

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional
Unidad Zacatenco
Departamento de Farmacología

Determinación del Papel de las Especies Reactivas de Oxígeno y de
Nitrógeno Sobre la Translocación del GLUT4 en un Modelo de Nado
Forzado en Ratas Wistar

Tesis

– *Que presenta* –

Octavio González Lugo

Para Obtener el grado de

Maestro en Ciencias

en la especialidad de Farmacología

Directores de la Tesis

Dr. Jorge Alberto Sán-
chez Rodríguez

Dra. María del Car-
men García García

México DF

Diciembre 2014

Índice

1	Introducción	2
1.1	Músculo Esquelético	2
1.1.1	Estructura del Músculo Esquelético.....	2
1.1.2	Función del Músculo Esquelético	4
1.1.3	Actividad Física y Músculo Esquelético.....	6
1.2	Transporte de Glucosa.....	8
1.3	Especies reactivas como segundos mensajeros.....	12
1.3.1	Transducción de Señales	12
1.3.2	Modulación del Acople Excitación Contracción	13
1.3.3	Mecanotransducción.	14
1.4	Actividad Física y GLUT4.....	15
1.5	Hipótesis.....	18
2	Objetivos	20
2.1	General	20
2.2	Particulares	20
3	Materiales y Métodos.....	22
3.1	Animales.....	22
3.2	Protocolo de Nado Forzado.....	22
3.3	Protocolo de fraccionamiento del músculo esquelético	23
3.4	Western Blot	24
3.5	Disociación de Fibras	25
3.6	Microscopía de Fluorescencia.....	26
3.6.1	Especies Reactivas de Oxígeno	26
3.6.2	Señales de Fluo-3 y cálculo del calcio libre intracelular	28
3.7	Estadística.....	28
4	Resultados	31
4.1	Protocolo de Nado.....	31
4.2	Translocación del GLUT4.....	31
4.3	Microscopía de Fluorescencia.....	34
4.3.1	Producción de Especies Reactivas de Oxígeno	34
4.3.2	Señales de Fluo-3	34
4.3.1	Señales transitoria de calcio libre intracelular	35
4.4	Papel de las Especies Reactivas Sobre la Translocación del GLUT4.....	37
5	Discusión.....	40

5.1	Protocolos de Actividad Física.....	40
5.1.1	Nado Forzado.....	41
5.2	Translocación del GLUT4.....	42
5.3	Generación de Especies Reactivas de Oxígeno.....	42
5.4	Transitorios de Calcio	43
5.5	Papel de las Especies Reactivas Sobre la Translocación del GLUT4.....	46
6	Conclusiones	49
7	Perspectivas.....	51
8	Referencias.....	I

Índice de Figuras

Figura 1: Estructura del músculo esquelético tomado de (Zatsiorsky & Prilutsky n.d.)..	2
Figura 2: Estructura de la Sarcómera.....	4
Figura 3: Proteínas que constituyen a la sarcómera tomado de (Hoshijima, 2006).....	5
Figura 4: Ciclo quimio mecánico del acortamiento de la sarcómera. Tomado de (Spudich 2001).....	6
Figura 5: Dendrograma de los miembros de la Familia GLUT.....	8
Figura 6: Vista Superior y frontal de la estructura cuaternaria del transportador de glucosa GLUT4.....	10
Figura 7: Mecanismo de síntesis del óxido nítrico por la sintas del oxido nítrico. Tomado de (Alderton et al., 2001).....	11
Figura 8: Mecanismo de acción de las especies reactivas de oxígeno como segundos mensajeros tomado de (Berridge 2007).....	13
Figura 9: Generacional de especies reactivas dependientes de la deformación mecánica tomado de (Prosser et al. 2013).....	14
Figura 10: Vías de señalización involucradas en la translocación del GLUT4.....	16
Figura 11: Protocolo de fraccionamiento del músculo esquelético.....	24
Figura 12: Protocolo de Western Blot.....	25
Figura 13: Obtención y análisis de la señal transitoria de calcio.....	27
Figura 14: Obtención y análisis de los registros de fluorescencia.....	29
Figura 15: Proceso de Selección de animales.....	31
Figura 16: Contenido de GLUT4 a nivel de membrana plasmática.....	32
Figura 17: Contenido de GLUT4 a nivel de fracción microsomal.....	33
Figura 18: Cinética de producción de especies reactivas de oxígeno.....	33
Figura 19: Generación de especies reactivas de oxígeno.....	34
Figura 20: Anchura media y velocidad de caída.....	35
Figura 21: Anchura media de la señal de Fluo-3.....	36
Figura 22: Velocidad de caída de la señal transitoria de calcio libre intracelular.....	36
Figura 23: Motivos de regulación redox en proteínas de la familia TBC.....	37
Figura 24: Presencia del motivo de unión a caveolina en distintas proteínas de la familia TBC.....	38
Figura 25: Histograma del tiempo de nado normalizado.....	41
Figura 26: Cambio en la señal transitoria de calcio debido al tratamiento con NAC..	44
Figura 27: Cinética de activación de NCX dependiente del calcio intracelular en miocitos aislados de conejo según lo reportado en (Ginsburg et al. 2013).....	45
Figura 28: Papel de las especies reactivas en la contracción del músculo esquelético	46
Figura 29: Mecanismo maladaptativo propuesto.....	52

Tablas

Tabla 1: Etapa de Selección.....	23
Tabla 2: Diluciones de los anticuerpos ocupados.....	25

El siguiente trabajo de maestría fue realizado bajo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) mediante la beca de maestría CVU 511535

A mi familia y amigos

Determinación del Papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno sobre la translocación del GLUT4 en un modelo de nado forzado en ratas Wistar

Introducción

El GLUT4 es un transportador de glucosa expresado en el músculo esquelético y en adipocitos (Duehlmeier et al., 2007), éste juega un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa en estos tejidos. A su vez se ha encontrado que tiene un papel muy importante en el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Aoi et al., 2013). Una de las características del GLUT 4 es que este transportador se encuentra internalizado en vesículas intracelulares y es movilizado a la membrana debido a diversos estímulos, este proceso se conoce como translocación. Entre los estímulos que generan la translocación del GLUT4 se encuentran la insulina (Karlsson, 2006) y la actividad física (Terada et al., 2001).

Sin embargo, tanto la actividad física como la diabetes tipo 2 tienen en común un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Furukawa et al., 2004; Radak et al., 2013), por lo cual es necesario conocer el papel que juegan las especies reactivas sobre el proceso de la translocación del GLUT4.

La anterior problemática es abordada en el presente trabajo de tesis mediante un protocolo de nado forzado como modelo de ejercicio. Y para evaluar el papel de las especies reactivas se administró *N*-acetilcisteína (NAC) que es un atrapador de especies reactivas de oxígeno (ROS) y L-NAME que es un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico para evaluar el papel de las especies reactivas de nitrógeno.

Metodología

Protocolo de Nado

El protocolo de nado se divide en 3 fases, la primera es una fase de selección que tiene una duración de 4 días en los cuales se somete al animal a la situación experimental con el objetivo de aclimatarlo y seleccionar a los animales con mayor actividad; una vez seleccionados los animales son asignados a sus respectivos tratamientos: NAC 150 mg/kg en ambas condiciones, actividad física y control sedentario o L-NAME 10 mg/kg de la misma forma. La segunda fase consta de 5 días en los cuales el animal descansa con el objetivo de eliminar cualquier adaptación surgida por la fase de selección, en la tercera y última etapa los animales seleccionados nadan durante 2 días, 5 rondas de 17 minutos de nado y 3 minutos de

descanso cargando una pesa del 5% de su peso corporal.

Western Blot

Al terminar la última ronda de nado los animales son sacrificados y los músculos epitrochlearis y EDL son disecados y congelados en nitrógeno líquido, posteriormente mediante varios pasos de centrifugación, según lo reportado en (Ebersbach-Silva et al., 2013), la fracción de membrana plasmática y microsomal son aisladas y cuantificadas mediante el método de Bradford, posteriormente 20 µg de proteína son cargados en geles de acrilamida al 14% en el caso de caveolina y GLUT4, una vez terminada la separación son transferidas a una membrana de nitrocelulosa y bloqueadas con leche al 4.5% en PBS por una hora, al finalizar el bloqueo se incuban con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche y posteriormente con el anticuerpo secundario por una hora y las bandas son visualizadas por medio de película expuesta a las señales luminiscentes de las membranas.

Microscopia de Fluorescencia

Al término de la última ronda de nado los animales son sacrificados y los músculos interossei y FDB son disecados e incubados en una solución de colagenasa 3 mg/mL por 45 min, posteriormente los músculos son disociados mecánicamente y cargados con el indicador M-H2DCFDA por 30 minutos en el caso de producción de especies reactivas o con Fluo-3AM por 60 minutos en el caso de los transientes de calcio. Esta señal de Fluo-3 puede ser convertida a calcio libre intracelular según lo reportado por Caputo et al., 1999.

Resultados

Mediante Western Blot de la fracción de membrana plasmática, se encontró que se generaba un aumento en el contenido de GLUT4 debido a la actividad física, mientras que el tratamiento con NAC generaba una reversión en el aumento de GLUT4, este efecto no fue observado en los tratamientos con L-NAME. Una forma de observar si este aumento es debido a un aumento en la translocación del GLUT4 o a un aumento en la expresión, es evaluar el contenido de GLUT4 mediante Western Blot en la fracción

microsomal, que contiene los reservorios de GLUT4, donde se encontró que la actividad física genera una disminución del contenido de GLUT4 en la fracción microsomal, mientras que con el tratamiento con NAC no se observaba. Lo mismo con L-NAME no se observaron cambios asociados con la translocación por lo que se sugiere un aumento en la expresión.

En cuanto a la generación de ROS, se encontró a nivel de citoplasma que la actividad física genera un aumento su producción, mientras que los tratamientos, tanto NAC como L-NAME generan una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno asociadas a la actividad física. Con respecto a la señal de Fluo-3, se encontró que la actividad física generó una disminución en la anchura media (que es el tiempo entre dos puntos de fluorescencia que tienen una magnitud igual a la mitad de la amplitud de la señal en su fase de acenso y descenso) y este efecto no se producía con el tratamiento con NAC, mientras que el tratamiento con L-NAME evitaba la disminución de la anchura media pero en menor medida. El análisis del calcio libre intracelular arrojó resultados congruentes en relación con lo observado con la anchura media. La actividad física generó un aumento en la velocidad de caída (que se obtienen al ajustar una exponencial simple desde el punto máximo del registro de calcio libre intracelular) y el tratamiento con NAC evitó este efecto. En lo relativo al tratamiento con L-NAME se obtuvieron resultados similares pero de menor magnitud.

Discusión

El presente trabajo parte de las observaciones realizadas por (Pinheiro et al., 2010) ¿????en ese trabajo se observó en cultivos celulares incubados con NAC que se genera una disminución en la expresión del GLUT4. Sin embargo en ese trabajo no se estudió el efecto en la translocación del GLUT4 y así como tampoco el papel de las especies reactivas. Además, no existen trabajos previos empleando el modelo animal completo relacionado con el GLUT4 y su regulación por las ROS. Mediante Western Blot encontramos que la actividad física genera una relocalización de las vesículas de GLUT4 y el tratamiento con NAC inhibe este efecto. Mientras que el tratamiento con L-NAME sugiere un aumento en la expresión del GLUT4.

El efecto observado del NAC sobre la translocación del GLUT4 sugiere que las especies reactivas de oxígeno tienen un efecto benéfico en la fisiología del músculo esquelético bajo mis condiciones experimentales.

En cuanto a la producción de especies reactivas de oxígeno se encontró que se producen de forma exacerbada por ambos tratamientos (NAC, L-NAME) en nuestras mediciones experimentales. Tomando como base lo observado por Medved et al. (2004) donde encuentran un aumento en el contenido de NAC en plasma, el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel de citoplasma que observamos, podría deberse a un aumento en el aumento en el estado reducido extracelular desplazando el equilibrio de Gibbs-Donnan. Aunque este efecto compensatorio sería de esperarse en el tratamiento con NAC debido a su capacidad antioxidante, la falta de aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno debido a la actividad física en el tratamiento con L-NAME sugiere que hay un desacople en la síntesis de óxido nítrico (Alderton et al., 2001) y este desacople es una de las fuentes de especies reactivas de oxígeno.

A nivel funcional, el tratamiento con NAC anula la elevación en la velocidad de caída del calcio intracelular producido por la actividad física, además de disminuir la amplitud de la señal de calcio intracelular. Al tenerse una elevación menor en los niveles de calcio intracelular, es posible que se tenga un retraso en la activación de los diversos amortiguadores y bombas encargadas en la fase de descenso de los registros transitorios de calcio intracelular. Finalmente, el tratamiento con L-NAME origina un ligero incremento en la velocidad de caída del calcio intracelular durante potenciales de acción y este valor no se ve afectado por la actividad física.

Conclusiones

- La actividad física promueve un aumento en la translocación del GLUT4 y éste es dependiente de las especies reactivas de oxígeno
- El tratamiento con L-NAME genera un aumento en la expresión del GLUT4 sugiriendo un control en la expresión mediada por las especies reactivas de nitrógeno.
- La producción de especies reactivas de oxígeno asociadas a la actividad física da lugar a que los transitorios de calcio sean más breves y un aumento a la velocidad de caída asociada a potenciales de acción.

Role of nitrogen and oxygen reactive species in GLUT4 translocation based in forced swimming model in Wistar rats

Introduction

Glucose homeostasis is regulated by GLUT4 both in skeletal muscle and adipocytes (Duehlmeier et al., 2007). This glucose carrier plays a key role in the development of type 2 diabetes (Aoi, et al., 2013). The process by which GLUT4 is re-located to the plasma membrane by different stimuli is known as translocation. Some of these stimuli are insulin (Karlsson et al., 2005) and physical exercise (Terada et al., 2001).

However, it has been reported that an increase in the generation of reactive species occurs in response to physical exercise and also as a precursor of type 2 diabetes (Furukawa et al., 2004; Radak, et al., 2013). Although these reports are contradictory, it is of great importance to know the role of reactive species in the translocation of the GLUT4 carrier.

This controversy is addressed in this thesis work using a swimming protocol to evaluate the role of reactive oxygen species (ROS) N-acetyl cisteine (NAC, a ROS scavenger) was administrated. In order to evaluate the role of reactive nitrogen species, L-NAME (a nitric oxide synthase inhibitor) was administrated.

Methodology

Swimming Protocol.

Following the recommendations of the American Physiological Association, a 3 phase swimming protocol was established. The first phase had the intention to familiarize the animal with experimental conditions, and to select the most active animals. In order to eliminate any adaptation in the animal as a result of phase one, a five day rest was allowed to all animals, that completes phase two. At the end of the second phase, the swimming protocol is initiated. This protocol consists of 17 min of continuous swimming with a 5% load attached to their tail and 3 min rest which constitutes a swimming bout, and the protocol is completed after 5 swimming bouts. The swimming protocol is repeated twice with an interval of 24 h.

Western Blot.

After the last swimming bout, the animals were sacrificed by a lethal dose of pentobarbital. Epitrochlearis and EDL muscles from these animals were dissected and frozen in liquid nitrogen. Plasma and microsomal fractions from these muscles were isolated as reported by Ebersbach-Silva et al.,(2013) and total protein

content was determined by Bradford method. SDS-PAGE was performed in 14% acrylamide gels loaded with 20 mg of protein, and the protein content was transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with 4.5% non fat dry milk. Once the membranes were blocked, incubation with primary antibody was performed over night and secondary antibody incubation was performed for an hour. Chemiluminescence signal was detected using a light sensitive film.

Fluorescence Microscopy.

After the last swimming bout, the animals were sacrificed by a lethal dose of pentobarbital, and the interossei and FDB muscles were dissected and incubated in a 3 mg/mL solution of type 2 collagenase for 45 min. Once the incubation time was completed, the muscles were mechanically dissociated in order to isolate skeletal muscle fibers. These fibers were incubated with M-H2DCFDA to record ROS production, or with Fluo-3AM for measuring calcium transients. Intracellular free calcium was calculated by a mathematical modeling approach as reported by Caputo et al., (1999)

Results

Western blot analysis showed that physical exercise increased the abundance of the GLUT4 carrier in the plasma membrane, and treatment with NAC prevented this effect. However, the treatment with L-NAME did not reverse this effect. In order to confirm that the change in abundance of GLUT-4 in plasma membrane is not due a change in its expression, the abundance of GLUT4 carrier was evaluated in the microsomal fraction which is a reservoir of intracellular GLUT4. Western blot analysis of the microsomal fraction showed that physical exercise generated a decrease in GLUT4 content suggesting a re-localization of the carrier. Moreover, the treatment with NAC was in agreement with the results obtained from plasma membrane fractions that showed an increase in the GLUT4 abundance. However, L-NAME treatment showed an increase in the expression of the GLUT4 carrier both in plasma membrane and microsomal fractions.

With regard to ROS cytosolic production, we observed that physical exercise generated an increase in ROS production in comparison to sedentary conditions. However, both treatments (NAC and L-NAME) inhibited physical exercise induced ROS production.

With respect to Fluo-3 signal, physical exercise generated a decrease in the half width (measured

as the time between two points with half of the Fluo-3 peak signal amplitude in the ascending and descending phase), while NAC treatment increased half width values. L-NAME treatment showed similar results but with lesser magnitude. Kinetic properties of intracellular free calcium (measured by fitting a single exponential decay of free calcium recordings) showed results that agree with half width measurements. Physical exercise generated an increase in the decay rate, that was prevented by NAC treatment. L-NAME treatment produced similar results but of lesser magnitude.

Discussion

The present work addressed observations made by Pinheiro et al., (2010) in which they found that NAC treatment in cell cultures of skeletal muscle decreased GLUT4 expression, nevertheless the role of ROS in GLUT4 translocation was not reported. My Western blot results demonstrated that re-localization of the glucose carrier under physical exercise was ROS dependent as NAC reversed this effect. L-NAME treatment showed that expression of GLUT4 was mediated by NO. The ROS dependent translocation mechanism under these experimental conditions suggests a beneficial role in the skeletal muscle physiology. Both treatments (NAC, L-NAME) generated an increase in ROS production under these experimental conditions. This could be a compensatory mechanism as a result of an increased extracellular reduced state or an increased plasma NAC levels as reported by

Medved et al., (2004). This increment in the extracellular reduced state could mediate a shift in the Donnan-Gibbs equilibrium.

This compensatory mechanism can be expected with NAC treatment. Nevertheless, since similar effect were observed with L-NAME treatment, a nitric oxide synthase dependent production of ROS is likely. This ROS production might be generated by an uncoupling in the synthesis of nitric oxide (Alderton, et al., 2001).

At a physiological level NAC treatment generated a decrease in the decay rate and the amplitude of calcium signal. This could lead to a gradual increase in the calcium level which could generate a delay in the activation of calcium buffers and transporters involved in the falling phase. Though L-NAME treatment generated a slight increase in the decay rate, it was not affected by the physical exercise.

Conclusions

- Physical exercise promotes the translocation of the GLUT4 carrier in a ROS dependent manner
- L-NAME treatment generates an increase in GLUT4 expression, suggesting a regulatory mechanism of expression that is nitric oxide-dependent
- The production of ROS associated to physical exercise associated ROS speed up the time course of intracellular calcium signals during action potentials

Introducción

1 Introducción

1.1 Músculo Esquelético

1.1.1 Estructura del Músculo Esquelético

El músculo está formado por un conjunto de fibras o células musculares que se acomodan una junto a otra. Estas fibras individuales se encuentran rodeadas por una membrana celular llamada sarcolema y ésta se encuentra recubierta por una lámina de colágena llamada endomisio. El endomisio se encuentra conectado con el sarcolema mediante la lámina basal que se cree juega un papel importante en la transmisión de la fuerza de la fibra muscular (Zatsiorsky & Prilutsky n.d.). De la unión de varias fibras musculares se forma un fascículo y se encuentran rodeadas por un tejido conectivo llamado perimisio. El músculo completo se encuentra rodeado por una lámina de tejido conectivo llamado epimisio. Este tejido ayuda a conectar músculos adyacentes (Purslow 2010).

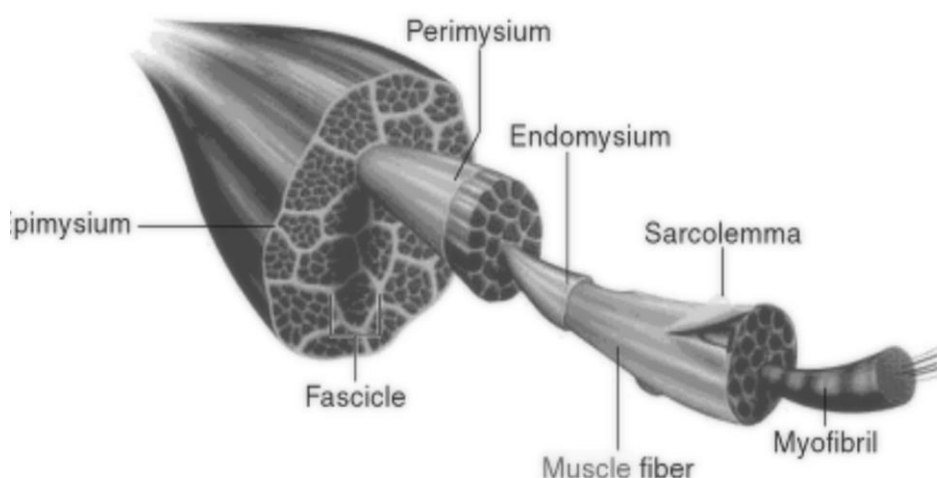


Figura 1: Estructura del músculo esquelético tomado de (Zatsiorsky & Prilutsky n.d.)

A nivel microscópico se pueden observar una serie de bandas que se repiten a lo largo de toda la célula muscular. Este patrón repetido de bandeo que se observa contiene a la unidad funcional del músculo esquelético la sarcómera (Laing 2009), la cual se encuentra delimitada por dos estructuras conocidas como la línea Z. Entre estas dos subestructuras se encuentran las bandas A e I,

además de la zona H. Cada una de estas subestructuras se encuentra caracterizada por el tipo de proteínas que se encuentran entre ellas

A nivel de la línea Z se encuentra la estructura encargada de la transmisión de la energía mecánica generada por la interacción entre los filamentos de actina y miosina (Hoshijima 2006). Entre las proteínas encargadas de generar la estructura y dar estabilidad a este complejo se encuentran CapZ y α -actinina. CapZ tiene como función suspender la elongación y darle estabilidad a los filamentos de actina (Papa et al. 1999). Mientras que la α -actinina juega un papel muy importante en la orientación de los filamentos de actina (Salucci et al. 2014).

La zona H se encuentra formada principalmente por filamentos gruesos. Estos filamentos se conforman de miosina y de diversas proteínas con sitios de unión a la miosina. De estas proteínas de unión se ha encontrado que MyBP-C juega un papel muy importante en la estabilidad de la sarcómera. Mientras que la miosina es un complejo de alto peso molecular, de alrededor de 500kDa. Esta proteína puede dividirse en dos péptidos similares pesados (MHC) y dos péptidos similares ligeros (MLC1, MLC2) (England & Loughna 2013). Los péptidos pesados de la miosina, son proteínas en forma de bastón, un pequeño dominio esférico al final de la proteína les da esta forma particular. Este pequeño dominio esférico le permite interactuar con la molécula de actina, además de poseer actividad de ATPasa.

En la banda I se encuentra una mezcla de filamentos delgados y filamentos gruesos. Los filamentos delgados se encuentran formados por actina, tropomiosina y troponina. Estos filamentos son de aproximadamente 1 μ m de longitud. Una vez que los monómeros de actina se polimerizan y forman una estructura en doble hélice y a esta estructura se unen proteínas reguladoras como la tropomodulina, encargada de mantener la longitud de estos filamentos (Rao et al. 2014).

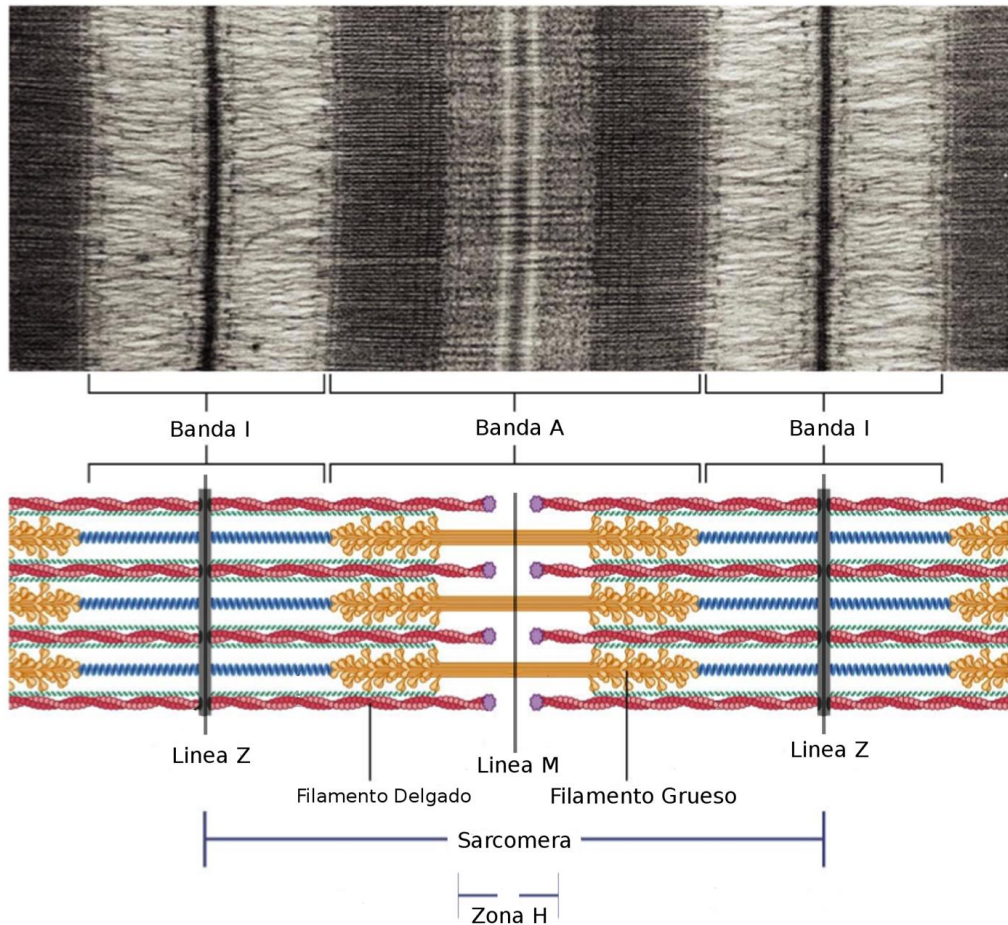


Figura 2: Estructura de la sarcómera

1.1.2 Función del Músculo Esquelético

La función primordial del músculo esquelético es la de generar movimiento. Este movimiento es producido cuando un músculo al contraerse acerca una articulación en movimiento hacia un hueso estacionario. Existen diversos tipos de movimiento que se puede producir debido a la contracción del músculo entre los cuales se encuentran:

- Flexión: Disminución en el ángulo entre dos huesos unidos por una articulación.
- Extensión: Incremento en el ángulo entre dos huesos unidos por una articulación
- Abducción: Movimiento hacia el exterior del centro de masa del cuerpo

- Aducción: Movimiento hacia el interior del centro de masa del cuerpo
- Rotación: Movimiento alrededor de un eje central

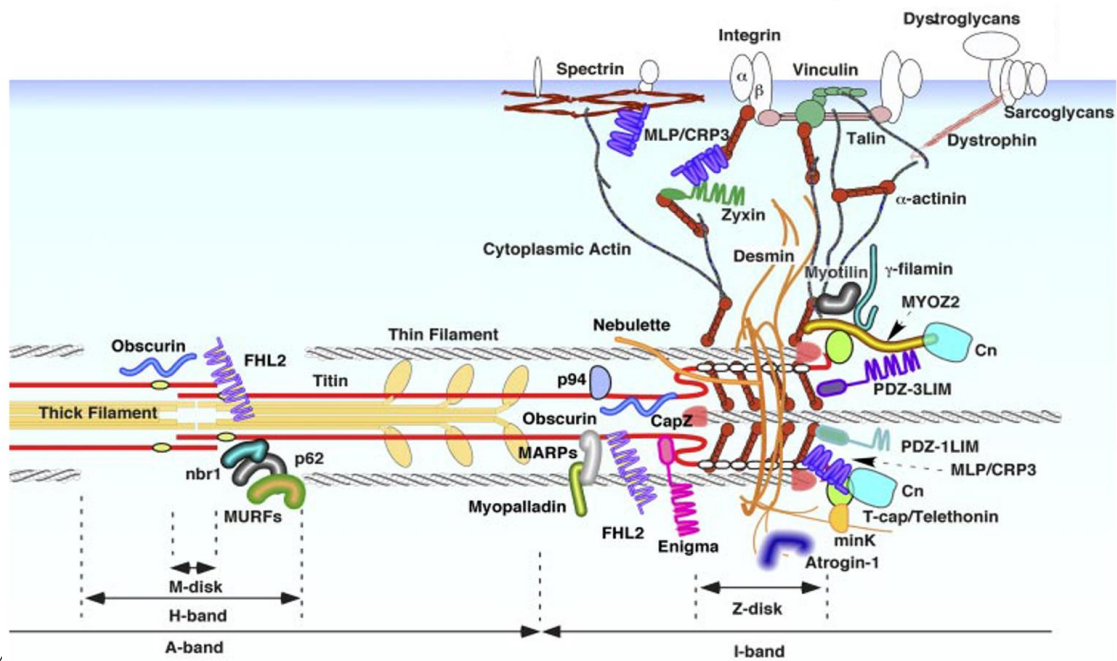


Figura 3: Proteínas que constituyen a la sarcómera tomado de (Hoshijima, 2006)

Este movimiento a nivel celular es generado debido a la contracción de la célula muscular esquelética. A nivel microscópico se puede observar que al generarse un potencial de acción en la fibra motora, éste estimula a la célula muscular esquelética, generando una liberación transitoria de calcio. Este aumento transitorio en los niveles de calcio tiene una función de segundo mensajero, activando diversas proteínas necesarias para la actividad contráctil (Blinks et al. 1978). A nivel de la sarcómera la liberación de calcio genera cambios conformacionales en los filamentos delgados. Una de las proteínas blanco de esta regulación es la troponina. Esta proteína al interactuar con el calcio liberado sufre un cambio conformacional que facilita la interacción entre la actina y la miosina (Tanaka et al. 2013).

Una vez que se ha generado la liberación de calcio al citoplasma, la sarcómera sufre un acortamiento debido al deslizamiento de los filamentos delgados hacia la línea M. Este acortamiento en la sarcómera, tiene una relación con la fuerza

generada de esta contracción que alcanza un punto máximo aproximadamente a $2 \mu\text{m}$ (Edman 1966).

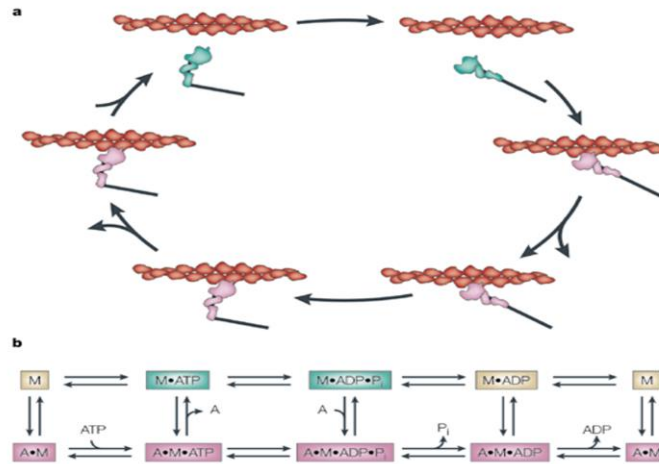


Figura 4: Ciclo quimio mecánico del acortamiento de la sarcómera tomado de (Spudich 2001)

A nivel molecular la contracción se debe a la interacción entre los filamentos delgados y los filamentos gruesos. Principalmente entre los complejos de actina y miosina. Estas dos proteínas se encuentran interaccionando en la banda A, al aumentar los niveles de ATP este complejo de Actina-Miosina se disocia y al disociarse se genera un cambio conformacional en la molécula de miosina aumentando la capacidad catalítica de ATPasa, al hidrolizarse el ATP se libera pirofosfato y esta hidrólisis facilita la formación del complejo Actina-Miosina-ADP. Al liberarse el ADP del sitio catalítico de la miosina, ésta sufre un cambio conformacional que genera el acortamiento en la sarcómera (Spudich 2001).

1.1.3 Actividad Física y Músculo Esquelético

La actividad física comúnmente denominada ejercicio, se define como el 60% de la capacidad máxima de trabajo que el atleta o individuo es capaz de realizar (Jetté et al. 1990). Actualmente se ha encontrado que la actividad física retrasa los efectos de diversas enfermedades (Brito 2009), además de

proporcionar una gran cantidad de beneficios en el caso de contraer alguna enfermedad degenerativa. Debido a que la actividad física genera un mayor estrés sobre el músculo esquelético éste sufre una diversidad de cambios como proceso adaptativo.

- Cambio en el tipo de fibra

Una de las primeras adaptaciones del músculo esquelético a la actividad física en describirse fue la transición del tipo de fibra muscular, de una fibra muscular glicolítica, a una fibra muscular oxidativa (Yan et al. 2011). Este cambio en el tipo de fibra es dependiente de la vía de señalización calcineurina-NFAT. Al darse una estimulación rítmica, los cambios en los niveles de calcio generan una activación de la calcineurina que desfosforila al factor transcripcional NFAT que promueve la expresión de una serie de genes presentes en las fibras oxidativas (Chin et al. 1998).

- Biogénesis de la mitocondria

Dado que la mayoría de las proteínas del metabolismo oxidativo se encuentran presentes en la mitocondria, al aumentarse su expresión, también se genera un aumento en el número de mitocondrias o biogénesis. Este efecto en la biogénesis de la mitocondria en el músculo esquelético fue por primera vez descrito en 1967 (Holloszy 1967). Actualmente se ha encontrado que este aumento se encuentra regulado por PGC1-alpha, que es una proteína que interactúa con diversos factores transcripcionales como PPARs, MEF2, NRF1 y 2 y TFAM (Lin et al. 2005). TFAM juega un papel importante en la transcripción de DNA mitocondrial, por lo tanto PGC1-alpha regula los genes mitocondriales presentes tanto en el núcleo celular como en la mitocondria (Wu et al. 1999).

- Especies Reactivas de Oxígeno

Otra de las consecuencias de la actividad física es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. Una de las primeras evidencias sobre el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y la actividad física data de 1970, donde se encontró que en modelos de actividad física en

animales y de ejercicio en humanos había un aumento en la peroxidación lipídica (Powers et al. 2011). Años más tarde en 1982, se encontró que esta producción de especies reactivas de oxígeno a nivel de músculo esquelético, podría generar un daño de tejido (Davies et al. 1982). Sin embargo estudios recientes han encontrado que las especies reactivas de oxígeno funcionan como segundos mensajeros en diversos tipos celulares (Soberman 2003; Apel & Hirt 2004), además de modular la contracción muscular (Aggarwal & Makielski 2013).

1.2 Transporte de Glucosa

Debido a que esta contracción del músculo esquelético es dependiente de ATP y por lo tanto de energía, la contracción muscular es un proceso metabólicamente muy demandante. Uno de los mecanismos por el cual subsana esta necesidad energética es mediante el aumento en el transporte de glucosa, el cual se encuentra regulada por una serie de transportadores de glucosa que se encuentran en la membrana plasmática, los transportadores pertenecientes a la familia GLUT contienen trece miembros distribuidos en tres clases (Augustin 2010).

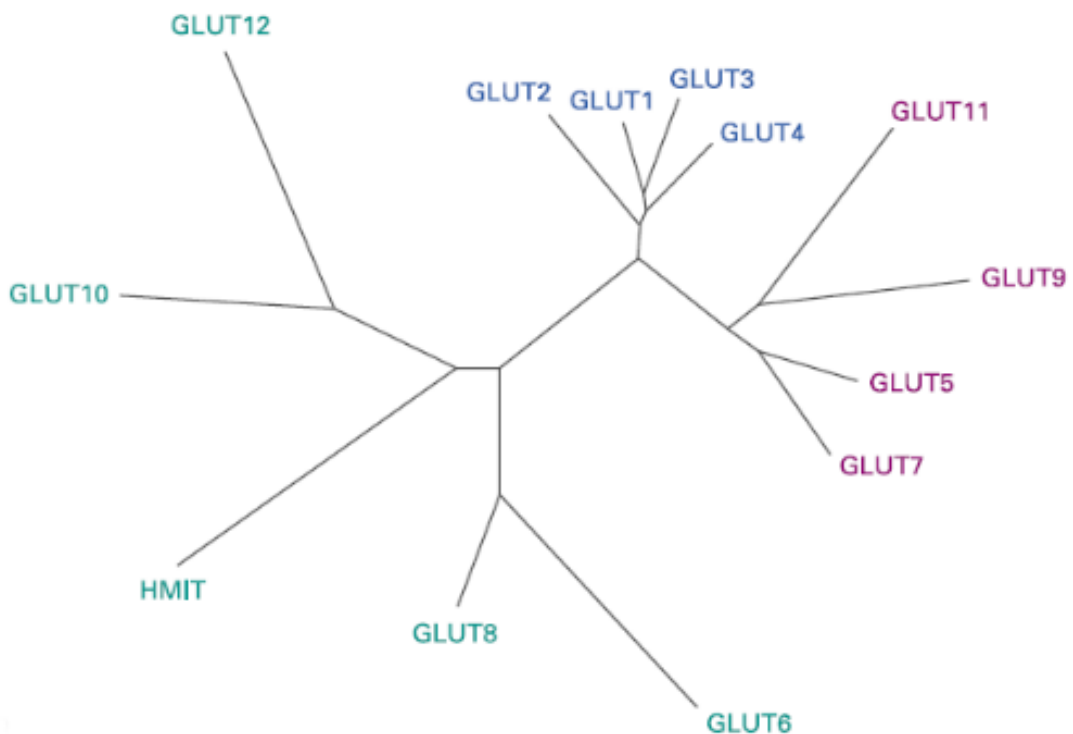


Figura 5: Dendrograma de los miembros de la familia GLUT

- Clase 1

Contiene a las isoformas de transportadores de glucosa GLUT1 a 4, y estos transportadores fueron los primeros en ser descubiertos y caracterizados (Augustin 2010), de los miembros de esta clase, las isoformas GLUT1 y GLUT4 se expresan en músculo esquelético (Duehlmeier et al. 2007).

- Clase 2

Esta clase contiene a los transportadores de glucosa GLUT5, GLUT7, GLUT9 y GLUT11, esta clase está caracterizada por tener la capacidad de transportar fructuosa, y esta capacidad asido ligada a la presencia del motivo NXV/NXI (Manolescu et al. 2007).

- Clase 3

En este grupo se encuentran los transportadores de glucosa GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 y HMIT, y a diferencia de los miembros de las dos clases anteriores, estos transportadores son caracterizados por un *loop* extracelular más pequeño y por lo tanto carecen de un motivo de glicosilación (Zhao & Keating 2007). Además estos transportadores presentan una mayor homología entre diversos transportadores de glucosa presentes en levaduras y bacterias.

Como se expuso anteriormente a nivel de músculo esquelético se expresan dos isoformas de estos transportadores, pertenecientes a la primera clase. Siendo la isoforma de mayor expresión el GLUT4 y en menor medida el GLUT1.

El GLUT1 es una proteína integral de membrana que se encarga de mantener los niveles basales de glucosa y el metabolismo del músculo esquelético (Scheepers et al. n.d.). Además de esa función en diversos tipos celulares el GLUT1 se encarga de sensar los niveles de glucosa (Augustin 2010). La falta de este transportador se conoce como el síndrome de deficiencia de GLUT1, este fue descrito por primera vez en 1991 y asociado en 1988 a la pérdida del

GLUT1 (Seidner et al. 1998). Este síndrome está caracterizado por convulsiones infantiles y un retardo en el desarrollo (De Vivo et al. 1991).

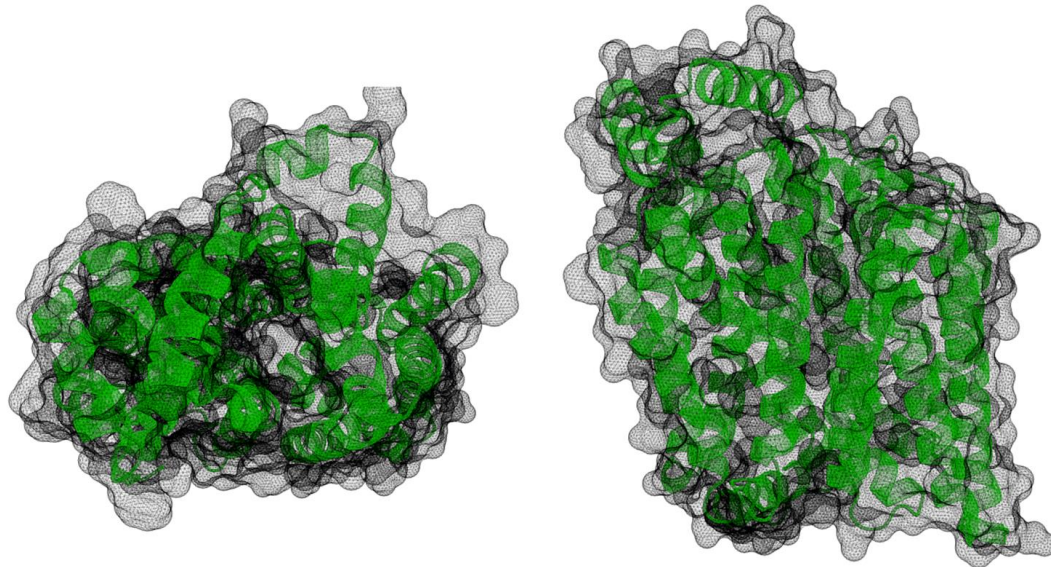


Figura 6: Vista superior y frontal de la estructura cuaternaria del transportador de glucosa GLUT4

Por otro lado el GLUT4 es una proteína de 12 pasos transmembranales que regula la homeostasis de la glucosa en el músculo esquelético y en adipocitos principalmente (Huang & Czech 2007). Clonado en 1989, el GLUT4 posee una afinidad por la glucosa similar al GLUT1 con un K_m alrededor de 5 mM (<biblio>). Además es capaz de transportar ácido ascórbico y glucosamina. Este transportador cuenta en su amino terminal con un motivo de dileucina (DEXLL) que le confiere una gran capacidad de tráfico vesicular a lo largo de distintos orgánulos (Bernhardt et al. 2009).

Una de las principales características del GLUT4 es que se encuentra sujeto a una estricta regulación, ya que se encuentra internalizado en vesículas dentro de la célula de músculo esquelético. Al generarse un estímulo que demande una gran cantidad de energía estas vesículas son movilizadas y fusionadas a la membrana plasmática. A este conjunto de mecanismos se le conoce como translocación, y ésta es resultado de diversos mecanismos. Uno de ellos y el

1.3 Especies reactivas como segundos mensajeros

A nivel intracelular el ambiente que se tiene está altamente reducido, es por eso que se ha desarrollado diversos mecanismos por los cuales se hace posible detectar cambios en el potencial redox intracelular (Berridge 2007). Estos sistemas son dependientes de dos tipos principales de especies reactivas; las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno. Este conjunto de segundos mensajeros se les conoce como el sistema de señalización X-ROS (Prosser et al. 2011) o señalización redox (Soberman 2003).

Las especies reactivas de oxígeno, son producidas principalmente por proteínas de la familia NOX, que se encuentran en la membrana plasmática y en el retículo sarcoplásmico y son capaces de generar el ion superóxido (Altenhöfer et al. 2012). Y además las especies reactivas de oxígeno pueden ser producidas como subproducto de la cadena respiratoria a nivel de la mitocondria (Kuznetsov et al. 2011). Mientras que las especies reactivas de nitrógeno son formadas debido a la interacción entre las especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico, generado éste por la sintasa del óxido nítrico que se encuentra en las caveolas y en la mitocondria (Berridge 2007).

1.3.1 Transducción de Señales

El mecanismo principal por el cual las especies reactivas modulan diversas proteínas de señalización es mediante su oxidación. Al oxidar a su proteína blanco estas sufren un cambio conformacional que les impide realizar su función (Berridge 2007). Esta oxidación se da principalmente sobre residuos de cisteína hiperreactivos, es decir que se encuentren en los alrededores de la proteína blanco (García-Santamarina et al. 2014). Este efecto modulador puede ser revertido mediante la acción de proteínas pertenecientes al sistema de defensa antioxidante como la Thioredoxina y la Glutaredoxina (Nordberg & Arnér 2001). Un ejemplo de esta modulación es PTEN que contiene residuos de cisteína hiperreactivos en su dominio catalítico. Al ser oxidada pierde su

actividad de fosfatasa aumentando el tiempo en que receptores de tirosina cinasa se encuentran fosforilados (Chiarugi & Cirri 2003).

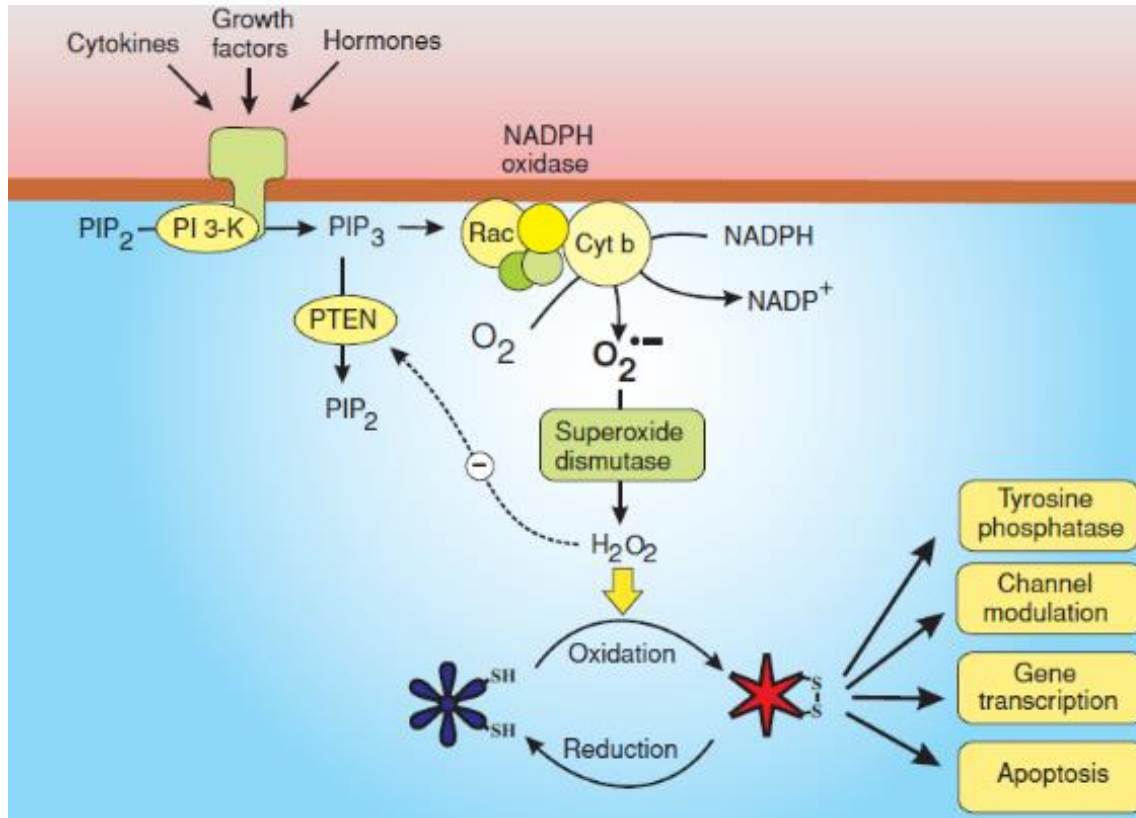


Figura 8: Mecanismo de acción de las especies reactivas de oxígeno como segundos mensajeros tomado de (Berridge 2007)

1.3.2 Modulación del Acople Excitación Contracción

Una de las propiedades de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno es la modulación de la excitabilidad de las células musculares sin afectar la maquinaria contráctil del músculo esquelético (Reid et al. 1993). Esta capacidad de las especies reactivas es debido a su capacidad de modular el manejo de iones Na⁺, Ca⁺⁺, K⁺ (Aggarwal & Makielski 2013), y se ha encontrado que inducen un aumento en las corrientes de Ca⁺⁺, Na⁺ y una disminución en las corrientes de K⁺ (Cerbai et al. 1991; Ma et al. 2005), mientras que de forma contradictoria en apariencia también se ha encontrado una disminución en los niveles de calcio intracelular asociados a una baja actividad del canal tipo L (Hammerschmidt & Wahn 1998).

Estos resultados aparentemente contradictorios en el papel de las especies reactivas de oxígeno pueden deberse al tipo de especie generada (Campbell et al. 1996), al sitio donde interaccionan y a la concentración utilizada en dichos estudios. Sin embargo debido a la capacidad de las especies reactivas de oxígeno de modular distintos canales es posible esperar que se regule esta excitabilidad mediante interacciones muy complejas.

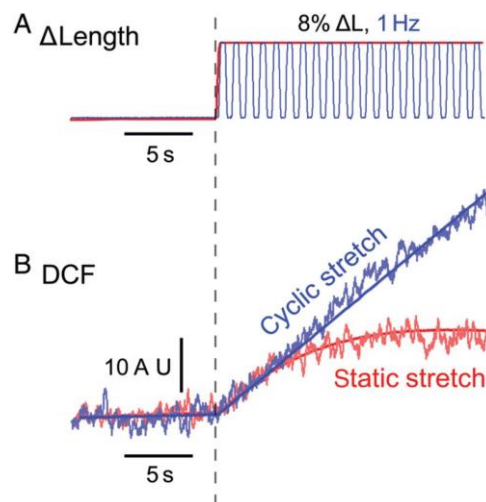


Figura 9: Generación de especies reactivas dependientes de la deformación mecánica tomado de (Prosser et al. 2013)

1.3.3 Mecanotransducción.

Un papel fundamental de las especies reactivas de oxígeno es la de sensar deformaciones mecánicas en diversos tipos celulares (Hsieh et al. 2014). En el músculo esquelético se ha encontrado que al someter a miocitos aislados a dos protocolos de deformación donde el primero era una deformación sostenida y el segundo una deformación transitoria, se encontró que se generaba un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, además este aumento dependía del protocolo de deformación aplicado (Prosser et al. 2013).

Como es de esperarse el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno genera una modulación a nivel del receptor a la ryanodina. En miocitos que fueron deformados mecánicamente, se encontró que esta deformación

generaba una liberación espontánea de calcio, y este efecto se perdía cuando estos miocitos eran tratados con *N*-acetilcisteína (Prosser et al. 2011).

1.4 Actividad Física y GLUT4

Debido a que la contracción muscular es un proceso dependiente de ATP y por lo tanto de energía y que la actividad física genera una mayor demanda de la capacidad contráctil del músculo esquelético, uno de los mecanismos por el cual el músculo esquelético subsana esta necesidad de energía es mediante el aumento en el transporte de glucosa. El aumento en el transporte de glucosa es dependiente de la intensidad de la actividad física, es decir a una mayor intensidad en la actividad física se tendrá un mayor transporte de glucosa (Richter & Hargreaves 2013).

El aumento en el transporte de glucosa es dependiente del contenido de GLUT4 en la membrana plasmática (Ren et al. 1994), y aun a niveles bajos de insulina en plasma se obtiene el aumento debido a la actividad física (Hayashi et al. 1997). Una de las vías que intervienen es la relacionada con la cinasa dependiente de AMP o AMPK. Al generarse un aumento en la demanda energética el ATP intracelular comienza a hidrolizarse por acción de la miosina y al disminuir los niveles de ATP y aumentar los niveles de AMP, AMPK es activada. Esta activación de AMPK genera la fosforilación de diversas proteínas efectoras, entre las que se encuentran AS160 y TBC1D1 (Sakamoto & Holman 2008). La fosforilación de estas proteínas favorece la translocación del GLUT4 (Trebbak et al. 2014).

Sin embargo, estudios recientes han encontrado que la translocación y expresión de este transportador de glucosa se encuentran reguladas por las especies reactivas de oxígeno. Esta regulación se ha descrito principalmente en el caso de la situación mal adaptativa. Cuando la producción de especies reactivas de oxígeno es mucho mayor a la capacidad del sistema antioxidante, se tiene una condición de estrés oxidativo (Radak et al. 2013), y éste se ha visto relacionado con diversos enfermedades, procesos degenerativos y envejecimiento (Ceriello & Motz 2004). Entre las enfermedades que son resultado de un estrés oxidativo se encuentra la diabetes tipo 2. Al tenerse niveles altos de glucosa se genera un estrés oxidativo y debido a esto se ha observado una disminución en el transporte de glucosa. Al mismo tiempo en diversos modelos animales de diabetes tipo 2 se ha encontrado un aumento en el estrés oxidativo que conlleva a una resistencia a la insulina, culminando en una translocación deficiente del GLUT4 (Aoi et al. 2013).

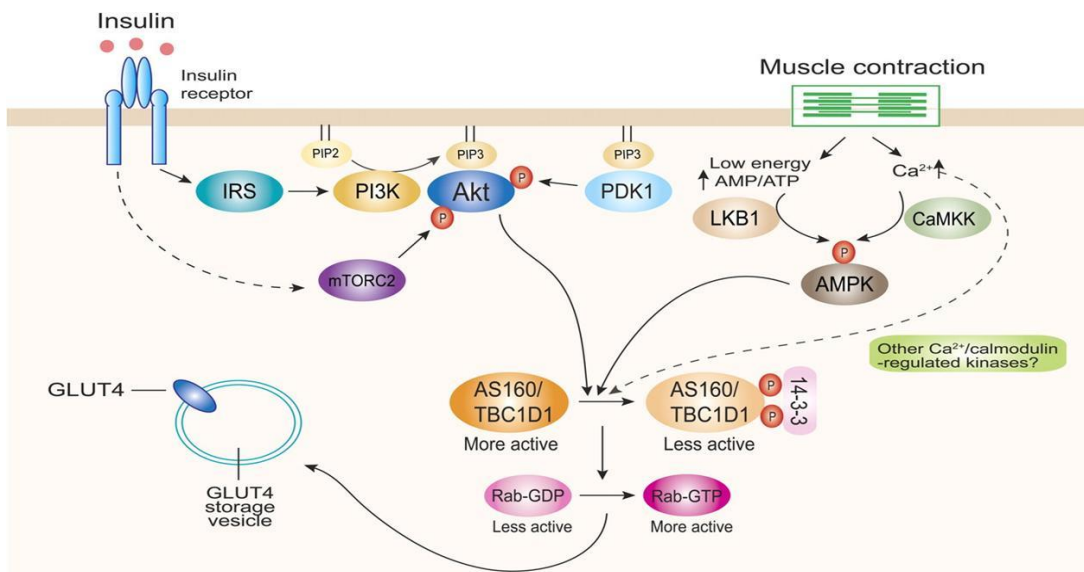


Figura 10: Vías de señalización involucradas en la translocación del GLUT4

Mientras que en el caso de la regulación en la translocación del GLUT4 que no lleva a un proceso mal adaptativo se tiene una menor cantidad de información, pues se tienen sólo dos ejemplos que muestran una regulación dependiente del estado redox del músculo esquelético.

- Expresión del GLUT4

En cultivos celulares de miotubos C2C12, tratados de forma intermitente con H₂O₂, se ha encontrado que la expresión del GLUT4 aumenta, en comparación con los grupos control. Posteriormente al ser tratados estos mismos cultivos con la *N*-acetilcisteína, que es un atrapador de especies reactivas de oxígeno no se observó un aumento en el contenido de GLUT4. Además de eso, al recibir las células C2C12 en cultivo un protocolo de estimulación eléctrica con el objetivo de simular la actividad física se encontró aumenta la expresión del GLUT4 y que de forma similar, al incubar estos cultivos con la *N*-acetilcisteína y recibir este mismo protocolo de estimulación eléctrica, el aumento en el contenido de GLUT4 no se observa (Pinheiro et al. 2010).

- Transporte de glucosa

En preparaciones de músculos aislados de rata que son sometidos a estiramiento se ha encontrado que la deformación aumenta el transporte de glucosa, mientras que al incubarse estos músculos aislados con distintos compuestos con actividad antioxidante y aplicar el mismo protocolo de estiramiento el aumento en el transporte de glucosa no se observa (Chambers et al. 2009).

Por lo tanto, es necesario conocer el papel que desempeñan tanto las especies reactivas de oxígeno como las especies reactivas de nitrógeno en la translocación del GLUT4 y establecer cuáles son los cambios en la capacidad funcional de las células musculares esqueléticas. Esto se abordará de manera experimental en ratas sometidas a un programa de ejercicio utilizando el protocolo de nado forzado. Para evaluar el papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno tanto en condiciones de control sedentario como asociadas a la actividad física los animales serán tratados con *N*-acetilcisteína (NAC) (150 mg/kg) un atrapador de especies reactivas de oxígeno, y con L-NAME (10 mg/kg) un inhibidor de la sintasa del óxido nítrico.

1.5 Hipótesis

La translocación del GLUT4 se encuentra regulada por las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

Objetivos

2 Objetivos

2.1 General

Determinar el papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno sobre la translocación del GLUT4.

2.2 Particulares

- Establecer un programa de actividad física mediante nado forzado.
- Determinar la expresión de GLUT4, a nivel de la proteína, en la fracción membranal tanto en condiciones de reposo como de la actividad física. Analizar el papel de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno sobre el efecto de la actividad física en la expresión de GLUT4.
- Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno en condiciones basales y asociadas al ejercicio.
- Caracterizar funcionalmente a la célula muscular esquelética mediante la medición de calcio intracelular por medio de indicadores fluorescentes.

Materiales y Métodos

3 Materiales y Métodos

3.1 Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200-220 g. Se les proporcionó alimento estándar *ad libitum*, con un ciclo de luz oscuridad de 12 h.

3.2 Protocolo de Nado Forzado

Existen en la literatura diversos protocolos para el estudio de la actividad física en animales, entre los más populares se encuentran los protocolos de caminata y de nado forzado. Después de una intensa búsqueda bibliográfica se optó por utilizar un modelo de nado forzado de tipo intermitente según lo reportado por (Smith et al. 2007), el cual ha sido utilizado para estudios relacionados con la expresión del GLUT4 en músculo esquelético. El protocolo de nado consta de 5 rondas de 20 minutos de duración, en los cuales el animal nada durante 17 minutos y posteriormente descansa 3 minutos.

Siguiendo las recomendaciones de la *American Physiological Society* (Anon 2006), antes de que se inicie el protocolo de nado forzado, se tiene una etapa de selección, en la cual el animal de experimentación se familiariza con el lugar y el horario en el cual se llevará a cabo el protocolo de nado forzado. Esta fase de selección y aclimatación tiene una duración de 4 días, en los cuales los animales son expuestos al nado forzado según la Tabla 1

En la segunda fase del protocolo de natación, los animales seleccionados se someten a un protocolo de nado de tipo intermitente, éste consta de 5 sesiones de nado y cada una consiste de 17 minutos de nado y 3 minutos de descanso. Durante el tiempo de nado los animales cargan un peso del 5% del peso corporal. Entre las fases de selección y del protocolo de natación se les da un descanso de 5 días con el objetivo de eliminar cualquier tipo de adaptación surgida de la primera fase del protocolo.

Al término de la última sesión de nado, los animales son sacrificados con una dosis letal de pentobarbital sódico (Sedalpharma) y los músculos *epitrochlear* (EPI), *extensor digitorum longus* (EDL), *flexor digitorum brevis* (FDB) e *interossei* (INO) son disecados, en el caso de los músculos EPI y EDL son congelados en nitrógeno líquido mientras que los músculos FDB e INO son utilizados para mediciones de producción de especies reactivas de oxígeno y transientes de calcio

Día	Descripción
1	A los animales se les permite explorar libremente la piscina donde se efectúa el protocolo de nado forzado, a la misma hora y lugar donde se realizarán las sesiones de nado
2	De forma similar al día anterior, a los animales se les permite explorar la piscina. Sin embargo, se coloca una cantidad de agua suficiente para obtener un nivel de agua de 3 cm
3	Se vuelve a incrementar el nivel del agua hasta un nivel de 15 cm, con este nivel les es posible tocar el fondo de la piscina y el cuerpo del animal se encuentra totalmente sumergido
4	En el último día se aumenta el nivel del agua hasta una altura de 35 cm y se coloca cada uno de los animales de forma separada por un intervalo de 17 minutos, y se registra el tiempo en que los animales permanecen activos, aquellos animales con mayor tiempo de actividad son usados para el protocolo de nado forzado, y los restantes son usados como controles sedentarios.

Tabla 1: Etapa de selección

3.3 Protocolo de fraccionamiento del músculo esquelético

Una vez que se disecaron los músculos EPI y EDL, fueron congelados en nitrógeno líquido. Posteriormente fueron pulverizados en presencia de 10 volúmenes de buffer de lisis (TRIS 7.4 10 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM) mediante el uso de un mortero y homogeneizados con un homogeneizador de tejido, una vez que fue homogeneizado el tejido se centrifugo a 800 g por 10

minutos y se recuperó el sobrenadante, la pastilla resultante fue resuspendida para una segunda centrifugación (800 g por 10 minutos) y se combinaron los sobrenadantes obtenidos, estos fueron sometidos a una centrifugación de 16100 RPM por 1 hora y la pastilla obtenida fue resuspendida en buffer de lisis y congelada en nitrógeno líquido para su posterior análisis, esta fracción corresponde a la membrana plasmática. El sobrenadante resultante de la centrifugación anterior fue sometido a una centrifugación de 30000 RPM por 1 hora 45 minutos y la pastilla obtenida fue re suspendida nuevamente en buffer de lisis y congelada en nitrógeno líquido para su posterior análisis, esta fracción corresponde a la fracción microsomal (Ebersbach-Silva et al. 2013).

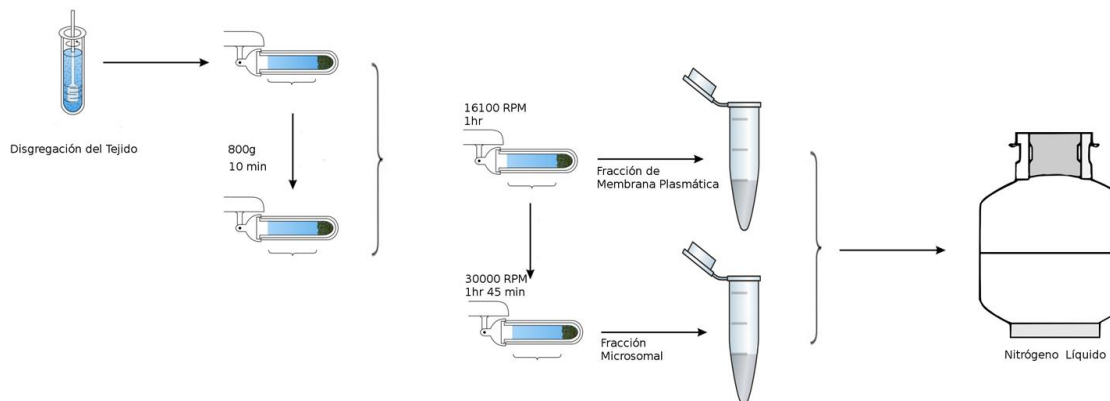


Figura 11: Protocolo de fraccionamiento del músculo esquelético

3.4 Western Blot

Una vez obtenidas las fracciones membranal y microsomal, se cuantifica el contenido total de proteínas mediante el método de Bradford. Posteriormente 20 µg de proteína son cargados a un gel de acrilamida al 14% (SDS-PAGE BioRad) para su separación y posteriormente son transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). Al término de la transferencia la membrana es bloqueada con una solución al 4.5% de leche en polvo en PBS. Posteriormente se incuba durante una noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente. Al término de la incubación la membrana es sometida a diversos lavados con una solución de 0.1% de Tween en PBS e incubada con

el anticuerpo secundario correspondiente por 1 hora. Nuevamente al término de la incubación la membrana es lavada con una solución de 0.1% de Tween en PBS y revelada mediante quimioluminiscencia. Las diluciones de los anticuerpos se muestran en la Tabla 2

Proteína	Dilución del anticuerpo Primario	Dilución del anticuerpo Secundario
GLUT4 (Abcam)	1:5000	1:100 000
Actina (Sigma)	1:1000	1:70 000
Caveolina	1:1600	1:100 000
GAPDH	1:10 000	1:70 000

Tabla 2: Diluciones de los anticuerpos ocupados

Una vez que las bandas son reveladas, el contenido es evaluado por densitometría de la banda correspondiente.



Figura 12: Protocolo de Western Blot

3.5 Disociación de Fibras

Una vez disecados los músculos FDB e INO son incubados en una solución de 3 mg/mL de colagenasa (Worthington Tipo 2) por 45 minutos a 35.5 °C, posteriormente estos músculos son disociados mecánicamente para obtener las fibras. Una vez obtenidas las fibras, estas son colocadas en cámaras e

incubadas con los indicadores correspondientes. En el caso de mediciones de producción de especies reactivas de oxígeno, las fibras se incuban con clorometil-2',7'-diclorofluorescein-diacetato 10 μ M (CM-H2DCFDA Invitrogen – Molecular Probes) por 30 minutos, mientras que en el caso de transientes de calcio se incuban con Fluo-3AM 5 μ M (Invitrogen – Molecular Probes) por 60 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, las fibras son lavadas con solución Ringer (NaCl 140 mM, KCl 6 mM, CaCl₂, 2 mM, MgCl₂, 3 mM, HEPES 5 mM, Glucosa 11 mM, pH=7.4) y se colocan en el microscopio donde se registra la fluorescencia emitida.

3.6 Microscopía de Fluorescencia

3.6.1 Especies Reactivas de Oxígeno

Una vez que las fibras musculares fueron cargadas con el colorante fluorescente, se colocan en la cámara de registro que se encuentra sobre la platina del microscopio (Nikon Eclipse TE300) y se les da un pulso de estimulación eléctrica a través de electrodos extracelulares y sólo aquellas fibras que responden a la estimulación eléctrica son empleadas para los registros de fluorescencia. Una vez seleccionadas las fibras musculares se les da un pulso de estimulación luminosa generado por un monocromador (Polychrome V Till Photonics) a una longitud de onda de 505 nm, este pulso es transmitido mediante fibra óptica y tiene una duración de 50ms, esto genera una señal de fluorescencia, que es adquirida mediante una cámara de alta resolución (EMCCD Andor iXon). Esto se repite a los 5, 10, 20 y 30 minutos para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno a lo largo del tiempo. Una vez que se tienen estos registros, la fluorescencia de cada célula es analizada con el software Imaging Workbench y normalizada con respecto a la obtenida al tiempo cero para obtener la producción relativa de especies reactivas de oxígeno (Figura 13)

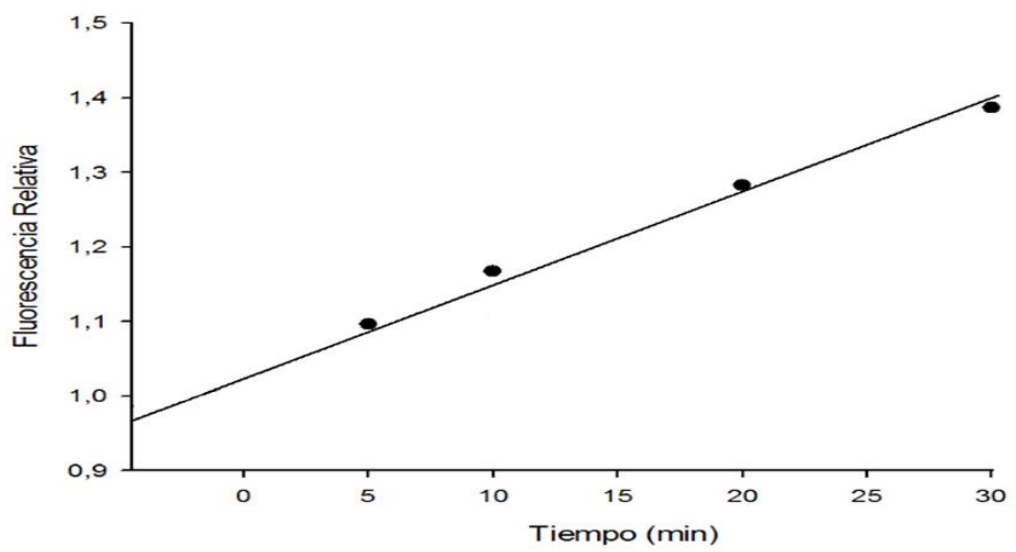
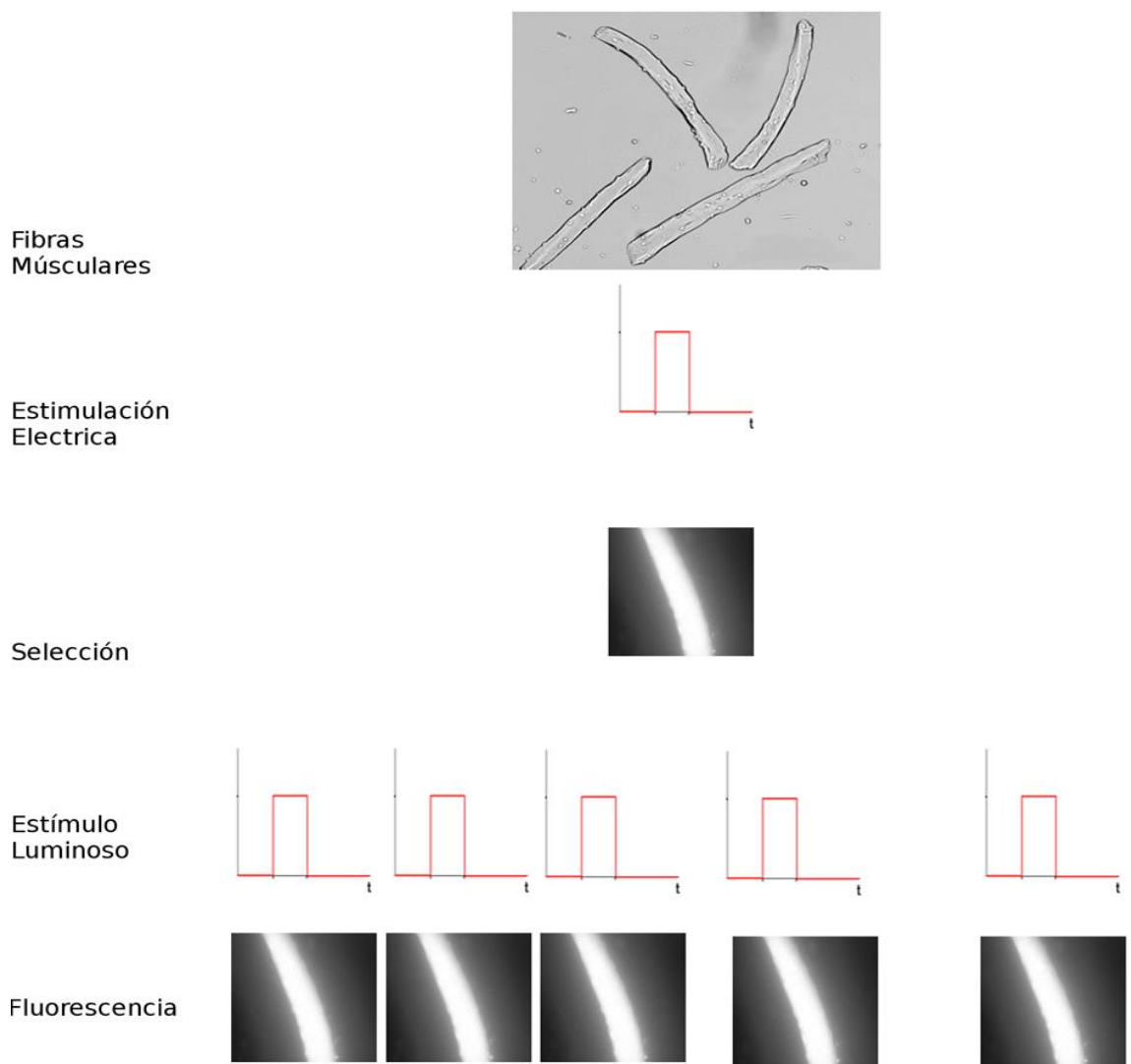


Figura 13: Obtención y análisis de los registros de fluorescencia

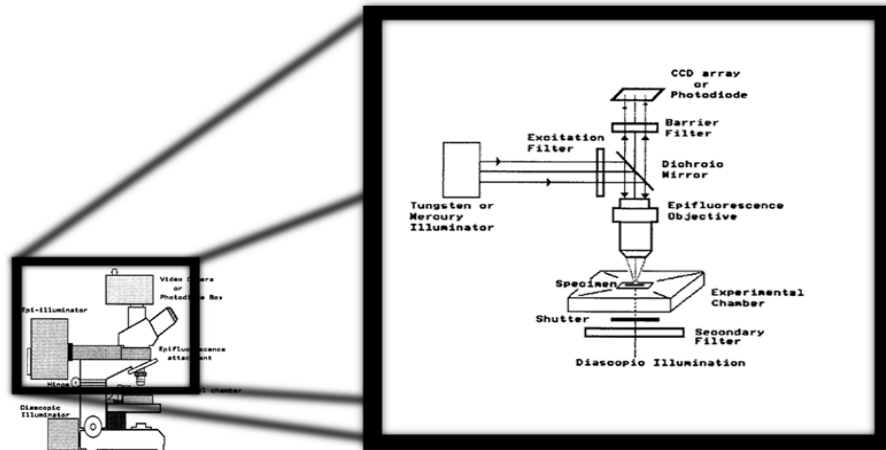
3.6.2 Señales de Fluo-3 y cálculo del calcio libre intracelular

Una vez que las fibras musculares fueron cargadas con el colorante se colocan en la cámara de registro del microscopio (Nikon Optihot) y se les da un pulso de estimulación eléctrica mediante electrodos extracelulares y sólo aquellas fibras que responden a la estimulación son empleadas para el registro de fluorescencia. Una vez que se han seleccionado las fibras de músculo esquelético estas son registradas de forma individual. Al recibir un pulso de estimulación la célula genera una liberación de calcio que interactúa con la molécula de Fluo-3, la cual al ser excitada a una longitud de onda de 485 nm (lámpara de mercurio Nikon) genera una señal de fluorescencia que se registra a una longitud de onda de 535 nm mediante un arreglo de fotodiodos (Figura 14). La concentración libre de calcio intracelular se obtuvo mediante una serie de ecuaciones matemáticas según lo reportado en Caputo et al. (1999). El cálculo de la fluorescencia basal se basó en lo reportado en Cheng et al. (1993). Tanto el cálculo de la fluorescencia basal como el calcio libre intracelular fueron programados en Scilab versión 5.5.

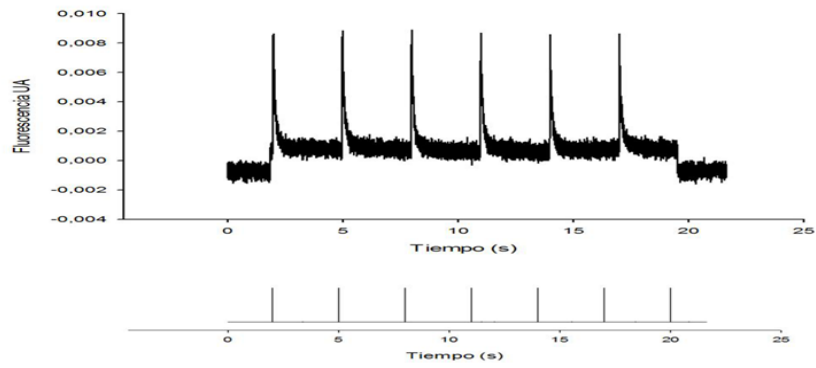
3.7 Estadística

Se utilizó ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni considerando que existe una diferencia significativa con una $p < 0.05$, usando Sigma Stat Systat Software Inc. versión 3.2.

Sistema de Adquisición



Registros Obtenidos



Procesamiento De Datos



Análisis



Figura 14: Obtención y análisis de la señal transitoria de calcio.

Resultados

4 Resultados

4.1 Protocolo de Nado.

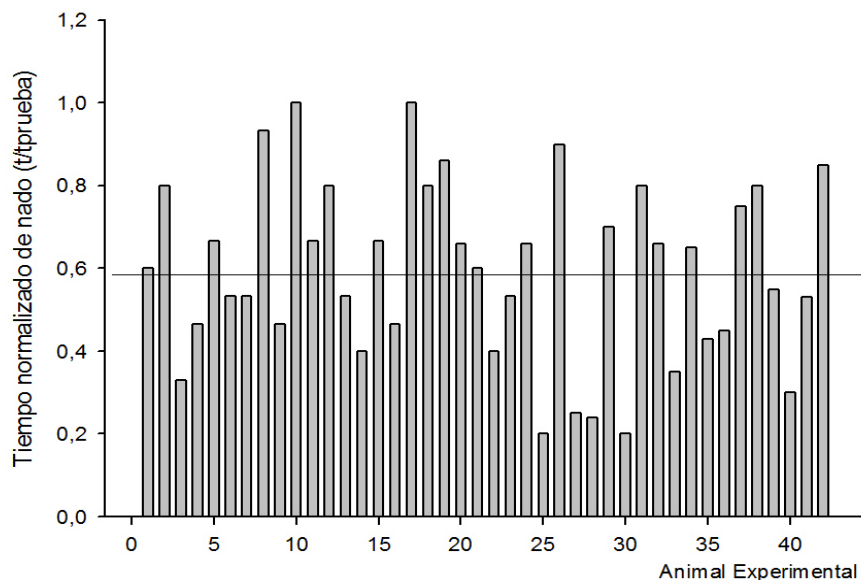


Figura 15: Proceso de selección de animales

De los animales que fueron expuestos al paradigma del nado forzado, se seleccionaron sólo aquellos que tuvieran un tiempo de actividad mayor al 60% en la prueba realizada el último día de la fase de selección estos fueron sometidos al protocolo final de nado forzado. Criterios similares han sido utilizados en diversos protocolos de actividad física para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Jetté et al. 1990). Aunque en el presente trabajo no se está trabajando con ningún tipo de situación patológica, este criterio es usado con el fin de evitar el sobre entrenamiento del animal involucrado.

4.2 Translocación del GLUT4

Mediante Western Blot se evaluó el contenido de GLUT4 de la membrana plasmática y se encontró que la actividad física genera un aumento similar a lo reportado en la literatura (Smith et al. 2007). Mientras que el tratamiento con la NAC evita este aumento en el contenido de GLUT4 asociado a la actividad

física. A diferencia de lo anterior el tratamiento con el L-NAME no revirtió el aumento en el contenido de GLUT4 en la membrana plasmática.

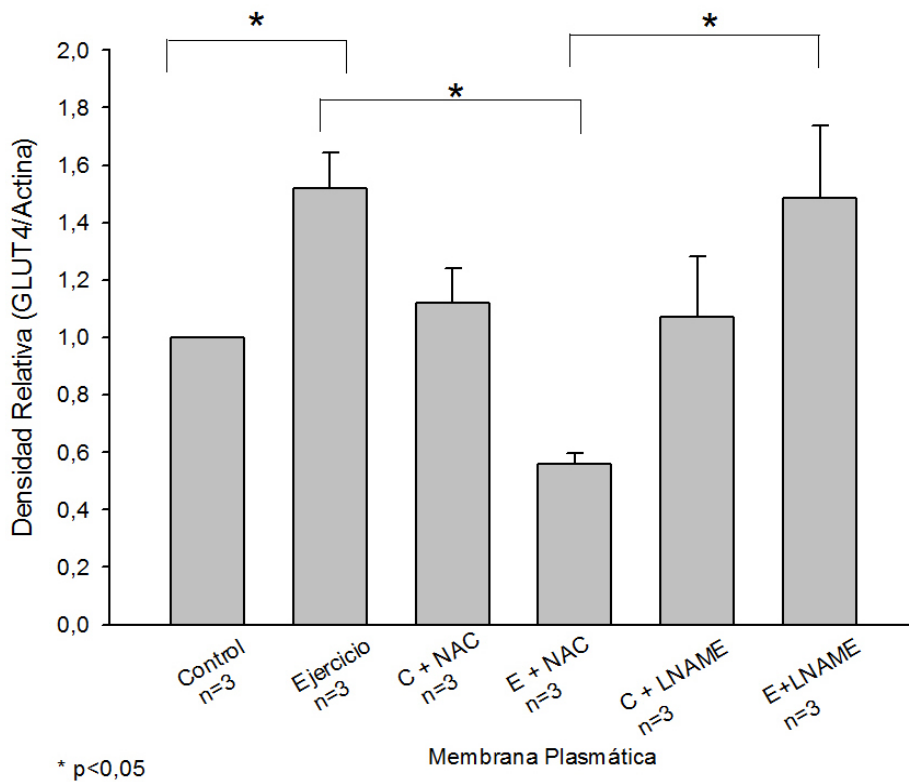


Figura 16: Contenido de GLUT4 a nivel de membrana plasmática

Una forma de determinar si el aumento en el contenido de GLUT4 en la membrana plasmática es debido a un aumento en la expresión global de la proteína, se determinó el contenido de GLUT4 en la fracción microsomal mediante Western Blot. Esta fracción contiene los reservorios intracelulares de GLUT4. Se encontró que la actividad física generaba una disminución en los reservorios intracelulares de GLUT4, mientras que el tratamiento con la NAC evitaba este efecto, sugiriendo que el ejercicio favorece la translocación del GLUT4 de la fracción microsomal a la membrana. Por otro lado, con el tratamiento con L-NAME no se observó la disminución, sino por el contrario, se observó una tendencia a aumentar el contenido de GLUT4 en la fracción microsomal como resultado del ejercicio.

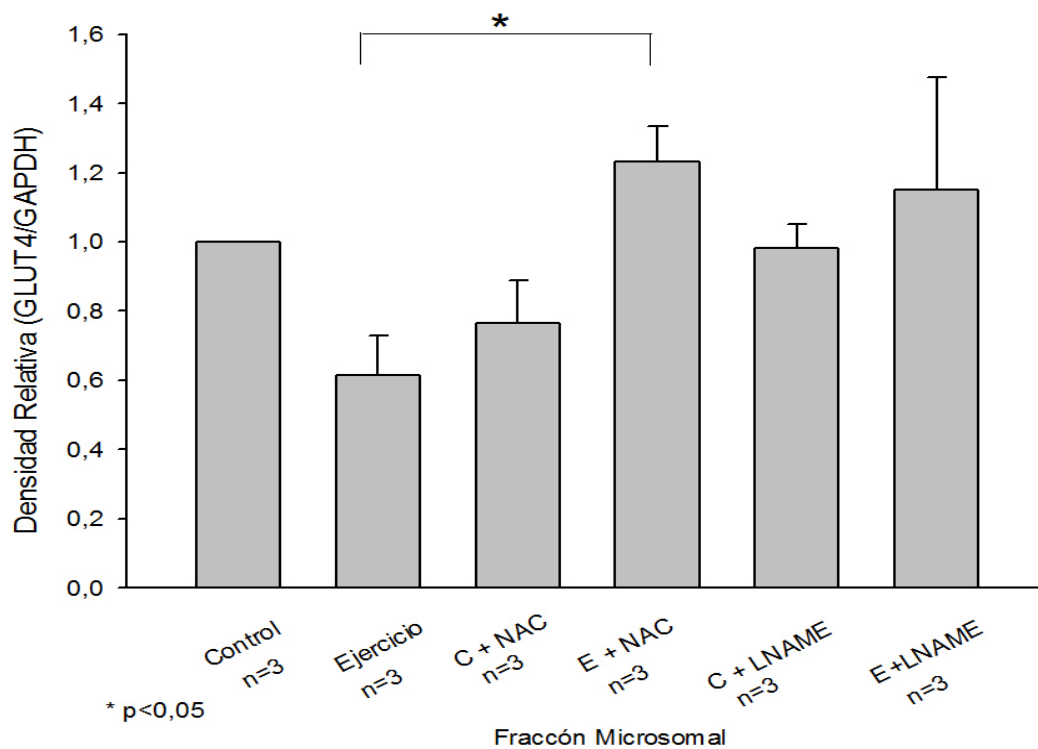


Figura 17: Contenido de GLUT4 a nivel de fracción microsomal

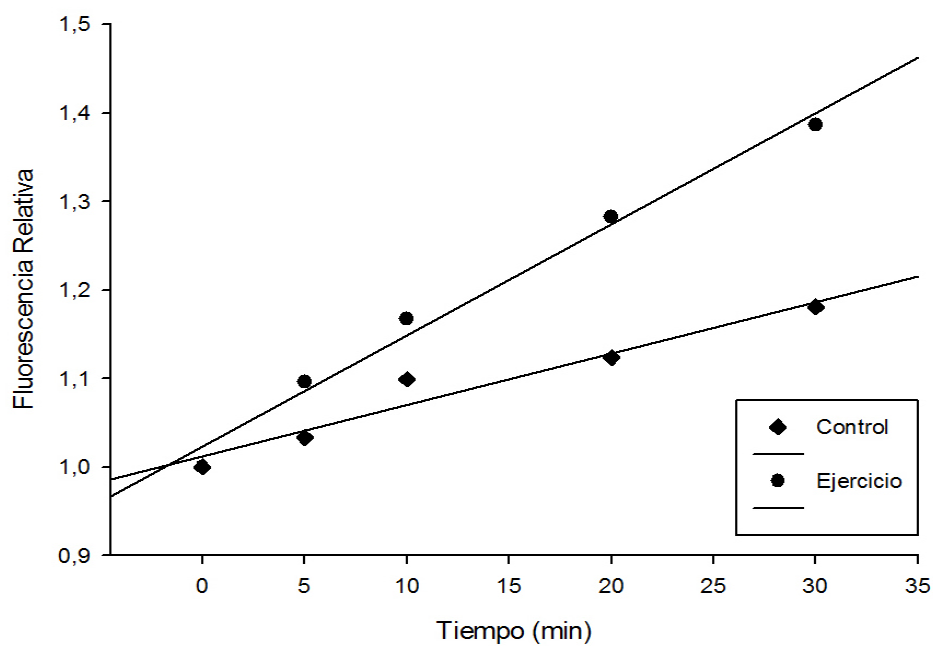


Figura 18: Cinética de producción de especies reactivas de oxígeno

4.3 Microscopia de Fluorescencia

4.3.1 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

A nivel del citoplasma se encontró que la actividad física se asociaba a un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 19) y tanto el NAC como el L-NAME evitaron el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno asociadas a la actividad física. Sin embargo de forma sorpresiva tanto el NAC como el L-NAME aumentaron de por sí la producción de especies reactivas de oxígeno en la población de control sedentario.

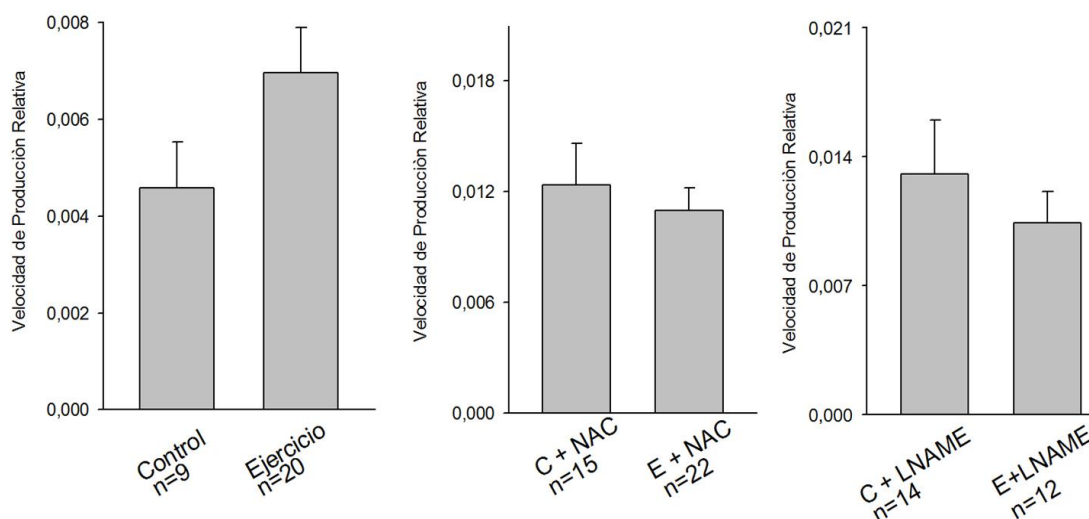


Figura 19: Generación de especies reactivas de oxígeno

4.3.2 Señales de Fluo-3

A partir de los registros de fluorescencia en respuesta a la estimulación eléctrica (Señales de Fluo-3) es posible medir distintos parámetros que nos permiten conocer las propiedades fisiológicas de la célula de músculo esquelético. Entre las propiedades de las señales de fluorescencia se encuentran la anchura media que es el tiempo transcurrido cuando el valor de la fluorescencia alcanza la mitad del máximo (durante su ascenso y descenso). En cuanto a los valores de la anchura media, se encontró una tendencia a la

baja en cuanto a la actividad física, es decir esta era disminuida, mientras que el tratamiento con NAC prevenía este efecto. En lo respectivo al tratamiento con L-NAME la anchura media se mantuvo en valores similares a los valores control.

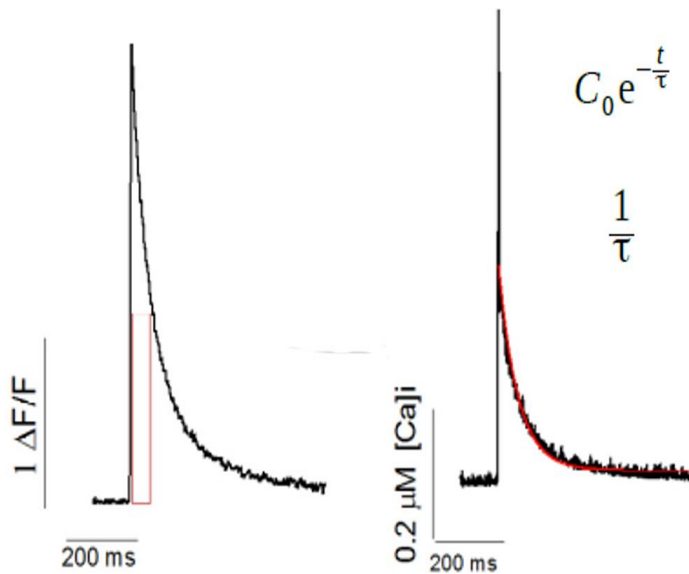


Figura 20: Anchura media y velocidad de caída

4.3.1 Señales transitoria de calcio libre intracelular

A partir de las señales de Fluo-3 es posible calcular la concentración libre de calcio obteniendo una señal transitoria de calcio libre intracelular. Una forma de caracterizar cinéticamente estos registros es mediante la determinación de la velocidad de caída, ésta se obtiene al ajustar una exponencial simple a la señal transitoria de calcio libre intracelular a partir de su punto máximo. Siendo la velocidad de caída el recíproco de la constante de tiempo ajustada.

A partir de lo anterior se encontró que la velocidad de caída se aumenta debido a la actividad física y mientras que con el tratamiento con NAC se observa una tendencia a la baja en ambas condiciones, tanto control sedentario como actividad física. Mientras que con L-NAME se observa una tendencia a la alza en ambas condiciones.

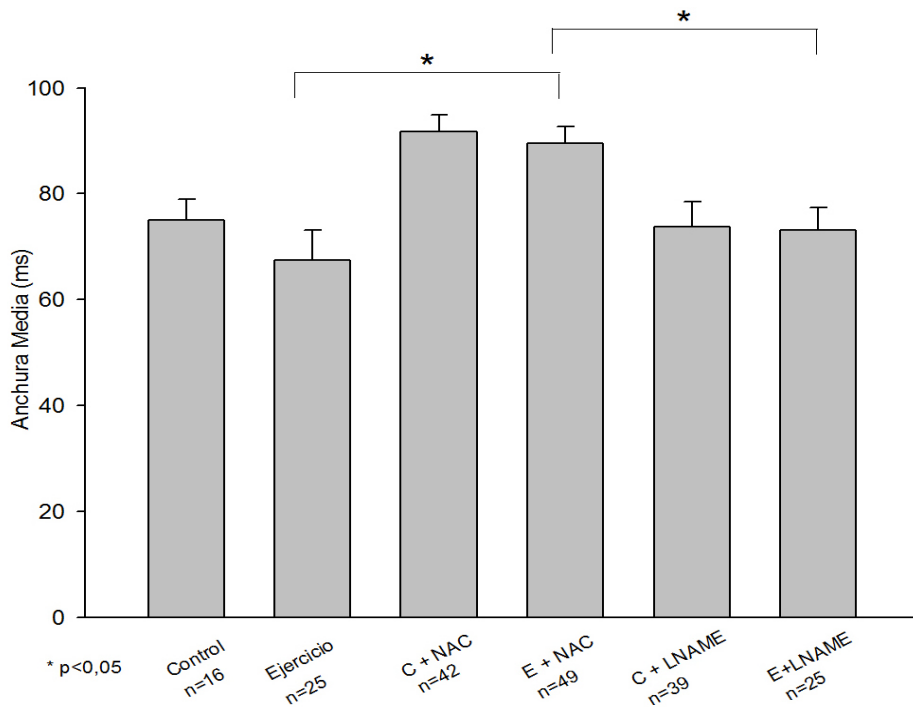


Figura 21: Anchura media de la señal de Fluo-3

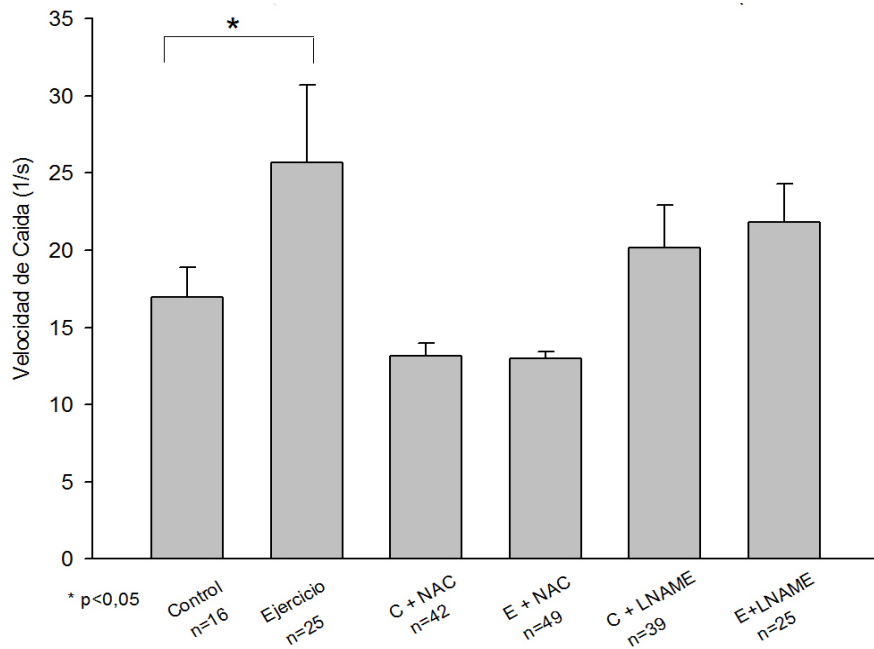


Figura 22: Velocidad de caída de la señal de calcio libre intracelular

4.4 Papel de las Especies Reactivas Sobre la Translocación del GLUT4

Recientemente, las proteínas relacionadas con la translocación del GLUT4 como respuesta a la insulina y al ejercicio han sido motivo de numerosos estudios y se ha propuesto que dos proteínas son claves en este proceso: TBC1D1 y TBC1D4 (AS160), ambas son miembros de la misma familia con dominio tre-2/USP6, BUB2.cdc16 (TBC1). Existen puntos de convergencia en la fosforilación y en las vías de señalización de TBC1D1 y TBC1D4 (AS160) relacionadas con ambas formas de producir la translocación GLUT4 pero también existen divergencias importantes que sugieren que el ejercicio incrementa la expresión del GLUT4 en la membrana por procesos independientes a los de la insulina.

TBC1D1 Isoforma 3		TBC1D4 Isoforma 1	
Pattern	****	Pattern	****
Query 359	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLOSLHKLCEIEGHNSSKTKLELQKHL 418	Query 412	QYICVVFQCASESLVDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI
	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLO LHKLCERIEGHNSSKTKLELQKHL		QYICVVFQCA+ESLDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI
Sbjct 353	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLOGLHKLCEIEGHNSSKTKLELQKHL 412	Sbjct 421	QYICVVFQCASESLVDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI
TBC1D1 Isoforma 2		TBC1D4 Isoforma 3	
Pattern	****	Pattern	****
Query 359	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLOSLHKLCEIEGHNSSKTKLELQKHL 418	Query 413	YICVVFQCASESLVDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI
	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLO LHKLCERIEGHNSSKTKLELQKHL		YICVVFQCA+ESLDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI
Sbjct 353	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLOGLHKLCEIEGHNSSKTKLELQKHL 412	Sbjct 241	YICVVFQCASESLVDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI
TBC1D1 Isoforma 1		TBC1D4 Isoforma 2	
Pattern	****	Pattern	****
Query 359	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLOSLHKLCEIEGHNSSKTKLELQKHL 418	Query 412	QYICVVFQCASESLVDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI
	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLO LHKLCERIEGHNSSKTKLELQKHL		QYICVVFQCA+ESLDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI
Sbjct 353	LVDEIMMTLRQAFITVAAVQQTAKAPAQLCEGCPLOGLHKLCEIEGHNSSKTKLELQKHL 412	Sbjct 421	QYICVVFQCASESLVDEVMLTLKQAFSTAAALQSARTQIKLCEACI

Figura 23: Motivos de regulación redox en proteínas de la familia TBC

En lo relativo a un posible papel de los ROS en la translocación del GLUT4 es interesante señalar que mediante técnicas de bioinformática, se encontró que estas proteínas tienen motivos CXXC donde C es un residuo de cisteína y X es cualquier tipo de aminoácido, estos motivos son blancos de regulación redox (Fomenko & Gladyshev 2003). De forma similar se encontró que estas proteínas tienen sitios de unión a caveolina. Sin embargo, mediante Western Blot de la fracción de la membrana plasmática se encontró en este trabajo de tesis que la actividad física no genera cambios en el contenido de caveolina así como tampoco los tratamientos con NAC y L-NAME generan cambios en el contenido de caveolina membranal.

TBC1D1 Isoforma 1

```
Pattern          *****
Query 181 VIVAHKKAPPALIDECIEKFNHVSGRGSESPRNFPAAFTGSEQEVRMRKSFSPG 240
           VIVAHKKAPPALIDECIEKFNHVS R + P +AP RMRKSFSPG
Sbjct 181 VIVAHKKAPPALIDECIEKFNHVSGRRIDWDAFTGQPSAPGA-----RMRKSFSPG 234

Pattern          ****
Query 241 LRSIAFRKELQDGLRSSGFFSSFEESDIENHLISGHNIVQPTDIEENRIMLFTIGQSEV 300
           LRSIAFRKE QD LRSS FSSF ++DIENHLI GHN+VQPTD+EENRIMLFTIGQSEV
Sbjct 235 LRSIAFRKEFDASLRSS-IFSSF-DNDIENHLIGHNIVQPTDIEENRIMLFTIGQSEV 292
```

TBC1D1 Isoforma 3

```
Pattern          *****
Query 301 YLISPDTKKIALKFNKFEISFCSQGIRHVDHFGFICRESSGGG--GFHFVYVFEQCTNEA 358
           YLISPDTKKIALKFNKFEISFCSQGIRHVDHFGFICRE SGGG GFHFVYVFEQCTNEA
Sbjct 293 YLISPDTKKIALKFNKFEISFCSQGIRHVDHFGFICRECSGGGGAGFHVYVFEQCTNEA 352
```

TBC1D4 Isoforma 2

```
Pattern          *****
Query 652 RKLNLQDGRAQGVRSFLLRQSSSEQCNSLSSVRRMYKEINSSSSLSFLH
           RKLNLQDGA+R G+RSELLRQ+SSEQCS L S RRW KEINSSSSLSFLH
Sbjct 661 RKLNLQDGRAHGLASPELLRQNSSEQCSVLPARRMCKEINSSSSLSFLH
```

TBC1D4 Isoforma 1

```
Pattern          **
Query 1 MEPPSCIQDEPFHLEPEPEGVSAQPGGKESDKRFRLLVWVGGSCLDHRTI
           ME PSCIQDEPFHLEPEP AQP G KP DKRFRLLVWVGGSCLD RTI
Sbjct 1 MEPPSCIQDEPFHLEPEPIALAQPGATKPGDKRFRLLVWVGGSCLDHRTI

Pattern          **
Query 61 EIRRRSQKPEAGGCGAPAAREVILVLSAPFLRCVPAFGAGSAGTSPSATQ
           EIRRRS KPEAGGCGAPAAREV+LVLSAPFLRCVPAFG G GG A C
Sbjct 61 EIRRRSLKPEAGGCGAPAAREVILVLSAPFLRCVPAFGVGGAGSAGAV
```

Figura 24: Presencia del motivo de unión a caveolina en distintas proteínas de la familia TBC

Discusión

5 Discusión

5.1 Protocolos de Actividad Física

Una de las principales problemáticas en los modelos de ejercicio en animales es la dificultad de que el animal siga el paradigma de ejercicio empleado. En la literatura existen una gran variedad de estrategias para enfrentar este tipo de problemáticas, éstas pueden dividirse en dos grupos (Seo et al. 2014). La primera elimina la cooperación del animal por completo, en esta estrategia el animal es sedado y se le implantan electrodos para estimular un músculo específico. Una de las desventajas de este tipo de protocolos es que se pierde la activación fisiológica del músculo involucrado, además de que no es posible reproducir movimientos que involucren diversas articulaciones.

La segunda estrategia emplea algún tipo de estímulo negativo que obligue al animal a aumentar su actividad física según el paradigma de ejercicio utilizado. Entre los paradigmas de ejercicio que utilizan algún tipo de estímulo negativo se encuentran

Caminata

En este paradigma el animal es introducido en una caminadora, la cual cuenta con un piso electrificado. Cuando el animal deja de caminar se le da un choque eléctrico con el objetivo de que continúe con el protocolo de actividad física (Dudley et al. 1982)

.

Nado Forzado

En este paradigma de ejercicio el animal es introducido en un contenedor con agua, ésta funciona como estímulo negativo para que el animal inicie la actividad física (Ojuka et al. 2012).

Una ventaja de este tipo de paradigmas de ejercicio es que se trabaja con el animal completo, y por lo tanto el músculo esquelético realiza movimientos fisiológicos, así como también se preserva la forma en la que la fibra muscular es activada.

Entre estos paradigmas de ejercicio una de las ventajas del nado forzado en comparación con la caminata, es que se trata de una actividad física más homogénea en el animal cuando ésta se realiza sin interrupciones, además de ser físicamente menos estresante ya que elimina la posibilidad de lesiones en las patas de los animales (Seo et al. 2014).

5.1.1 Nado Forzado

Una de las desventajas de este tipo de paradigma de ejercicio es que algunos animales no tienen una actividad continua al someterlos a este tipo de protocolos. En la literatura se han descrito 5 tipos de comportamientos con estos protocolos, los cuales se clasifican en: flotar, nado continuo, escalada, buceo y sumergida intermitente (Detke & Lucki 1995).

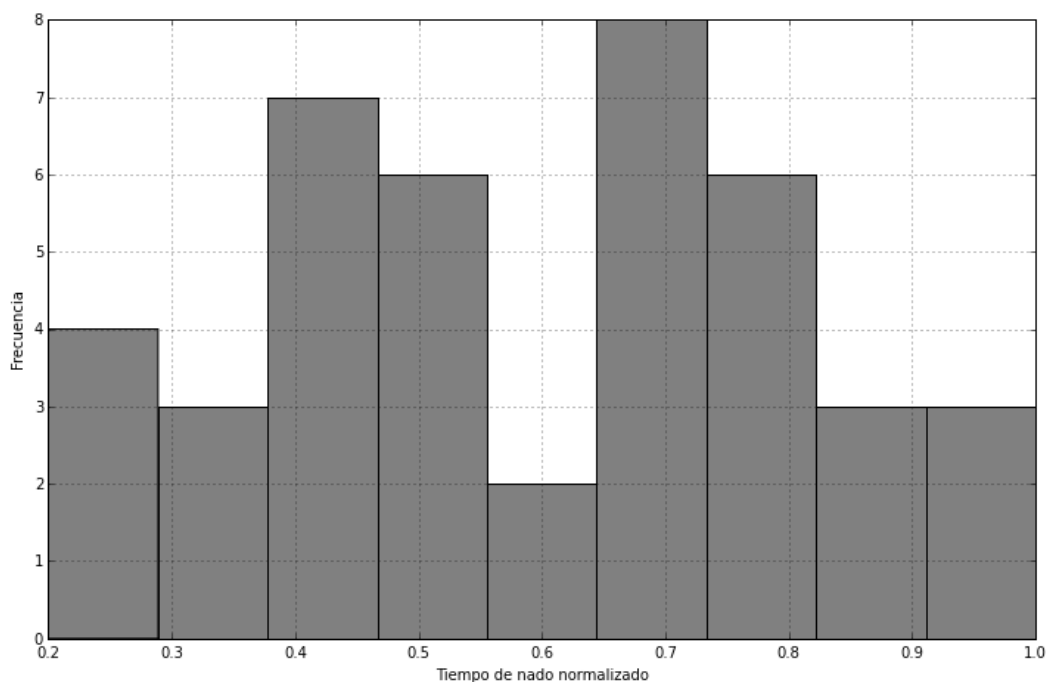


Figura 25: Histograma del tiempo de nado normalizado

Estos comportamientos fueron observados de forma cualitativa en este trabajo de tesis pero la prueba de selección implementada sólo tomó en cuenta el tiempo en el que el animal permanecía en nado continuo. Sin embargo en la

Figura 25 es posible observar una separación en el histograma del tiempo normalizado de nado, sugiriendo que se tienen 2 poblaciones distintas.

5.2 Translocación del GLUT4

En la literatura existen una gran cantidad de trabajos que evalúan el efecto de la actividad física sobre la expresión del GLUT4 (Tsai et al. 2006; Ojuka et al. 2002; Karlsson, et al. 2009; Ebersbach-Silva et al. 2013), uno de los resultados concluyentes de estos trabajos es el aumento en la expresión (Terada et al. 2001) de este transportador por la actividad física. Sin embargo el papel de las especies reactivas de oxígeno sobre la translocación no había sido estudiado con anterioridad.

La reversión a nivel de membrana plasmática en el contenido de GLUT4 debido al tratamiento con NAC, es congruente con los resultados de (Chambers et al. 2009), en donde en preparaciones de músculos aislados tratados con diversos compuestos con actividad antioxidante se genera una disminución en el transporte de glucosa. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis con L-NAME muestran que este compuesto no revirtió el efecto del ejercicio sobre la translocación del GLUT4. El L-NAME por sí mismo no tuvo efecto significativo, esto se encuentra en contradicción con lo encontrado por (Roberts et al. 1997) en donde en animales sometidos a un protocolo de caminata encontraron una disminución en el contenido de GLUT4 cuando los animales se les administraban L-NAME. Sin embargo en sus experimentos el L-NAME era administrado en el agua que los animales bebían, por lo que no es posible saber la dosis precisa de L-NAME que era administrada a cada animal o si fue efecto de algún producto de degradación del L-NAME.

5.3 Generación de Especies Reactivas de Oxígeno

Una de las consecuencias de la actividad física es el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, esto debido a que se tiene un aumento en la demanda energética del músculo esquelético.

Aunque lo anterior se ve reflejado en forma de tendencia en los grupos experimentales correspondientes (control vs ejercicio), los tratamientos (NAC, L-NAME) generaron un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno en comparación con la situación control. Este aumento inesperado podría deberse a un desplazamiento en el equilibrio de Donnan-Gibbs en el caso del tratamiento con NAC, sin embargo este aumento fue observado con ambos tratamientos. Además de lo anterior, ambos tratamientos evitaron el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno asociadas a la actividad física. Esto sugiere que una fuente de especies reactivas de oxígeno es la sintasa del óxido nítrico debido a un desacople en la síntesis del óxido nítrico (Alderton et al. 2001).

Con estos resultados es posible pensar que en condiciones basales la producción de las especies reactivas de oxígeno por la sintasa del óxido nítrico es dependiente de las especies reactivas de oxígeno, y al eliminar esta producción dependiente de la sintasa del óxido nítrico ya sea por su inhibición con L-NAME o por la acción del NAC, se puede tener un aumento en la producción de una especie reactiva en particular. Aunque el H₂DCFDA es un colorante capaz de interactuar con varias especies reactivas, se ha encontrado que la intensidad en la señal de fluorescencia depende de la especie reactiva con la que el colorante interactúa (información del fabricante). Siendo uno de los candidatos más probables el ion hidroxilo, ya que éste presenta una mayor señal de fluorescencia al interactuar con el colorante.

5.4 Transitorios de Calcio

La actividad física generó un aumento en la velocidad de caída de las señales transitorias de calcio asociadas a potenciales de acción. Un incremento en la velocidad de caída puede deberse a una mayor actividad en los amortiguadores de calcio como la parvalbumina, de los transportadores de la membrana plasmática como el transportador de sodio y calcio NCX, los transportadores tipo P o la bomba SERCA. Siendo la parvalbúmina y la SERCA los más impor-

tantes en el músculo esquelético (Berridge 2007) y por lo tanto los candidatos más probables para explicar los resultados obtenidos.

El tratamiento con NAC tanto en condiciones control como durante actividad física produjo una tendencia a la baja en cuanto a los valores de la velocidad de caída lo que sugiere la participación de las especies reactivas de oxígeno en la recaptura del calcio intracelular.

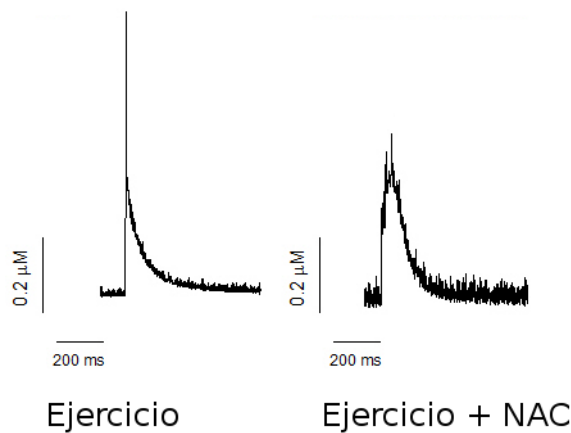


Figura 26: Cambio en la señal transitoria de calcio debido al tratamiento con NAC

En los transitorios de calcio (obtenidos a partir de las señales de Fluo-3) se observó, de forma cualitativa que la fase cercana al pico es de menor amplitud por el tratamiento con NAC como se muestra en un experimento representativo (Figura 26) comparada con los trazos control. Esto sugiere que hay un mecanismo de liberación de calcio dependiente de las especies reactivas de oxígeno. Una posibilidad es que el receptor a la rianodina sea modulado positivamente por las ROS (Sun et al. 2011) donde en cultivos celulares se encontró que al bloquear la producción de especies reactivas de oxígeno mediadas por Nox4 encontraron una disminución en la actividad del receptor a la rianodina, o el canal de calcio tipo L (Thomas et al. 1998), en donde con miocitos aislados encontraron un aumento en las corrientes del canal tipo L cuando eran tratados con H_2O_2 0.1 mM.

En cuanto al enlentecimiento de la fase de caída por el NAC, es posible que se tenga una activación deficiente de los mecanismos encargados de disminuir el calcio libre citosólico. Aunque las propiedades cinéticas de varios transportadores y amortiguadores de calcio no ha sido descritas en estas condiciones, Ginsburg et al. (2013) demostraron que la cinética del transportador NCX depende de la velocidad de elevación del calcio intracelular (Figura 27). Si esta propiedad se extendiera a otros transportadores de calcio, se tendría una explicación para mis observaciones pues al disminuir la liberación de calcio se tendría una menor activación de los mecanismos encargados de la fase de caída y por lo tanto se tendrían los efectos cinéticos observados.

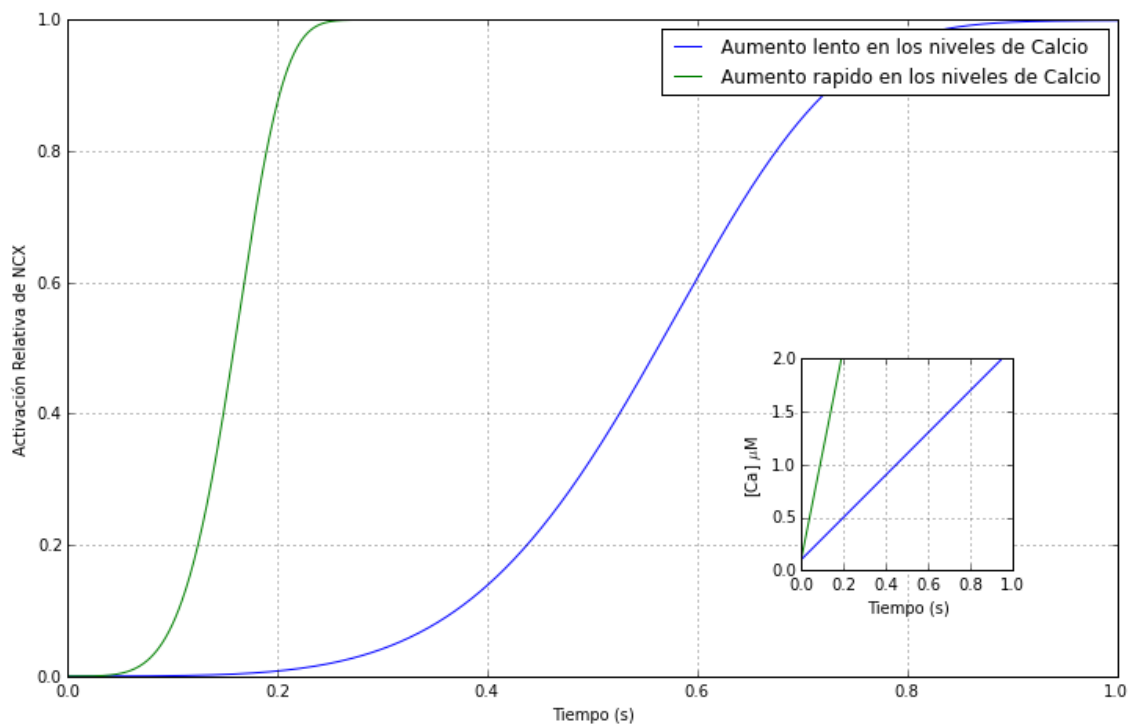


Figura 27: Cinética de Activación de NCX dependiente del calcio intracelular en miocitos aislados de conejo según lo reportado en (Ginsburg et al. 2013)

El hecho de que la velocidad de caída no aumente por la actividad física en los tratamientos con L-NAME sugiere que el óxido nítrico regula a la alza diversas proteínas relacionadas con esta fase. Experimentalmente se ha encontrado que por la vía del cGMP (que es dependiente del óxido nítrico) hay un aumento en las corrientes de NCX (Reppel et al. 2007), además de regular a la alza a la bomba SERCA (Zhang et al. 2002).

5.5 Papel de las Especies Reactivas Sobre la Translocación del GLUT4

En lo relativo a la señalización involucrada en la translocación del GLUT4 se ha propuesto a las proteínas de la familia TBC (que tienen la función la de activar proteínas G pequeñas (Fukuda 2011) y específicamente a las TBC1D1 y TBC1D4 (Cartee & Funai 2009). La TBC1D4 tiene motivos de posible regulación redox en una zona donde existen varios sitios de fosforilación por Akt (Funai et al. 2009), algo que no se observó en TBC1D1.

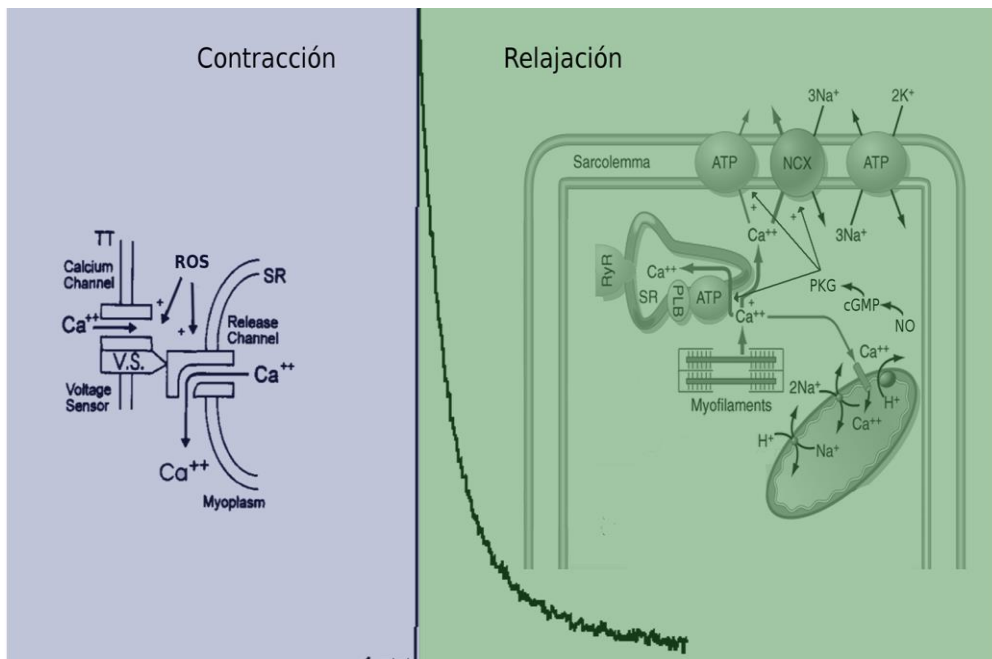


Figura 28: Papel de las especies reactivas en la contracción del músculo esquelético

Por otro lado, el sitio de unión a caveolina se encuentra entre los residuos [375-745] en el caso de TBC1D1 y [450-800] en el caso de TBC1D4, aunque en algunos casos se han encontrado dominios de unión a caveolina en residuos más próximos al carboxilo terminal, en esta parte de la proteína se encuentran dominios PH y PTB (Cartee & Funai 2009), por lo cual es posible que estos motivos de unión no se encuentren disponibles o que no tengan la afinidad suficiente para generar una interacción.

Dado que estas dos proteínas ejercen una regulación negativa sobre la translocación del GLUT4 (Sáinz et al. 2012) el mecanismo por el cual las especies reactivas de oxígeno podrían regular la translocación del GLUT4 es mediante la inactivación de TBC1D4 por las especies reactivas de oxígeno y por una interacción entre TBC1D1 con caveolina inhibiendo su actividad de GAP.

Conclusiones

6 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y de lo expuesto anteriormente se puede concluir de mi trabajo de tesis que:

- La actividad física promueve un aumento en la translocación del GLUT4 a la membrana plasmática que depende de las especies reactivas de oxígeno.
- No se encontraron diferencias significativas en el GLUT4 de la membrana plasmática ni en la fracción microsomal por acción del L-NAME (tanto en condiciones basales como de ejercicio).
- La sintasa del óxido nítrico posiblemente contribuye a la producción de especies reactivas de oxígeno, probablemente debido a un desacople en la síntesis del óxido nítrico.
- La producción de especies reactivas de oxígeno asociadas a la actividad física da lugar a que los transitorios de calcio, generados por potenciales de acción, sean más breves, así como a un aumento de su velocidad de caída, lo cual indica una modulación por los ROS de los mecanismos que disminuyen el calcio intracelular en esas condiciones
- Esta es la primera demostración **IN VIVO** de la acción de las especies reactivas de oxígeno en la translocación del GLUT4 por el ejercicio.

Perspectivas

7 Perspectivas

La translocación del GLUT4 es un proceso que se encuentra alterado debido al desarrollo de la diabetes tipo 2. El desarrollo de esta enfermedad se ha asociado a la ingesta de alimentos de alto contenido calórico (Hancock et al. 2008). Sin embargo, diversos estudios clínicos han encontrado que no todas las personas que desarrollan síndrome metabólico (estadio anterior al desarrollo de la diabetes tipo 2 (Wilson et al. 2005) contraen diabetes tipo 2 (Lorenzo et al. 2003).

Esto podría deberse a la diferencia en la expresión de proteínas reguladoras como TBC1D1 o TBC1D4 (Moltke et al. 2014). Estas proteínas además de regular la translocación del GLUT4 (Fukuda 2011) también regulan la translocación de diversas proteínas integrales de membrana, entre las que se encuentran la CD36 (un transportador de ácidos grasos) y la bomba de sodio y potasio, ambas se translocan a la membrana plasmática por la acción de la insulina y la actividad física. . Pudiera entonces suceder que el desarrollo de la diabetes tipo 2 no se deba únicamente a la mala translocación del GLUT4, como ha sido expuesto por (Katz et al. 1995) quienes encontraron en un modelo de ratón transgénico en el cual se eliminó la expresión de GLUT4 en el músculo esquelético y en adipocitos, se mantiene la glucemia en valores casi normales pero se trastorna importantemente el metabolismo de la glucosa celular así como el metabolismo de los lípidos.

Sin embargo en la literatura se han encontrado diversos estímulos que desencadenan la translocación del GLUT4, entre los que se encuentran la insulina (Lizcano & Alessi 2002), la actividad física (Terada et al. 2001), y el choque osmótico (Chen et al. 1997). Cuando cultivos celulares de adipositos fueron tratados con soluciones hipertónicas, la translocación del GLUT4 aumentó. Esto es posiblemente un mecanismo compensatorio a la deformación que sufre la célula. Mientras que en músculo esquelético el choque osmótico provoca la pérdida del sistema de tubulos t (Sakai et al. 1971), lo que provoca la pérdida de la excitabilidad del músculo esquelético (Guo et al. 2013).

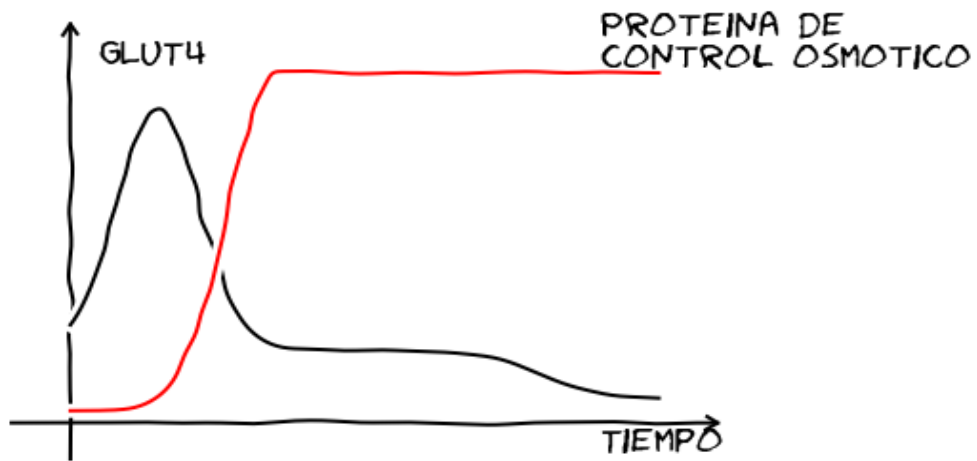


Figura 29: Mecanismo maladaptativo propuesto

Si en las vesículas que contienen GLUT4 se encuentra co-localizada otra proteína que es translocada en respuesta al choque osmótico es posible que debido a una exposición prolongada a un choque osmótico, esta proteína se transloque a la membrana de forma permanente y que se apaguen otros mecanismos que la co transloquen como la insulina.

8 Referencias

Aggarwal, N.T. & Makielski, J.C., 2013. Redox control of cardiac excitability. *Antioxidants & redox signaling*, 18(4), pp.432–68. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3526898&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 29, 2014].

Alderton, W.K., Cooper, C.E. & Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*, 357(Pt 3), pp.593–615. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1221991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 27, 2014].

Altenhöfer, S. et al., 2012. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69(14), pp.2327–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3383958&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 15, 2013].

Anon, 2006. *Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols*, American Physiological Society. Available at: http://books.google.com.mx/books/about/Resource_Book_for_the_Design_of_Animal_E.html?id=4GUptwAACAAJ&pgis=1 [Accessed October 23, 2014].

Aoi, W., Naito, Y. & Yoshikawa, T., 2013. Role of oxidative stress in impaired insulin signaling associated with exercise-induced muscle damage. *Free Radical Biology and Medicine*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584913006175> [Accessed October 8, 2013].

Apel, K. & Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, 55, pp.373–99. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701> [Accessed September 20, 2013].

Augustin, R., 2010. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB life*, 62(5), pp.315–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209635> [Accessed September 29, 2014].

Bernhardt, U. et al., 2009. A dual role of the N-terminal FQQI motif in GLUT4 trafficking. *Biological chemistry*, 390(9), pp.883–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558319> [Accessed October 23, 2014].

Berridge, M.J., 2007. *Cell Signalling Biology*, Portland Press. Available at: http://books.google.com/books?id=Ogi_nQEACAAJ&pgis=1 [Accessed October 23, 2014].

Blinks, J.R., Rudel, R. & Taylor, S.R., 1978. Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: detection with aequorin. *J. Physiol.*, 277(1), pp.291–323. Available at: <http://jp.physoc.org/content/277/1/291.abstract> [Accessed October 6, 2014].

Brito, G.N., 2009. Exercise and cognitive function: a hypothesis for the association of type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease from an evolutionary perspective. *Diabetology & metabolic syndrome*, 1(1), p.7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2761299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 9, 2013].

Campbell, D.L., Stamler, J.S. & Strauss, H.C., 1996. Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *The Journal of general physiology*, 108(4), pp.277–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2229328&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 23, 2014].

Caputo, C., Bolaños, P. & Escobar, A.L., 1999. Fast calcium removal during single twitches in amphibian skeletal muscle fibres. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 20(5-6), pp.555–567. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1005526202747> [Accessed April 3, 2014].

Cartee, G.D. & Funai, K., 2009. Exercise and insulin: Convergence or divergence at AS160 and TBC1D1? *Exercise and sport sciences reviews*, 37(4), pp.188–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2789346&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 28, 2014].

Cerbai, E. et al., 1991. Cellular electrophysiological basis for oxygen radical-induced arrhythmias. A patch-clamp study in guinea pig ventricular myocytes. *Circulation*, 84(4), pp.1773–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1655304> [Accessed October 23, 2014].

Ceriello, A. & Motz, E., 2004. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(5), pp.816–23. Available at: <http://atvb.ahajournals.org/content/24/5/816.long> [Accessed November 12, 2013].

Chambers, M.A. et al., 2009. Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. *The Journal of physiology*, 587(Pt 13), pp.3363–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2727043&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 23, 2014].

Chen, D. et al., 1997. Osmotic Shock Stimulates GLUT4 Translocation in 3T3L1 Adipocytes by a Novel Tyrosine Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), pp.27401–27410. Available at: <http://www.jbc.org/content/272/43/27401.short> [Accessed October 29, 2014].

Cheng, H., Lederer, W. & Cannell, M., 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science*, 262(5134), pp.740–744. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/262/5134/740.abstract> [Accessed October 9, 2014].

Chiarugi, P. & Cirri, P., 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends in biochemical sciences*, 28(9), pp.509–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678963> [Accessed October 23, 2014].

Chin, E.R. et al., 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes & Development*, 12(16), pp.2499–2509. Available at: http://genesdev.cshlp.org/content/12/16/2499?ijkey=22384f7d1b8ec9a87343d50f6d95d18211558dbe&keytype=tf_ipsecsha [Accessed October 15, 2014].

Davies, K.J.A. et al., 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(4), pp.1198–1205. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X82801241> [Accessed October 17, 2014].

Detke, M.J. & Lucki, I., 1995. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavioural Brain Research*, 73(1-2), pp.43–46. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166432896000678> [Accessed October 27, 2014].

Dudley, G.A., Abraham, W.M. & Terjung, R.L., 1982. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 53(4), pp.844–850. Available at: <http://jap.physiology.org/content/53/4/844.short> [Accessed October 24, 2013].

Duehlmeier, R. et al., 2007. Distribution patterns of the glucose transporters GLUT4 and GLUT1 in skeletal muscles of rats (*Rattus norvegicus*), pigs (*Sus scrofa*), cows (*Bos taurus*), adult goats, goat kids (*Capra hircus*), and camels (*Camelus dromedarius*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(2), pp.274–282. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643306004508> [Accessed October 8, 2013].

Ebersbach-Silva, P. et al., 2013. Cigarette smoke exposure severely reduces peripheral insulin sensitivity without changing GLUT4 expression in oxidative muscle of Wistar rats. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 57(1), pp.19–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23440095> [Accessed April 3, 2014].

Edman, K.A., 1966. The relation between sarcomere length and active tension in isolated semitendinosus fibres of the frog. *The Journal of physiology*, 183(2), pp.407–17. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1357585&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 22, 2014].

England, J. & Loughna, S., 2013. Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(7), pp.1221–39. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3602621&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 10, 2014].

Fomenko, D.E. & Gladyshev, V.N., 2003. Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry*, 42(38), pp.11214–25. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/bi034459s> [Accessed October 28, 2014].

Fukuda, M., 2011. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Bioscience reports*, 31(3), pp.159–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250943> [Accessed October 26, 2014].

Funai, K. et al., 2009. Increased AS160 phosphorylation, but not TBC1D1 phosphorylation, with increased postexercise insulin sensitivity in rat skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 297(1), pp.E242–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2711658&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 28, 2014].

García-Santamarina, S., Boronat, S. & Hidalgo, E., 2014. Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction. *Biochemistry*, 53(16), pp.2560–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24738931> [Accessed October 23, 2014].

Ginsburg, K.S., Weber, C.R. & Bers, D.M., 2013. Cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchanger: dynamics of Ca²⁺-dependent activation and deactivation in intact myocytes. *The Journal of physiology*, 591(Pt 8), pp.2067–86. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3634520&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 28, 2014].

Guo, A. et al., 2013. Emerging mechanisms of T-tubule remodelling in heart failure. *Cardiovascular research*, 98(2), pp.204–15. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3697065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 21, 2014].

Hammerschmidt, S. & Wahn, H., 1998. The effect of the oxidant hypochlorous acid on the L-type calcium current in isolated ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 30(9), pp.1855–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9769240> [Accessed October 23, 2014].

Hancock, C.R. et al., 2008. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), pp.7815–20. Available at: <http://www.pnas.org/content/105/22/7815.short> [Accessed August 31, 2014].

Hayashi, T., Wojtaszewski, J.F.P. & Goodyear, L.J., 1997. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 273(6), pp.E1039–1051. Available at: http://ajpendo.physiology.org/content/273/6/E1039.abstract?ijkey=360b5fc32c23ae622f704e745f34cb1b7063eefe&keytype2=tf_ipsecsha [Accessed October 14, 2013].

Holloszy, J.O., 1967. Biochemical Adaptations in Muscle. EFFECTS OF EXERCISE ON MITOCHONDRIAL OXYGEN UPTAKE AND RESPIRATORY ENZYME ACTIVITY IN SKELETAL MUSCLE. *J. Biol. Chem.*, 242(9), pp.2278–2282. Available at: http://www.jbc.org/content/242/9/2278?ijkey=4228d5c92e16b0672661c55a86d7d59469612eb3&keytype2=tf_ipsecsha [Accessed October 22, 2014].

Hoshijima, M., 2006. Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin, and associated structures. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 290(4), pp.H1313–25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3241960&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 22, 2014].

Hsieh, H.-J. et al., 2014. Shear-induced endothelial mechanotransduction: the interplay between reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) and the pathophysiological

implications. *Journal of biomedical science*, 21, p.3. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3898375&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 23, 2014].

Huang, S. & Czech, M.P., 2007. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), pp.237–252. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413107000678> [Accessed October 8, 2013].

Jetté, M., Sidney, K. & Blümchen, G., 1990. Metabolic equivalents (METS) in exercise testing, exercise prescription, and evaluation of functional capacity. *Clinical Cardiology*, 13(8), pp.555–565. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/clc.4960130809> [Accessed October 22, 2014].

Karlsson, H.K.R., Chibalin, A. V, Koistinen, H.A., Yang, J., Koumanov, F., Wallberg-henriksson, H., et al., 2009. Kinetics of GLUT4 Trafficking in Rat and Human Skeletal Muscle. *Diabetes*, 58 (4), pp.847–854. Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/58/4/847.abstract>.

Karlsson, H.K.R., Chibalin, A. V, Koistinen, H.A., Yang, J., Koumanov, F., Wallberg-Henriksson, H., et al., 2009. Kinetics of GLUT4 trafficking in rat and human skeletal muscle. *Diabetes*, 58(4), pp.847–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2661600&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 17, 2014].

Kasahara, T. & Kasahara, M., 1997. Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochimica et biophysica acta*, 1324(1), pp.111–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9059504> [Accessed October 23, 2014].

Katz, E.B. et al., 1995. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature*, 377(6545), pp.151–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7675081> [Accessed October 30, 2014].

Kuznetsov, A. V et al., 2011. Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(8), pp.2383–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21336935> [Accessed October 16, 2013].

Laing, N.G., 2009. *The Sarcomere and Skeletal Muscle Disease*, Springer Science & Business Media. Available at: http://books.google.com/books?id=_7CkaYji6GwC&pgis=1 [Accessed October 22, 2014].

Lin, J., Handschin, C. & Spiegelman, B.M., 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*, 1(6), pp.361–370. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413105001427> [Accessed October 16, 2013].

Lizcano, J.M. & Alessi, D.R., 2002. The insulin signalling pathway. *Current biology : CB*, 12(7), pp.R236–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937037> [Accessed October 23, 2014].

Lorenzo, C. et al., 2003. The Metabolic Syndrome as Predictor of Type 2 Diabetes: The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*, 26(11), pp.3153–3159. Available at: <http://care.diabetesjournals.org/content/26/11/3153.short> [Accessed October 29, 2014].

Ma, J.-H., Luo, A.-T. & Zhang, P.-H., 2005. Effect of hydrogen peroxide on persistent sodium current in guinea pig ventricular myocytes. *Acta pharmacologica Sinica*, 26(7), pp.828–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960889> [Accessed October 23, 2014].

Manolescu, A.R. et al., 2007. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 22, pp.234–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699876> [Accessed October 22, 2014].

Moltke, I. et al., 2014. A common Greenlandic TBC1D4 variant confers muscle insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 512(7513), pp.190–193. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13425> [Accessed July 10, 2014].

Nordberg, J. & Arnér, E.S.J., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin

reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), pp.1287–1312. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584901007249> [Accessed October 23, 2014].

Ojuka, E.O. et al., 2002. Regulation of GLUT4 biogenesis in muscle: evidence for involvement of AMPK and Ca(2+). *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 282(5), pp.E1008–13. Available at: <http://ajpendo.physiology.org/content/282/5/E1008.short> [Accessed August 16, 2014].

Ojuka, E.O., Goyaram, V. & Smith, J.A.H., 2012. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 303(3), pp.E322–31. Available at: <http://ajpendo.physiology.org/content/303/3/E322.long> [Accessed October 23, 2013].

Papa, I. et al., 1999. Alpha actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line. *Journal of muscle research and cell motility*, 20(2), pp.187–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10412090> [Accessed October 22, 2014].

Pinheiro, C.H. da J. et al., 2010. Regulation of glycolysis and expression of glucose metabolism-related genes by reactive oxygen species in contracting skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(7), pp.953–960. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584910000353> [Accessed October 22, 2013].

Powers, S.K., Talbert, E.E. & Adhietty, P.J., 2011. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 589(Pt 9), pp.2129–38. Available at: <http://jp.physoc.org/content/589/9/2129.long> [Accessed October 10, 2013].

Prosser, B.L., Ward, C.W. & Lederer, W.J., 2011. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart. *Science (New York, N. Y.)*, 333(6048), pp.1440–5. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/333/6048/1440.long> [Accessed September 16, 2014].

Prosser, B.L., Ward, C.W. & Lederer, W.J., 2013. X-ROS signalling is enhanced and graded by cyclic cardiomyocyte stretch. *Cardiovascular research*, 98(2), pp.307–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3633162&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 23, 2014].

Purslow, P.P., 2010. Muscle fascia and force transmission. *Journal of bodywork and movement therapies*, 14(4), pp.411–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20850050> [Accessed September 1, 2014].

Radak, Z. et al., 2013. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 18(10), pp.1208–46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3579386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 21, 2014].

Rao, J.N., Madasu, Y. & Dominguez, R., 2014. Actin cytoskeleton. Mechanism of actin filament pointed-end capping by tropomodulin. *Science (New York, N. Y.)*, 345(6195), pp.463–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25061212> [Accessed September 26, 2014].

Reid, M.B., Khawli, F.A. & Moody, M.R., 1993. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 75(3), pp.1081–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8226515> [Accessed October 23, 2014].

Ren, J. et al., 1994. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J. Biol. Chem.*, 269(20), pp.14396–14401. Available at: http://www.jbc.org/content/269/20/14396?ijkey=639ff54e72337b7948b3e4d7fa7e81c9ababcc88&keytype2=tf_ipsecsha [Accessed October 29, 2013].

Reppel, M. et al., 2007. Regulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in the murine embryonic heart. *Cardiovascular research*, 75(1), pp.99–108. Available at: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/75/1/99.figures-only> [Accessed October 29, 2014].

- Richter, E.A. & Hargreaves, M., 2013. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiological reviews*, 93(3), pp.993–1017. Available at: <http://physrev.physiology.org/content/93/3/993.long> [Accessed November 11, 2013].
- Roberts, C.K. et al., 1997. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 273(1), pp.E220–225. Available at: http://ajpendo.physiology.org/content/273/1/E220?ijkey=e3f80c681450dc0bbb9281f4bd87d96f2b8bd087&keytype2=tf_ipsecsha [Accessed October 27, 2014].
- Sáinz, N. et al., 2012. Leptin reduces the expression and increases the phosphorylation of the negative regulators of GLUT4 traffic TBC1D1 and TBC1D4 in muscle of ob/ob mice. *PLoS one*, 7(1), p.e29389. Available at: <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0029389#pone-0029389-g004> [Accessed October 28, 2014].
- Sakai, T., Geffner, E. & Sandow, A., 1971. Caffeine contracture in muscle with disrupted transverse tubules. *Am J Physiol -- Legacy Content*, 220(3), pp.712–717. Available at: <http://ajplegacy.physiology.org/content/220/3/712> [Accessed October 29, 2014].
- Sakamoto, K. & Holman, G.D., 2008. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295(1), pp.E29–37. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2493596&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 23, 2014].
- Salucci, S. et al., 2014. α -Actinin involvement in Z-disk assembly during skeletal muscle C2C12 cells in vitro differentiation. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 68C, pp.47–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25262166> [Accessed October 22, 2014].
- Scheepers, A., Joost, H.-G. & Schürmann, A., The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 28(5), pp.364–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15449578> [Accessed October 23, 2014].
- Seidner, G. et al., 1998. GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nature genetics*, 18(2), pp.188–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9462754> [Accessed October 23, 2014].
- Seo, D.Y. et al., 2014. Humanized animal exercise model for clinical implication. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 466(9), pp.1673–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24647666> [Accessed October 27, 2014].
- Smith, J.A.H. et al., 2007. Exercise and CaMK activation both increase the binding of MEF2A to the Glut4 promoter in skeletal muscle in vivo. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 292(2), pp.E413–20. Available at: <http://ajpendo.physiology.org/content/292/2/E413?cited-by=yes&legid=ajpendo;292/2/E413> [Accessed October 28, 2013].
- Soberman, R.J., 2003. The expanding network of redox signaling: new observations, complexities, and perspectives. *The Journal of clinical investigation*, 111(5), pp.571–4. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/18099> [Accessed October 21, 2013].
- Spudich, J.A., 2001. The myosin swinging cross-bridge model. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(5), pp.387–92. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/35073086> [Accessed October 16, 2014].
- Sun, Q.-A. et al., 2011. Oxygen-coupled redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel by NADPH oxidase 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(38), pp.16098–103. Available at: <http://www.pnas.org/content/108/38/16098.full?sid=7c474587-44ab-46d3-8784-43ab46ace6db> [Accessed October 13, 2013].
- Tanaka, H., Takahashi, H. & Ojima, T., 2013. Ca²⁺-binding properties and regulatory roles of lobster troponin C sites II and IV. *FEBS letters*, 587(16), pp.2612–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831063> [Accessed October 22, 2014].

Terada, S. et al., 2001. Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 90 (6), pp.2019–2024. Available at: <http://jap.physiology.org/content/90/6/2019.abstract>.

Thomas, G.P. et al., 1998. Hydrogen peroxide-induced stimulation of L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes and its inhibition by adenosine A1 receptor activation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 286(3), pp.1208–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732380> [Accessed October 23, 2014].

Treebak, J.T. et al., 2014. Acute exercise and physiological insulin induce distinct phosphorylation signatures on TBC1D1 and TBC1D4 proteins in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 592(Pt 2), pp.351–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24247980> [Accessed September 22, 2014].

Tsai, Y.-L. et al., 2006. Exercise training exacerbates tourniquet ischemia-induced decreases in GLUT4 expression and muscle atrophy in rats. *Life Sciences*, 78(25), pp.2953–2959. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320505012075> [Accessed October 8, 2013].

De Vivo, D.C. et al., 1991. Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *The New England journal of medicine*, 325(10), pp.703–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1714544> [Accessed October 23, 2014].

Wilson, P.W.F. et al., 2005. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 112(20), pp.3066–72. Available at: <http://circ.ahajournals.org/content/112/20/3066.short> [Accessed August 26, 2014].

Wu, Z. et al., 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), pp.115–24. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286740080611X> [Accessed October 22, 2014].

Yan, Z. et al., 2011. Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 110(1), pp.264–74. Available at: <http://jap.physiology.org/content/110/1/264> [Accessed July 18, 2014].

Zatsiorsky, V. & Prilutsky, B., *Biomechanics of Skeletal Muscles*, Human Kinetics. Available at: <http://books.google.com/books?id=THXfHT8L5MEC&pgis=1> [Accessed October 22, 2014].

Zhang, Q. et al., 2002. Cyclic GMP-Induced Reduction in Cardiac Myocyte Function Is Partially Mediated by Activation of the Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Pharmacology*, 64(2), pp.106–112. Available at: <http://www.karger.com/Article/FullText/56158> [Accessed October 29, 2014].

Zhao, F.-Q. & Keating, A.F., 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current genomics*, 8(2), pp.113–28. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2435356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 22, 2014].