receptors in modulating extracellular adenosine levels. J Pharmacol Exp Ther **291**:76-80.

Antonescu, C.N., Diaz, N. y cols. (2008). Clathrin-dependent and independent endocytosis of glucose transporter 4 (GLUT4) in myoblasts: Regulation by mitochondrial uncoupling. Traffic **9**:1173-1190.

Antonescu, C.N., Foti, M. y cols. (2009). Ready, set, internalize: mechanisms and regulation of GLUT4 endocytosis Biosci Rep **29**: 1-11.

Araya, R., Liberona, J.L. y cols. (2003). Dihydropyridine receptors as voltage sensors for a depolarization-evoked, IP3R-mediated, slow calcium signal in skeletal muscle cells. J Gen Physiol **121**:3-16.

Bao, L., Locovei, S., y cols. (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. FEBS Lett. **572**:65-68.

Barros, L.F., Bittner, C.X. y cols. (2009). "Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transporter GLUT1 in astrocytes". J Neurochem. **109** Suppl 1:94-100.

Bassel-Duby, R. y Olson, E.N. (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. Annu Rev Biochem **75**:19-37.

Berridge, M.J., Lipp, P. y cols. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol **1**:11-21.

Braiman, L., Alt, A. y cols. (2001). Insulin induces specific interaction between insulin receptor and protein kinase C delta in primary cultured skeletal muscle. Mol Endocrinol **15**:565-74.

Brozinick, J.T., Jr. y Birnbaum, M.J. (1998). Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. J Biol Chem **273**:14679-82.

Bruton, J.D., Katz, A. y cols. (1999). Insulin increases near-membrane but not global Ca²⁺ in isolated skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA **96**(6):3281-86.

Bryant, N.J., Govers, R. y James D.E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. Nat Rev Mol Cell Biol **3**:267-277

Burnstock, G. (1997). The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. Neuropharmacology **36**:1127-39.

- Buvinic, S. Almarza, G. y cols. (2009). ATP Released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle J Biol Chem **284**: 34490-505.
- Carrasco, M.A., Riveros, N. y cols. (2003). Depolarization-induced slow calcium transients activate early genes in skeletal muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol **284**:C1438-47.
- Cartee, G.D. y Wojtaszewski, J.F. (2007) Role of Akt substrate of 160 kDa in insulin-stimulated and contraction-stimulated glucose transport. Appl Physiol Nutr Metab **32**:557-566.
- Cipok, M., Aga-Mizrachi, S. y cols. (2006). Protein kinase Calpha regulates insulin receptor signaling in skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun **345**: 817-24.
- Communi, D., Janssens, R. y cols. (2000). Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors. Cell Signal **12**:351-60.
- Contreras-Ferrat, A.E., Toro, B. y cols. (2010) An inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-IP3 receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. Endocrinology **151**:4665-77.
- Cross, D. A., Alessi, D. R. y cols. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature **378**:785-9.
- Cunha, R.A. y Sebastiao, A.M. (1993). Adenosine and adenine nucleotides are independently released from both the nerve terminals and the muscle fibres upon electrical stimulation of the innervated skeletal muscle of the frog. Pflugers Arch **424**:503-10.
- Delgado, J., Moro, G. y cols. (1997). T-tubule membranes from chicken skeletal muscle possess an enzymic cascade for degradation of extracellular ATP. Biochem J **327** (Pt 3):899-907.
- Derave, W. y Hespel, P. (1999). Role of adenosine in regulating glucose uptake during contractions and hypoxia in rat skeletal muscle. J Physiol **515** (Pt 1):255-63.
- Douen, A.G., Ramlal, T., y cols. (1990). Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. J Biol Chem **265**:13427-13430
- Dugani C.B. y Klip A. (2005) Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies. EMBO Rep **6**:1137-1142
- Dulhunty, A.F. (2006). Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. Clin Exp Pharmacol Physiol **33**:763-72.

Eltit, J.M., Garcia, A. y cols. (2006). Membrane electrical activity elicits inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent slow Ca^{2+} signals through a Gbetagamma/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway in skeletal myotubes. J Biol Chem **281**:12143-54.

Eltit, J.M., Hidalgo, J. y cols. (2004). Slow calcium signals after tetanic electrical stimulation in skeletal myotubes. Biophys J **86**:3042-51.

Engelman, J.A., Luo, J. y cols. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. Nat Rev Genet **7**:606-19.

Espinosa, A., Estrada, M. y cols. (2004). IGF-I and insulin induce different intracellular calcium signals in skeletal muscle cells. J Endocrinol **182**:339-52.

Espinosa, A., Garcia, A. y cols. (2009). NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. J Biol Chem **284**:2568-75.

Fauconnier, J., Lanner, J.T. y cols. (2005). Insulin and inositol 1,4,5-trisphosphate trigger abnormal cytosolic Ca^{2+} transients and reveal mitochondrial Ca^{2+} handling defects in cardiomyocytes of ob/ob mice. Diabetes **54**:2375-81.

Fischer, Y., Becker, C. y cols. (1999). Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. J Biol Chem **274**:755-61.

Foley, K., Boguslavsky, S. y Klip, A. (2011). Endocytosis, recycling and regulated exocytosis of glucose transporter 4. Biochemistry **50**:3048-61

Forrester, T. (1972). An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle. J Physiol **224**:611-28.

Foster, F.M., Traer, C.J. y cols. (2003). The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. J Cell Sci **116**: 3037-40.

Fruman, D.A., Meyers, R.E. y cols. (1998). Phosphoinositide kinases. Annu Rev Biochem **67**:481-507.

Furtado, L.M., Somwar, R. y cols. (2002). Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. Biochem Cell Biol **80**:569-78.

Gao, Y., Ordas, R. y cols. (2008). Regulation of caspase-3 activity by insulin in skeletal muscle cells involves both PI3-kinase and MEK-1/2. J Appl Physiol **105**:1772-78.

Goodyear, L.J., Giorgino, F. y cols. (1995). Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. Am J Physiol **268** (Pt 1): E987-95.

Govers, R., Coster, A.C. y James, D.E. (2004). Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. Mol Cell Biol **24**:6456-6466.

- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.F. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. Biochimie **87**:99-109
- Han, D.H., Hansen, P.A. y cols. (1998). Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. Diabetes **47**:1671-5.
- Harden, T.K., Boyer, J.L. y cols. (1995). P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 541-79.
- Hardie, D.G., Carling D., y cols. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? Annu Rev Biochem **67**:821-55.
- Henriksen, E.J., Rodnick, K.J. y Holloszy, J.O. (1989). Activation of glucose transport in skeletal muscle by phospholipase C and phorbol ester: evaluation of the regulatory roles of protein kinase C and calcium. J Biol Chem **264**:21536-21543.
- Hirsch, E., Costa C., y cols. (2007). Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. J Endocrinol **194**:243-56.
- Hosaka, T., Brooks, C.C. y cols. (2005) p115 Interacts with the GLUT4 vesicle protein, IRAP, and plays a critical role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. Mol Biol Cell **16**:2882-2890.
- Inoki, K., Li Y., y cols. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. Nat Cell Biol **4**:648-57.
- Jaimovich, E. y Carrasco, M.A. (2002). IP3 dependent Ca²⁺ signals in muscle cells are involved in regulation of gene expression. Biol Res **35**:195-202.
- Jaimovich, E., Reyes, R. y cols. (2000). IP(3) receptors, IP(3) transients, and nucleus-associated Ca(2+) signals in cultured skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol **278**:C998-C1010.
- Jessen, N. y Goodyear, L.J. (2005). Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. J Appl Physiol **99**:330-7.
- Juretic, N., Garcia-Huidobro, P. y cols. (2006). Depolarization-induced slow Ca²⁺ transients stimulate transcription of IL-6 gene in skeletal muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol **290**:C1428-36.
- Juretic, N., Urzua, U. y cols. (2007). Differential gene expression in skeletal muscle cells after membrane depolarization. J Cell Physiol **210**:819-30.
- Kane, S., Sano, H. y cols. (2002). A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rag-GTPase activating protein (GAP) domain. J Biol Chem **277**(25):22115-18.

Karylowski, O., Zeigerer, A. y cols. (2004). GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes. Mol Biol Cell **15**:870–882.

Karlsson, H.K., Chibalin, A.V. y cols. (2009). Kinetics of GLUT4 trafficking in rat and human skeletal muscle. Diabetes **58**:847-854.

Katso, R., Okkenhaug, K. y cols. (2001). Cellular function of phosphoinositides 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. Annu Rev Cell Dev Biol. **17**:615-75.

Keller, S.R. (2003) The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4. Front Biosci **8**:s410-420

Kemp, B.E., Mitchelhill, K.I. y cols. (1999). Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. Trends Biochem Sci **24**:22-5.

Kessler, A., Tomas, E. y cols.(2000). Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin. Diabetologia **43**:1518–1527.

Kim, M.S., Lee, J. y cols. (2002). ATP stimulates glucose transport through activation of P2 purinergic receptors in C(2)C(12) skeletal muscle cells. Arch Biochem Biophys **401**:205-14.

Klip, A., Ramlal, T. y cols. (1990). Recruitment of GLUT-4 glucose transporters by insulin in diabetic rat skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun **172**:728-736

Klip, A., Marette, A. y cols. (1992). Effect of diabetes on glucoregulation. From glucose transporters to glucose metabolism in vivo. Diabetes Care **15**:1747-66.

Klip, A., Schertzer, J.D. y cols. (2009). Regulation of glucose transporter 4 traffic by energy deprivation form mitochondrial compromise. Acta Physiol. Scand. **196**:27-35.

Klip, A. (2009). The many ways to regulate glucose transporter 4. Appl. Physiol. Nutr. Metab. **34**:481-87.

Kimball, S.R., Farrell, P.A. y cols. (2002). "Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise." J Appl Physiol **93**:1168-80.

Koch, W.J., Hawes, B.E. y cols. (1994) Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling. J Biol Chem **269**:6193-97.

Konrad, D., Rudich, A. y cols. (2005) Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells. Diabetologia **48**:954-66.

Kramer, H.F., Witczak, C.A., y cols. (2006). AS160 regulates insulin- and contraction-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle. J Biol Chem **281**:31478-85.

Lamb, G.D. (2002). Voltage-sensor control of Ca²⁺ release in skeletal muscle: insights from skinned fibers. Front Biosci **7**:d834-42.

Lanner, J.T., Katz, A. y cols. (2006). The role of Ca²⁺ influx for insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle. Diabetes **55**:2077-83.

Larance, M., Ramm, G. y cols. (2005). Characterization of the role of the Rab GTPase-activating protein AS160 in insulin-regulated GLUT4 trafficking. J Biol Chem **280**:37803-13.

Lazarowski, E.R., Boucher, R.C. y cols. (2000). Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. J Biol Chem **275**:31061-8.

Lemmon, M.A. (2007). Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. Biochem Soc Symp (74):81-93.

Li, D., Randhawa, V.K., y cols. (2001). Hyperosmolarity reduces GLUT4 endocytosis and increases its exocytosis from a VAMP2-independent pool in L6 muscle cells. J Biol Chem **276**:22883-91.

Li, J., King, N.C. y Sinoway, L.I., (2005). Interstitial ATP and norepinephrine concentrations in active muscle. Circulation **111**:2748-51.

Liu, L.Z., Zhao, H.L. y cols. (2006). Protein kinase Czeta mediates insulin-induced glucose transport through actin remodeling in L6 muscle cells. Mol Biol Cell **17**:2322-30.

Mahadev, K., Motoshima, H. y cols. (2004). The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. Mol Cell Biol **24**:1844-54.

Malide, D., Ramm, G., y cols. (2000). Immunoelectron microscopic evidence that GLUT4 translocation explains the stimulation of glucose transport in isolated rat white adipose cells. J Cell Sci **113 Pt 23**:4203-10.

Martin, S., Tellam, J. y cols. (1996). The glucose transporter (GLUT-4) and vesicle-associated membrane protein-2 (VAMP-2) are segregated from recycling endosomes in insulin-sensitive cells. J Cell Biol **134**:625-35.

Medina, R.A. y Owen, G.I. (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. Biol Res **35**:9-26.

Miinea, C.P., Sano H. y cols. (2005). AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation has a functional Rab GTPase activating protein domain. Biochem J **391**:87-93.

Mitchelhill, K.I., Stapleton, D. y cols. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. J Biol Chem **269**:2361-4.

Napoli, R., Hirshman, M.F. y Horton, E.S. (1995). Mechanisms of increased skeletal muscle glucose transport activity after an oral glucose load in rats. Diabetes **44**:1632-8.

Nedachi, T., Fujita, H. y cols. (2008). Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab **295**: E1191-204.

North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. Physiol Rev **82**:1013-67.

Pereira, L.O. y Lancha, A.H., Jr. (2004). Effect of insulin and contraction up on glucose transport in skeletal muscle. Prog Biophys Mol Biol **84**:1-27.

Ploug, T. y Ralston, E. (2002) Exploring the whereabouts of GLUT4 in skeletal muscle (review). Mol Membr Biol **19**:39-49.

Ralevic, V. y Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev **50**:413-92.

Randhawa V.K., Thong F.S., y cols. (2004). Insulin and hypertonicity recruit GLUT4 to the plasma membrane of muscle cells by using N-ethylmaleimide-sensitive factor-dependent SNARE mechanisms but different v-SNAREs: role of TI-VAMP. Mol Biol Cell **15**:5565-73.

Randhawa V.K., Ishikura S., y cols. (2008) GLUT4 vesicle recruitment and fusion are differentially regulated by Rac, AS160, and Rab8A in muscle cells. J Biol Chem **283**:27208-19

Rockl, K.S., Witczak, C.A. y cols. (2008). Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise. IUBMB Life **60**:145-53.

Rommel, C., Bodine, S.C. y cols. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat Cell Biol **3**: 1009-13.

Rowland, A.F., Fazakerley, D.J. y James, D.E. (2011). Mapping insulin/GLUT4 circuitry, Traffic **12**:672-81.

Ryten, M., Dunn, P.M. y cols. (2002). ATP regulates the differentiation of mammalian skeletal muscle by activation of a P2X5 receptor on satellite cells. J Cell Biol **158**:345-55.

Ryten, M., Yang, S.Y. y cols. (2004). Purinoceptor expression in regenerating skeletal muscle in the mdx mouse model of muscular dystrophy and in satellite cell cultures. FASEB J **18**:1404-6.

- Sakamoto, K., Aschenbach, W.G. y cols. (2003). Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch. Am J Physiol Endocrinol Metab **285**: E1081-8.
- Sakamoto, K., Hirshman, M.F. y cols. (2002). Contraction regulation of Akt in rat skeletal muscle. J Biol Chem **277**:11910-7.
- Saltiel, A.R. y Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature **414**:799-806.
- Sano H., Kane S. y cols. (2003). Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. J Biol Chem **278**: 14599-602.
- Sano, H., Egeuz, L. y col. (2007). Rab10, a target of the AS160 Rab GAP, is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the adipocyte plasma membrane. Cell Metab **5**:293-303.
- Sargeant, R.J. y Paquet, M.R. (1993). Effecto of insulin on the rates of synthesis and degradation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in 3T3L1 adipocytes. Biochem J. **290**: (part 3), 913-19.
- Satoh S., Nishimura H. y cols. (1993). Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. J Biol Chem **268**:17820-29.
- Semsarian, C., Wu, M.J. y cols. (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. Nature **400**: 576-81.
- Shepherd, P.R. y Kahn, B.B. (1999). Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. N Engl J Med **341**:248-57.
- Shi, J., Kandror, K.V. (2005). Sortilin is essential and sufficient for the formation of Glut4 storage vesicles in 3T3-L1 adipocytes. Dev Cell **9**:99-108.
- Shestopalov, V.I. y Panchin, Y. (2008). Pannexins and gap junction protein diversity. Cell Mol Life Sci **65**: 376-94.
- Simonsen, A., Wurmsen, A.E. y cols. (2001). The role of phpsphoinositides in membrane transport. Curr Opin Cell Biol **13**: 485-92.
- Slot, J.W., Geuze, H.J. y cols. (1991). Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. J Cell Biol **113**:123-35.
- Soos, M.A., Jensen, J. y cols. (2001). Class II phosphoinositide 3-kinase is activated by insulin but not by contraction in skeletal muscle. Arch Biochem Biophys **396**: 244-48.
- Stapleton, D., Gao, G. y cols. (1994). Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. J Biol Chem **269**: 29343-6.

Stitt, T.N., Drujan, D. y cols. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. Mol Cell **14**: 395-403.

Sun, Y., Bilan, P.J. y cols. (2010). Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA **107**:19909-14.

Szentesi, P., Zaremba, R. y cols. (2001). ATP utilization for calcium uptake and force production in different types of human skeletal muscle fibres. J Physiol **531**(Pt 2): 393-403.

Tanabe, T., Beam, K.G. y cols. (1990). Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. Nature **346**: 567-9.

Taylor, E.B., An, D. y cols. (2008). Discovery of TBC1D1 as an insulin-AICAR, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. J Biol Chem **283**: 9787-96.

Thong, F.S., Dugani, C.B. y Klip, A. (2005). Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. Physiology (Bethesda) **20**:271-84.

Thong, F.S., Lally, J.S. y cols. (2007). Activation of the A1 adenosine receptor increases insulin-stimulated glucose transport in isolated rat soleus muscle. Appl Physiol Nutr Metab **32**: 701-10.

Torok, D., Patel, N., y cols. (2004) Insulin but not PDGF relies on actin remodeling and on VAMP2 for GLUT4 translocation in myoblasts. J Cell Sci **117**:5447-55.

Treebak, J.T., Frosing, C. y cols. (2009). Potential role of TBC1D4 in enhanced post-exercise insulin action in human skeletal muscle. Diabetologia **52**: 891-900.

Treebak, J.T., Taylor, E.B. y cols. (2010). Identification of a novel phosphorylation site on TBC1D4 regulated by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol **298**:C377-85.

Vanhaesebroeck, B., Leervers, S.J. y cols. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu Rev Biochem **70**: 535-602.

Vergauwen, L., Hespel, P. y cols. (1994). Adenosine receptors mediate synergistic stimulation of glucose uptake and transport by insulin and by contractions in rat skeletal muscle. J Clin Invest **93**:974-81.

Vizi, E.S., Nitahara, K. y cols. (2000). Stimulation-dependent release, breakdown, and action of endogenous ATP in mouse hemidiaphragm preparation: the possible role of ATP in neuromuscular transmission. J Auton Nerv Syst **81**:278-84.

Walker, K.S., Deak, M. y cols. (1998). Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. Biochem J. **331 (Pt 1)**: 299-308.

Wallberg-Henriksson, H., Campaigne, B.N. y Henriksson, J.(1988). In vitro reversal of insulin resistance in diabetic skeletal muscle is independent of extracellular Ca²⁺ and Mg²⁺. Acta Physiol Scand **133**:125-6.

Wang Q, Khayat Z, y cols. (1998) "GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay". FEBS Lett. **427**:193-97.

Watson R.T., Kanzaki M. y Pessin J.E. (2004a). Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. Endocr Rev **25**:177-204.

Watson, R.T., Khan, A.H. y cols. (2004b). Entry of newly synthesized GLUT4 into the insulin-responsive storage compartment is GGA dependent. EMBO J **23**:2059-70.

Wijesekara, N., Tung, A. y cols. (2006). Muscle cell depolarization induces a gain in surface GLUT4 via reduced endocytosis independently of AMPK. Am J Physiol **290**:E1276-85.

White, M.F. y Kahn, C.R. (1994). The insulin signaling system. J Biol Chem **269**:1-4.

Worrall, D.S. y Olefsky, J.M. (2002). The effects of intracellular calcium depletion on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Mol Endocrinol **16**: 378-8.

Wojtaszewski, J.F., Bo, F. y cols. (1996). Wortmannin inhibits both insulin- and contraction-stimulated glucose uptake and transport in rat skeletal muscle J Appl Physiol **81**:1501-09.

Wymann, M. y Marone, R. (2005). Phosphoinositide 3-Kinase in disease: timing, location and scaffolding. Curr Op in Cell Biol **17**:141-9.

Xiao M., Sharma N. y cols. (2012). A persistent increase in insulin-stimulated glucose uptake by both fast-twitch and slow-twitch skeletal muscles after a single exercise session by old rats. Age (Dordr).

Yano, S., Morino-Koga, S. y cols. (2011). Glucose uptake in rat skeletal muscle L6 cells is increased by low-intensity electrical current through the activation of the phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI-3K)/Akt pathway J Pharmacol Sci **115**:94-8.

Yip, C.C. y Ottensmeyer, P. (2003). Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor. J Biol Chem **278**:27329-32.

Zeigerer, A., Lampson, M.A., y cols. (2002). GLUT4 retention in adipocytes requires two intracellular insulin-regulated transport steps. Mol Biol Cell **13**:2421-35.

13. ANEXOS

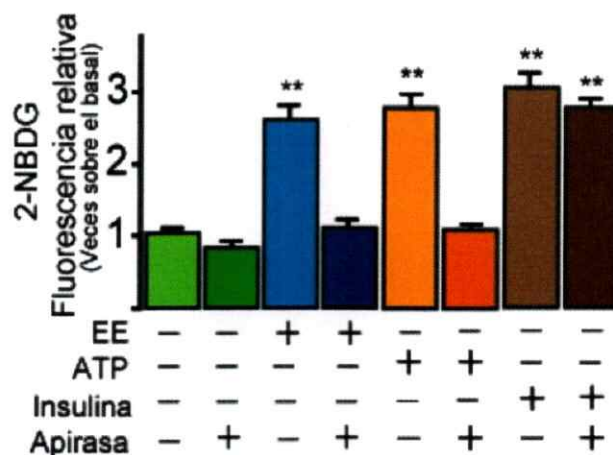


Figura S1 Apirasa es capaz de inhibir el aumento de la incorporación de glucosa 2-NBDG en miotubos de rata, inducido por estimulación eléctrica tetánica, ATP exógeno, pero no por insulina.

Miotubos de rata neonata en cultivo primario, fueron estimuladas eléctricamente con un estímulo tetánico (EE) (45 Hz. 1 ms, 400 pulsos), insulina (100 nM) o ATP exógeno (100 μ M). La incorporación de glucosa 2-NBDG fue realizado como se señaló en Materiales y Métodos. Los miotubos fueron preincubados en medio Krebs-Ringer con o sin Apirasa (2 U/mL) la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por estimulación eléctrica y ATP exógeno fue bloqueada totalmente, No afectando la incorporación de glucosa 2-NBDG inducida por insulina. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, El análisis estadístico fue realizado con la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por post-test de Bonferroni ** $P < 0,001$ vs del basal (no estimulado). Datos de 4 experimentos independientes, correspondiente a 80 células por condición.

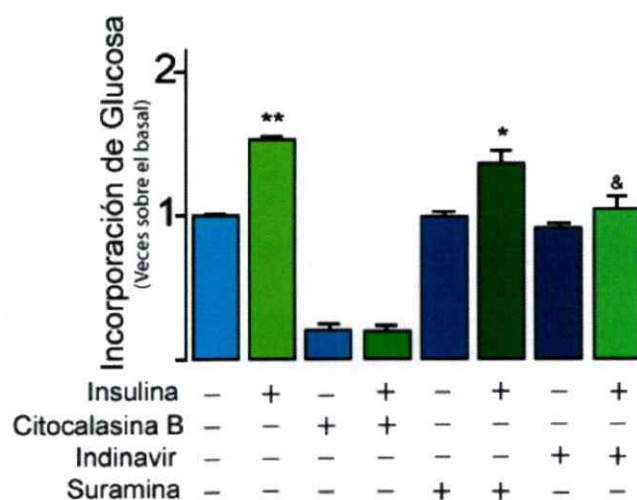


Figura S2 Efecto del insulina sobre la incorporación de glucosa ^3H -2DG.

En miotubos de rata neonata se ensayó la incorporación de ^3H -2DG en luego de la estimulación con Insulina (100 nM), control positivo. No se observa ningún efecto sobre la incorporación de ^3H -2DG en miotubos preincubados con suramina (100 μM), 30 min previo y durante la estimulación. En cambio en miotubos estimulados con insulina (100 nM), se observa un efecto inhibitorio casi completo en el transporte de ^3H -2DG en miotubos preincubados con indinavir (100 μM). Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, ** $p < 0,001$ respecto del basal (no estimulado); & $p < 0,01$, respecto a la condición estimulada con insulina. Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.

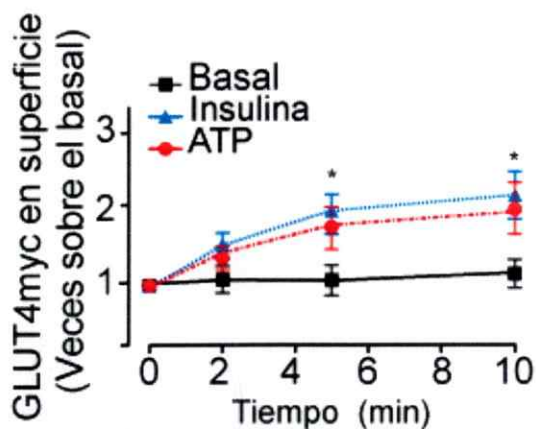


Figura S3. La exposición exofacial de epítipo *myc* dependiente de ATP exógeno en mioblastos L6GLUT4myc-hAS160.

Mioblastos L6GLUT4myc-hAS160, se estimularon con ATP o insulina, induciendo la translocación de los transportadores a la superficie celular, los transportadores GLUT4myc fueron marcados con un anticuerpo anti-*myc*. La cantidad de GLUT4myc en la superficie celular a los tiempos señalados fue determinada usando el ensayo de absorbancia OPD y los valores fueron expresados como veces respecto del nivel de GLUT4myc en la superficie celular. Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, * $p < 0,01$ respecto del basal (no estimulado). Determinado por test ANOVA seguido por post-test de Bonferroni. Datos de 4 experimentos independientes.