

Cascada de señalización de la insulina y la actividad física para el transporte de GLUT-4 y la captación de glucosa en el músculo esquelético

Insulin and physical exercise signaling for GLUT-4 translocation and glucose uptake in skeletal muscle.

Martín Alejandro Pavarotti¹, Martín Rodríguez²

RESUMEN

El músculo esquelético (ME), debido a su significativo tamaño y función, representa el tejido que más energía demanda durante la actividad física. En respuesta a esta demanda, ha desarrollado un sistema altamente especializado para almacenar energía y satisfacer sus necesidades metabólicas. Para alcanzar esta eficacia en el almacenamiento y abastecimiento de nutrientes, en particular de glucosa, el ME depende de una incorporación nutricional eficaz. La relación entre la insulina y el ejercicio ilustra un ejemplo de equilibrio complejo y de adaptación, en el que dos fuerzas reguladoras metabólicas se contraponen en contextos cambiantes.

El aumento de la insulina en la sangre comunica al ME la presencia de niveles elevados de glucosa plasmática. Aunque la insulina se secreta tras la ingesta y es la principal hormona que aumenta el almacenamiento de glucosa y ácidos grasos en forma de glucógeno y triglicéridos, respectivamente, el ejercicio es una situación fisiológica que exige la movilización y oxidación de las reservas energéticas. Por lo tanto, durante la actividad física, los efectos del almacenamiento inducidos por la insulina deben mitigarse mediante la inhibición de la liberación de insulina durante el ejercicio, y la activación de los mecanismos sistémicos y locales de movilización de energía.

La interacción de la insulina con su receptor da lugar a una compleja cascada de señales que promueve la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno. Uno de los efectos más estudiados de la señalización insulínica en el ME es el incremento en la captación de la glucosa muscular. Tanto la insulina como la actividad contráctil aumentan la entrada de glucosa en el ME, proceso que involucra la translocación y fusión de vesículas que contienen el transportador de glucosa GLUT-4 en la membrana (GSV: vesículas de almacenamiento de GLUT-4). Así, los estímulos mencionados provocan el traslado de las GSV hacia la superficie celular, donde se fusionan, lo que aumenta la presencia de GLUT-4 y favorece la captación de glucosa del entorno intersticial. Este proceso de fusión se conoce como "exocitosis de GLUT-4".

Tras la actividad física, es necesario reponer las reservas de energía consumidas, en especial, el glucógeno en el músculo. El proceso se ve favorecido por un aumento de la sensibilidad a la insulina en los músculos previamente ejercitados, lo que facilita la utilización de la glucosa en la resíntesis del glucógeno. Este trabajo de revisión abarca los nuevos actores de la cascada de señalización de la insulina, el transporte de GLUT-4 y las interacciones insulina-ejercicio durante y después de la actividad física. Además, explora los efectos del entrenamiento físico regular sobre la acción de la insulina.

Palabras clave: músculo esquelético; insulina; ejercicio.

ABSTRACT

Skeletal muscle (SM) due to its significant size and function, represents the most energetically demanding tissue during physical activity. Based on this demand, SM has developed a highly specialized system for energy storage to meet its metabolic requirements. To achieve efficiency in nutrient storage and supply, particularly glucose, SM relies on effective nutritional incorporation. The relationship between insulin and exercise illustrates a complex example of balance and adaptation, wherein two regulatory metabolic forces counteract within changing contexts.

The increase in blood insulin communicates the presence of elevated glucose levels in the plasma to SM. Although insulin is secreted post-intake and is the primary hormone responsible for increasing the storage of glucose and fatty acids in the form of glycogen and triglycerides, respectively, exercise constitutes a physiological situation that demands the mobilization and oxidation of energy reserves. Consequently, during physical activity, it is necessary to mitigate the storage effects promoted by insulin. This is achieved by inhibiting insulin release during exercise and activating systemic and local mechanisms for energy mobilization.

The interaction of insulin with its receptor results in a complex cascade of signals that promote glucose uptake and glycogen synthesis. One of the most studied effects of insulin signaling in SM is the increase in muscular glucose uptake. Both insulin and contractile activity augment glucose entry into SM, a process involving the translocation and fusion of vesicles containing the glucose transporter GLUT-4 in the membrane (GSVs: GLUT-4 storage vesicles). Thus, these stimuli trigger the movement of GSVs to the cell surface, where they fuse, increasing the presence of GLUT-4 and promoting the uptake of glucose from the interstitial environment. This fusion process is known as "GLUT-4 exocytosis."

Post-physical activity, replenishing the consumed energy reserves, especially muscle glycogen, becomes necessary. This process is enhanced by an increase in insulin sensitivity in previously exercised muscles, facilitating the utilization of glucose in glycogen resynthesis. This review encompasses new contributors in the insulin signaling cascade, GLUT-4 transport, and insulin-exercise interactions during and after physical activity. Additionally, it explores the effects of regular physical training on insulin action.

Key words: skeletal muscle; insulin; exercise.

- ¹ Investigador Adjunto, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Laboratorio de Transporte Intracelular, Instituto de Histología y Embriología (IHEM), Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina
- ² Especialista en Medicina Interna, Nutrición y Diabetes, Área de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo), Instituto de Clínica Médica y Diabetes, Mendoza, Argentina

Contacto del autor: Martín Alejandro Pavarotti
E-mail: martinpavarotti@gmail.com
Fecha de trabajo recibido: 22/03/23
Fecha de trabajo aceptado: 20/09/23

Conflictos de interés: los autores declaran que no existe conflicto de interés.

INTRODUCCIÓN

Aunque los mecanismos de señalización que subyacen a las diversas respuestas a la insulina son altamente complejos y aún hay aspectos por esclarecer, los avances recientes han aportado cierta claridad en algunas vías esenciales que rigen la regulación metabólica de la glucosa. Los efectos de la insulina abarcan una amplia gama de procesos, como el crecimiento celular, la diferenciación, la apoptosis y la síntesis, así como la degradación de lípidos, proteínas y glucosa. En cuanto al almacenamiento de nutrientes, se ha establecido que la unión de la insulina a su receptor inicia una compleja cascada de señalización que promueve la captación y almacenamiento de glucosa y ácidos grasos en forma de glucógeno y triglicéridos¹.

Uno de los efectos funcionales más estudiados de la señalización de la insulina en el músculo esquelético (ME) es el aumento en el transporte de glucosa². La interacción entre la insulina y el ejercicio sirve como ejemplo de un equilibrio entre dos fuerzas reguladoras metabólicas contrapuestas en condiciones variables³. Durante la actividad física es necesario incrementar la movilización y la oxidación de las reservas energéticas, contrarrestando así los efectos del almacenamiento promovidos por la insulina. Para lograrlo, durante el ejercicio se reduce la secreción de insulina y se favorecen los procesos de movilización de energía. Tras la actividad física, es imperativo restablecer los depósitos energéticos agotados, en particular el glucógeno muscular. La sensibilidad a la insulina de los músculos que participaron previamente en la actividad física aumenta, lo que facilita la captación de glucosa para la resíntesis de glucógeno. En personas entrenadas, la sensibilidad a la insulina se eleva aún más en comparación con las no entrenadas debido a las adaptaciones en la vasculatura, el ME y el tejido adiposo.

Acción de la insulina en el miocito

Activación del receptor de insulina

La insulina ejerce sus efectos fisiológicos mediante su unión al receptor de insulina (RI) ubicado en la membrana plasmática de las células diana. El RI es un heterotetrámero formado por dos subunidades alfa y dos subunidades beta. La porción extracelular de RI la componen las dos subunidades alfa y los 190 residuos aminoácidos del extremo aminoterminal de cada una de las subunidades beta. La porción restante de las subunidades beta constituye las regiones transmembrana, yuxtamembrana y los dominios con actividad de tirosina-quinasa. La subunidades alfa y beta están unidas por un puente disulfuro, mientras que las subunidades beta se vinculan entre sí por dos puentes disulfuro. El gen que codifica el RI (*INSR*) es un gen simple ubicado en el cromosoma 19 (19.13.2) que, gracias al *splicing* alternativo (proceso que permite obtener diferentes proteínas a partir de un mismo gen), sintetiza las isoformas A y B de RI^{4,5}. La isoforma B es unas 100 veces más sensible a la insulina que a IGF-2 (*insulin-like growth factor type-2*), y se expresa de manera más frecuente y específica en el hígado, el músculo y el tejido adiposo, mientras que la isoforma A se expresa mayoritariamente durante el desarrollo fetal y tiene una alta afinidad por IGF-2⁶.

El estímulo de RI induce la activación de dos grandes cascadas de señalización intracelular: una cascada con actividad mitogénica y otra con actividad metabólica. En condiciones de insulinoresistencia, la respuesta de la vía metabólica disminuye, mientras que la vía mitogénica permanece inalterada.

La activación metabólica de RI favorece la activación de la tirosina-quinasa en las subunidades beta, autofosforilándose para facilitar el reclutamiento y la activación por fosforilación de diversas proteínas sustrato. Estos eventos posibilitan la división temprana de la señalización desencadenada por la insulina para activar múltiples módulos funcionales⁷.

Participación y activación de SRI, PI3K y Akt

Entre las proteínas sustrato mejor descritas para RI se encuentra la familia de sustratos del receptor de insulina (SRI, o del inglés IRS: *insulin receptor substrate*)^{8,9}. Los SRI son proteínas adaptadoras fosforiladas en residuos de tirosina por el RI activado. La fosforilación de residuos de tirosina por parte del RI permite la unión de proteínas efectoras de señalización, lo que amplifica la respuesta a la insulina, mientras que las fosforilaciones en residuos de serina o treonina afectan su estabilidad y actividad, y gestionan la inhibición o activación en función de los residuos afectados. Los SRI son una familia de proteínas de las que se describieron seis (SRI 1-6). No obstante, SRI-1 y SRI-2 median la mayoría de los efectos metabólicos de la activación de RI⁷.

La fosforilación en tirosina del dominio carboxiloterminales de SRI permite la unión y activación de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la cual cataliza la incorporación de un fosfato sobre la posición 3 del anillo inositol del fosfoinositol-4-fosfato (PI4P) y fosfoinositol-4,5-bifosfato (PI4, 5P), que genera fosfoinositol-3,4-bifosfato (PI(3,4)P2) o "PIP2"; y fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P3) o "PIP3", respectivamente¹⁰. La PI3K está formada por una subunidad reguladora y otra catalítica. Existen cinco isoformas de la subunidad reguladora (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β y p55 γ) y tres isoformas de la subunidad catalítica (p110 α , β y γ). La unión entre ambas subunidades facilita la estabilización de la subunidad catalítica e inhibe su acción. Cuando la subunidad reguladora se pone en contacto con SRI, se libera la inhibición, lo que activa la subunidad catalítica e incrementa la producción de PIP3^{11,12}. Esto propaga y amplifica la señal de la insulina y el reclutamiento de proteínas efectoras con dominios PH (o dominios con homología de pleckstrina) sobre la membrana plasmática. Entre los efectores con dominio PH más importantes se encuentran la proteína-quinasa 1 dependiente del inositol-3-fosfato (PDK1), Akt (también denominada proteína-quinasa B: PKB)¹¹ y PKC atípicas (aPKC- ζ y λ)¹³. Hasta ahora, se han identificado tres isoformas de Akt codificadas por los genes *Akt1*, *Akt2* y *Akt3*, de las cuales *Akt2* se expresa predominantemente en los tejidos sensibles a la insulina¹⁴. Tras unirse a PIP3, Akt se activa mediante la fosforilación por la PDK1 (en treonina 308) y por la mTOR2 (*mammalian target of rapamycin complex*) (en serina 473)¹⁵ (Figura 1).

La Akt activa tiene la particularidad de fosforilar múltiples sustratos con diversas funciones (Foxo, AS160/TBC1D4, TSC-2/TSC-1, PRAS40, GSK3, PGC-1 α , PDE3B) y se convierte en un nodo clave para la diversificación de la señalización de la insulina⁷. Al mismo tiempo, PDK1 fosforila y activa las PKC atípicas, las cuales estarían vinculadas a la exocitosis de GLUT-4¹³, probablemente mediante la fosforilación de proteínas sustrato (p. ej., Doc2B, una proteína necesaria para la fusión de las vesículas GSV con la membrana plasmática; Figura 2)^{16,17}.

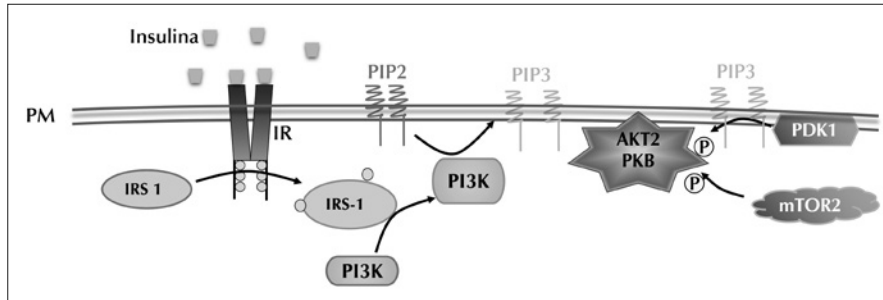
Como se puede observar, los eventos detallados hasta aquí están próximos a RI (SRI, PI3K y Akt) en las inmediaciones de la membrana plasmática. El cese del estímulo con la insulina permite un mecanismo inverso al descrito. A diferencia de PI3K, la falta de insulina provoca la activación de la fosfatasa PTEN (cuya actividad es inhibida por la acción de la insulina) que desfosforila PIP3 y frena la activación desencadenada por la insulina¹⁸.

Tráfico de vesículas. Papel de las proteínas Rab

El tráfico global de vesículas intracelulares está gobernado por una familia de proteínas con actividad GTPasa denominadas Rab (*Ras-associated binding proteins*). La familia de proteínas Rab es un miembro de la superfamilia Ras. Las proteínas Ras son interruptores moleculares binarios que alternan entre estados unidos a guanosina-trifosfato (GTP), activo, y estados unidos a guanosina-difosfato (GDP), inactivo. Así, las Rab cargadas con GTP facilitan el tráfico de vesículas desde un compartimento de origen hacia un compartimento blanco o *target*, mientras que las Rab cargadas con GDP se encuentran impedidas en la ejecución de ese tráfico. La carga de las proteínas Rab con el nucleótido GTP se lleva a cabo por la acción de las proteínas intercambiadoras de nucleótidos GEF (*guanine nucleotide exchange factor*). Los GEF permiten que las Rab liberen GDP para luego unir GTP. De este modo, las GEF promueven la activación de Rab y, por lo tanto, su interacción con proteínas efectoras con las que llevarán a cabo su acción concreta. A su vez, las proteínas denominadas GAP (*GTPase-accelerating proteins*) aceleran la actividad GTPasa de Rab, lo que conduce a la hidrólisis de GTP (generan GDP + Pi), se cargan con GDP e inhiben así el efecto de Rab. En este punto, las proteínas Rab-GDP se desprenden de la membrana por la acción de la proteína GDI (*GDP-dissociation inhibitor*) que

las mantiene solubles en el citosol celular e impide que estas Rab entren en contacto con las proteínas efectoras (para más información sobre las proteínas Rab, recomendamos consultar el artículo de Homma et al. "Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions"). Hasta el momento, se describieron unas 60 proteínas Rab

involucradas en distintos eventos de tráfico de vesículas intracelulares¹⁹. En el caso particular del transporte de GLUT-4, estimulado por la insulina, se descubrió que el tráfico de GSV (vesículas transportadoras de GLUT-4) requiere la participación de Rab 8 y Rab 13²⁰ en el ME, mientras que Rab 10 posibilitaría ese tráfico en el tejido adiposo²¹.



La unión de insulina a su receptor permite su autofosforilación y activación, que activará a SRI. El SRI1 permite la activación de PI3kinasa, lo que incrementa la cantidad de PIP3 sobre la membrana, permitiendo el reclutamiento de PDK y Akt2. Finalmente, Akt2 es activada por fosforilación por PDK1 y mTOR2.

PM: plasma membrane (membrana plasmática); IR: insulin receptor (receptor de insulina); IRS1: insulin receptor substrate 1 (sustrato del receptor de insulina 1); PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase (fosfatidilinositol 3-quinasa); PIP2: phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato); PIP3: phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato); Akt2: RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-beta serina treonina proteína quinasa); PKB: protein kinase B (proteína-quinasa B; sinónimo de Akt2); PDK1: phosphoinositide-dependent kinase-1 (proteína-quinasa 1 dependiente fosfoinositidos); mTOR2: mammalian target of rapamycin 2 (serina/treonina proteína-quinasa diana de rapamicina mamífera); P: phosphate group (grupo fosfato).

Figura 1: Primeros eventos de señalización activados por la insulina.

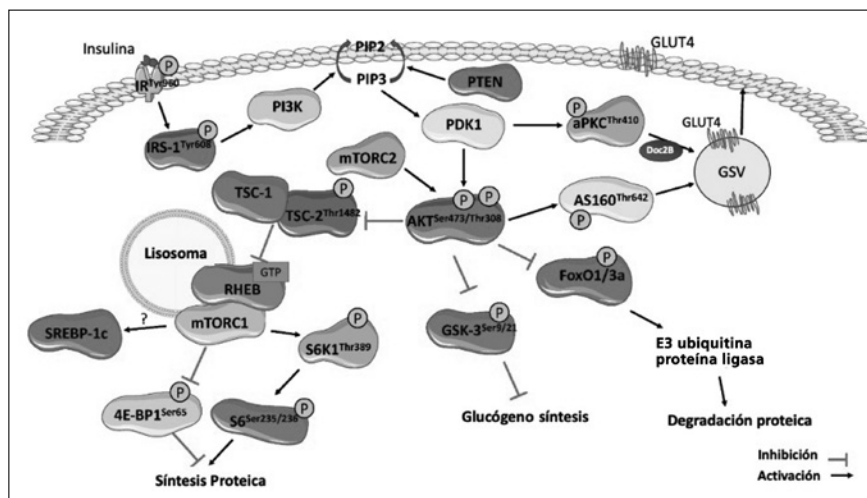
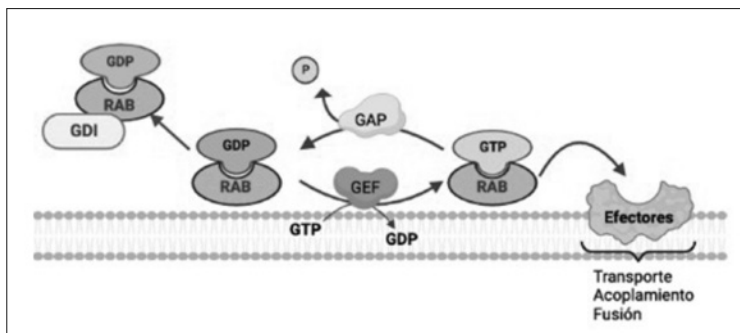


Imagen tomada y modificada de referencia 17.

De todas las proteínas blanco de Akt2, el sustrato de Akt de 160 kDa (AS160) aparece como el principal blanco para la exocitosis de GLUT-4 estimulada por la insulina.

Akt2: RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-beta serina treonina proteína quinasa); AS160: Akt substrate of 160 kDa (sustrato de Akt de 160 kDa).

Figura 2: Múltiples proteínas blanco de Akt2.



Las Rabs ciclan entre un estado activo, unido a un nucleótido de GTP, y un estado inactivo, unido a un nucleótido de GDP. En estado activo, las Rabs se unen a la membrana plasmática gracias a la presencia de una cola lipídica de isoprenilos. Las proteínas GEFs permiten el intercambio de nucleótidos GDP por GTP, lo que posibilita activar a la Rab y su contacto con proteínas efectoras con las que llevarán a cabo su función específica. Las proteínas GAP, como AS160, facilitan la hidrólisis de GTP a GDP y Pi, lo que inhibe a la Rab y bloquea su función en el tráfico de vesículas intracelulares. Una vez que el GTP se hidroliza a GDP, la Rab se separa de la membrana por la unión a otra proteína denominada GDI, que la mantiene soluble en el citosol.

Rab: small GTPase Ras-associated binding protein (pequeña proteína GTPasa de unión asociada a Ras); GEF: guanine nucleotide exchange factor (factor intercambiador de nucleótidos de guanina); GAP: GTPase-accelerating protein (proteína activadora de guanosina-trifosfatasa o proteína activadora de la actividad GTPasa); GDI: guanine nucleotide dissociation inhibitor (factor inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina); GTP: guanosine-triphosphate (nucleótido de guanosina-trifosfato); GDP: guanosine-diphosphate (nucleótido de guanosina-difosfato).

Figura 3: Ciclo de activación e inactivación de las proteínas Rabs.

Interacción entre la señalización de insulina y el tráfico de GLUT-4

Activación de las proteínas Rabs por inactivación de GAP AS160

Como ya se mencionó, Akt fosforila diversas proteínas involucradas en la captación de glucosa y es el sustrato de Akt de 160 kDa (AS160) el mejor caracterizado de sus blancos. La AS160, también conocida como TBC1D4, es una proteína GAP y tiene actividad sobre las proteínas Rab 8, 13 y 10. En ausencia de insulina, AS160/TBC1D4 permanece activa y estimula la actividad GTPasa de Rab, con la consiguiente hidrólisis de GTP a GDP y Pi de manera constitutiva (Figura 4). En otras palabras, las Rab estarían inactivas, cargadas con GDP, en estado basal o constitutivo. La activación de Akt2 por la insulina permite la fosforilación de AS160 e inhibe su actividad GAP, lo que impide la activación de GTPasa de Rab. Esto facilita que permanezcan cargadas con GTP, es decir, como Rab-GTP, y que se active el tráfico de vesículas hacia la membrana plasmática (Figura 5). En resumen, a través de la fosforilación de AS160, la insulina “soltaría los frenos” de las proteínas Rab y haría posible la translocación de GSV a la membrana plasmática²².

RAC-1. Un efector paralelo en la señalización desencadenada por la insulina. Papel de la reorganización de la actina cortical

La activación de PI3K es un punto clave porque facilita la bifurcación de la señalización de la

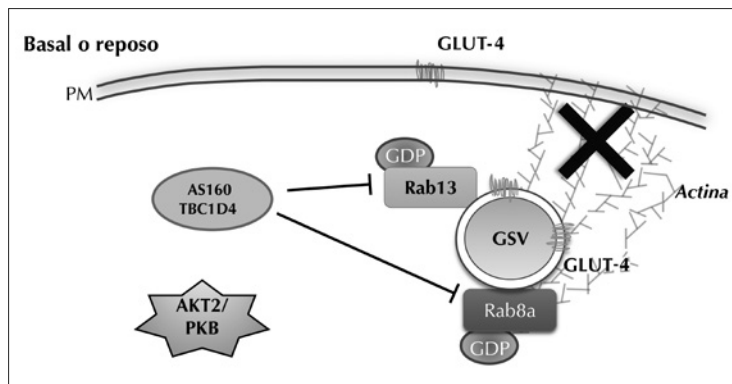
insulina. Paralelamente a la activación de Akt, PI3K promueve la activación de una GTPasa perteneciente a la familia de las proteínas Rho (*Ras homologous*) denominada RAC-1²². Hoy sabemos que la activación de RAC-1 coordina la reorganización de la actina cortical por debajo de la membrana plasmática, evento necesario para el acoplamiento y la fusión de GSV con la membrana plasmática^{23,24}. Una pregunta parcialmente respondida es: ¿cómo el incremento de PIP3 (generado por la activación de PI3K) permite la activación de RAC-1? Como todas las proteínas con actividad GTPasa, RAC-1 también requiere proteínas GAP y GEF. Algunos estudios demostraron que el aumento de PIP3 en la membrana plasmática permite el reclutamiento de proteínas GEF para RAC-1, como P-Rex 1²⁵ y FLJ00068²⁶. Gracias a estas proteínas GEF, RAC-1 se activaría, es decir, se cargaría con el nucleótido GTP. Como ya se mencionó, la activación de RAC-1 conduce al reordenamiento de la actina en la zona cortical. Para que este evento sea factible, es necesario un aumento tanto de la ramificación (polimerización) como de la despolimerización de la actina fibrilar. Así, RAC-1 activa factores nucleadores como WAVE y n-WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*), que a su vez activan un complejo de factores de ramificación de la actina denominado Arp2/3. Otra proteína blanco de RAC-1 es la quinasa PAK1, que por intermedio de una fosfatasa (*Slingshot*) desfosforila y activa otra proteína (cofilina), responsable de la despolimeri-

zación de la actina fibrilar, con regeneración de la actina monomérica libre³.

Un estudio realizado por Sylow, de la Universidad de Copenhague, demostró que, tanto en ratas alimentadas con dieta rica en grasa como en personas obesas, ambas insulinoresistentes, se observa una disminución de la fosforilación de PAK1 muscular²³. Por otro lado, en personas sometidas a condiciones de insulinoresistencia por emulsión lipídica intravenosa, la fosforilación de PAK-1 se bloquea de manera total (100%) a los 30 minutos y parcial (50%) a los 120 minutos tras la estimulación con insulina²³. Así, la falta de fosforilación de PAK-1

disminuye o bloquea la activación de cofilina, lo que reduce la hidrólisis de la actina fibrilar, y la presencia de actina monomérica, provocando una disfunción de la dinámica de actina y, con ello, del transporte de GLUT-4 a la membrana plasmática²⁷ (Figura 6).

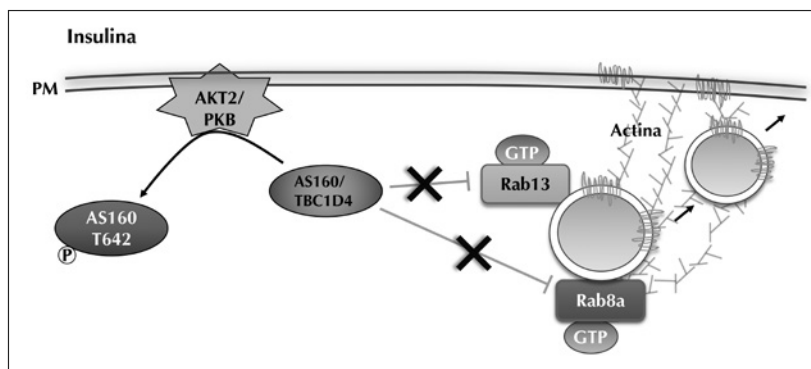
En resumen, la activación de RAC-1 genera el reordenamiento de la actina cortical, necesaria para la ramificación de los haces de actina y para la despolimerización de la actina fibrilar. Debido a este aumento de la actina cortical por debajo de la superficie celular, las GSV cargadas con GLUT-4 se aproximan a la membrana plasmática y se fusionan con ella²⁸.



En ausencia de insulina (basal o reposo celular), AS160 se encuentra activa, lo que despierta la actividad GTPasa de Rab, e hidroliza GTP a GDP y Pi. Esto hace que las Rab estén cargadas con GDP, lo que bloquea el tráfico de GSV a la membrana plasmática.

PM: plasma membrane (membrana plasmática); GLUT-4: glucose transporter type 4 (transportador de glucosa tipo 4); AS160: Akt substrate of 160 KDa (sustrato de Akt de 160 KDa) GDP: guanosine-diphosphate (nucleótido de guanosina-difosfato); Akt2: RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-beta serina treonina proteína quinasa); PKB: proteína-quinasa B; GSV: GLUT-4 storage vesicle (vesículas de almacenamiento de GLUT-4).

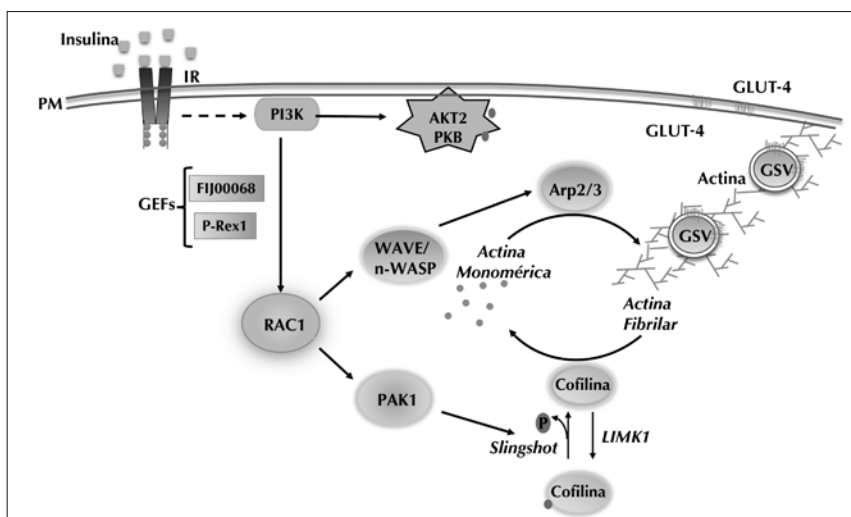
Figura 4: Bloqueo del tráfico de la exocitosis de GLUT-4 por AS160.



La activación de Akt2 por la insulina facilita la fosforilación e inactivación de AS160 mediante el bloqueo de la actividad GTPasa de Rab, lo que permite su estado como Rab-GTP activas, y estimula el tráfico de GSV hacia la membrana plasmática y la exocitosis de GLUT-4.

PM: plasma membrane (membrana plasmática); GLUT-4: glucose transporter type 4 (transportador de glucosa tipo 4); AS160: Akt substrate of 160 KDa (sustrato de Akt de 160 KDa) GDP: guanosine-diphosphate (nucleótido de guanosina-difosfato); Akt2: RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-beta serina treonina proteína quinasa); PKB: proteína-quinasa B; GSV: GLUT-4 storage vesicle (vesículas de almacenamiento de GLUT-4).

Figura 5: Acción de la insulina sobre la activación de Rab 13 y Rab 8, y tráfico de las vesículas GSV.



Alternativamente a la activación de Akt2, PI3K activa la GTPasa RAC1, que mediante WAVE/nWASP y Arp2/3 permiten la polimerización de la actina cortical, mientras que la activación de quinasa PAK1, a través de la fosfatasa Slingshot, favorece la activación de cofilina, la cual despolimeriza la actina fibrilar y genera actina monomérica. La formación de la estructura de actina cortical es necesaria para el tráfico de GSV hacia la membrana plasmática. La activación de RAC1 parece requerir GEF P-Rex1 y FIJ000068.

PM: plasma membrane (membrana plasmática); IR: insulín receptor (receptor de insulina); PI3K: phosphatidylinositol 3-quinase (fosfatidilinositol 3-quinasa); GLUT-4: glucose transporter type 4 (transportador de glucosa tipo 4); Akt2: RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-beta serina treonina proteína quinasa); RAC1: ras-related C3 botulinum toxin substrate (sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con la proteína ras); GEF: guanine nucleotide exchange factor (factor intercambiador de nucleótidos de guanina); PAK1: p21 RAC1 activated kinase (quinasa p21 activada por RAC1); WAVE: WASP-family verprolin-homologous protein (proteína homóloga a verprolina de la familia WASP); WASP: wiskott-aldrich syndrome protein (proteína del síndrome de wiskott-aldrich); Arp2/3: actin-related proteins (proteínas relacionadas con la actina); GSV: GLUT-4 storage vesicle (vesículas de almacenamiento de GLUT-4).

Figura 6: Papel de RAC1 en la activación de la dinámica de la actina cortical.

Fusión de las GSV con la membrana plasmática. Paso final en la translocación de GLUT-4

Los eventos finales en la exocitosis de GLUT-4 suceden en los últimos 200 nm por debajo de la membrana plasmática, donde existen factores reguladores del anclaje (*tethering*), el acoplamiento (*docking*) y la fusión (*fusion*) de GSV con la membrana plasmática (Figura 7). Si bien estos eventos han sido ampliamente estudiados por diferentes grupos²⁹⁻³¹, al igual que ocurre en varios de los procesos descritos, aún quedan preguntas sin respuesta. Algunos estudios proponen que ciertos estados de insulínorresistencia pueden estar causados por cambios en las proteínas implicadas, o al menos relacionadas, con esta fusión de membranas (para conocer más sobre qué proteínas están involucradas, sugerimos leer el artículo de Bryant et al. "SNARE proteins underpin insulin-regulated GLUT-4 traffic"). En cuanto al evento de fusión, en líneas generales se sabe que la fusión de membranas intracelulares requiere un complejo de proteínas de membrana denominadas SNARE (*soluble NSF, N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein-receptors*, receptores de proteínas de fijación soluble de NSF). Las SNARE

tienen la particularidad de presentar estructuras espiraladas, lo que permite el entrelazado entre ellas (SNARE de membrana plasmática y SNARE de vesículas) y genera el acercamiento estrecho entre la membrana vesicular y la membrana plasmática. Todo ello posibilita superar la energía de repulsión electrostática entre ambas membranas y, por consiguiente, la fusión.

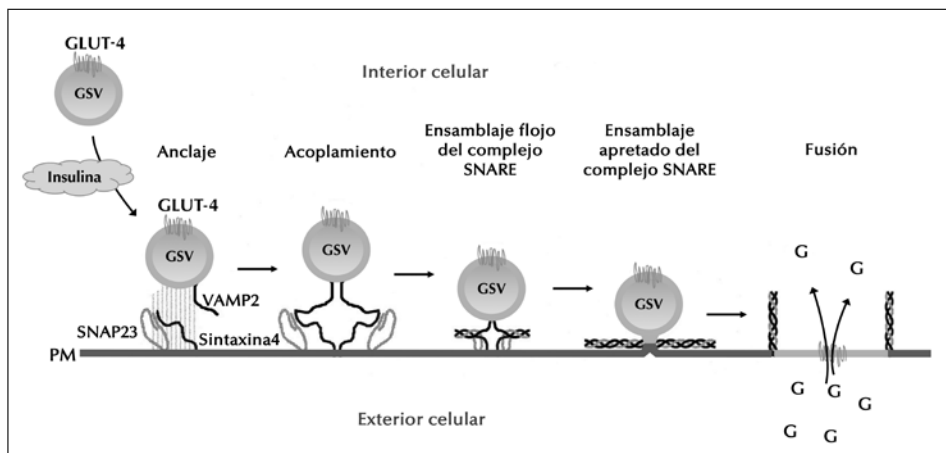
Tres proteínas principales componen el complejo SNARE involucrado en la fusión de las vesículas GSV: 1) proteína de membrana asociada a vesículas-2 (VAMP-2) ubicada sobre las GSV (v-SNARE o SNARE de vesículas); 2) sintaxina 4; 3) SNAP 23 ambas ubicadas sobre la membrana plasmática (t-SNARE o SNARE del compartimento *target*)^{31,32}. También se observó la participación de una serie de proteínas capaces de regular, de manera muy precisa, la formación y estabilidad del complejo SNARE³. Una de las más estudiadas es Munc18c, que se une a un precomplejo formado por sintaxina 4-SNAP 23, e impide la unión de VAMP-2 y la formación del complejo SNARE y, por consiguiente, la fusión de las membranas. Por otro lado, la activación del RI promueve la fosforilación de Munc18c, posibilita que esta se desprenda de la unión con sintaxina-4-SNAP 23 y, así, la

formación del complejo SNARE y la fusión de las membranas³³⁻³⁵. En cambio, en estado basal (ausencia de insulina) la fosfatasa PTP1B mantiene desfosforilada a Munc18c, lo que facilita su unión a syntaxina 4-SNAP 23 e inhibe la formación del complejo ternario SNARE y la fusión³⁶. Otra proteína denominada Synip funciona de forma similar a Munc18c. No obstante, Synip se une a syntaxina 4 en estado basal, lo cual bloquea la formación del complejo SNARE. Sin embargo, la activación de Akt2 por la insulina posibilita la fosforilación de Synip y la libera de la unión con syntaxina 4, lo que promueve el ensamblaje del complejo SNARE³⁷⁻³⁹. Por el contrario, la proteína de unión al calcio Doc2b, que es citosólica en estado basal, migra a la membrana plasmática por acción de la insulina y favorece la formación del complejo SNARE y, por lo tanto, la captación de glucosa⁴⁰⁻⁴² (Figura 8)³.

Recientemente, nuestro grupo del Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (Pavarotti et al.), en colaboración con el grupo de la Dra. Klip, del *Hospital for Sick Children* (SickKids) de Toronto, Canadá, encontró por primera vez en el músculo y en las células musculares la proteína complexina 2, una proteína vinculada a la estabilización de SNARE en los eventos de neurotransmisión en

el sistema nervioso^{43,44}. Los estudios microscópicos mostraron que la complexina 2 migra hacia la membrana plasmática por acción de la insulina, un evento dependiente de RAC1 e independiente de Akt2. Por otra parte, los ensayos de *knock-down* (o disminución de la expresión de complexina 2) muestran una reducción de la exocitosis de GLUT-4 dependiente de la insulina⁴⁵. Sin embargo, como se mencionó y se analizó en nuestro artículo y posteriormente en otro artículo del grupo del Dr. Bertrand de Bélgica, que comenta y discute nuestros resultados⁴⁶, aún desconocemos si la complexina 2 está involucrada en la exocitosis de GLUT-4 mediada por otros estímulos como el ejercicio físico, la activación de AMPK o los aumentos de Ca²⁺ (Figura 9).

Como puede observarse, los complejos SNARE y sus proteínas reguladoras influyen directamente en la modulación de la homeostasis glucémica, por lo que una caracterización minuciosa de los mecanismos que regulan la formación y estabilidad del complejo SNARE será de gran importancia para diseñar nuevas intervenciones en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) con el fin de restaurar la captación de glucosa estimulada por la insulina.



Después de la estimulación con insulina, las GSV cargadas con GLUT-4 se acercan a la membrana plasmática. La interacción de SNARE con otras proteínas accesorias permite el acoplamiento de GSV. Luego, gracias a un entrelazado entre la SNARE de GSV (VAMP2) con las SNARE de membrana (SNAP 23 y syntaxina 4), se observa un ensamblaje (flojo y luego apretado) que posibilita la formación de un complejo SNARE, que acerca las dos membranas y las fusiona. Tras la fusión, la membrana de las GSV forma parte de la membrana plasmática y, junto con la incorporación de esta membrana, GLUT-4 se une a la superficie celular, lo que facilita la entrada de la glucosa en la célula.

GLUT-4: glucose transporter type 4 (transportador de glucosa tipo 4); GSV: GLUT-4 storage vesicle (vesículas de almacenamiento de GLUT-4); G: glucose (glucosa); PM: plasma membrane (membrana plasmática).

Figura 7: Papel de SNARE en la fusión de GSV con la membrana plasmática.

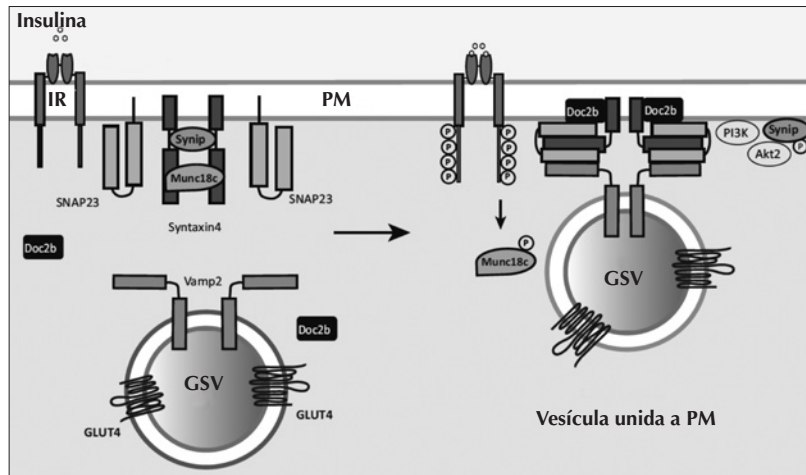


Imagen tomada y modificada de referencia 2.

En estado basal o de reposo, sin insulina, las SNARE pueden encontrarse monoméricas o sin ensamblaje. Este estado es dependiente de proteínas accesorias como Munc18c y Synip, que inhiben el ensamblaje. Bajo la acción de la insulina, Munc18c es fosforilado por el receptor de insulina, mientras que Synip es fosforilado por Akt2. La fosforilación de ambas proteínas facilita la liberación de SNARE monoméricas, y permite el ensamblaje y la fusión de GSV con la membrana plasmática.

GSV: GLUT-4 storage vesicle (vesículas de almacenamiento de GLUT-4); PM: plasma membrane (membrana plasmática).

Figura 8: Proteínas SNARE y proteínas accesorias en la fusión de GSV.

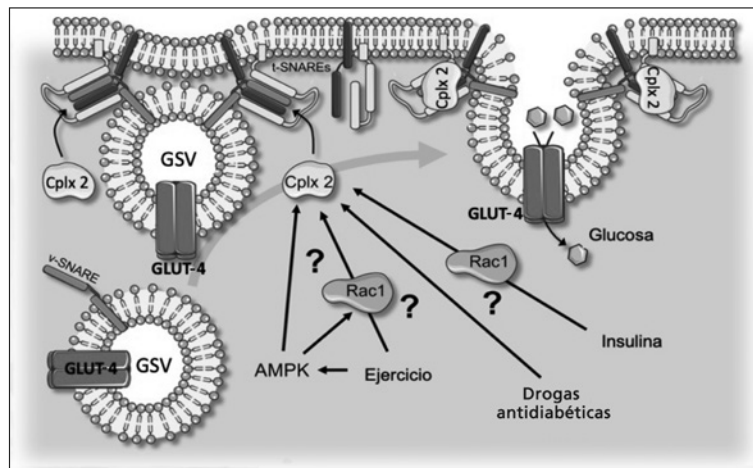


Imagen tomada y modificada de referencia 46.

La ausencia de complexina 2 disminuye la exocitosis de GLUT-4 desencadenada por la insulina. Bajo la acción de la insulina, complexina 2 migra a la membrana plasmática y es dependiente de RAC1, pero no de Akt2, para su relocalización. Desconocemos si otras proteínas como AMPK o CaMKII son capaces de permitir su llegada a la membrana plasmática.

GSV: GLUT-4 storage vesicle (vesículas de almacenamiento de GLUT-4); T-SNARE: proteínas SNARE de membrana plasmática (syntaxin 4 y SNAP 23); V-SNARE: proteína SNARE de membrana vesicular (VAMP2); Cplx2: complexin2 (complexina 2); RAC1: ras-related C3 botulinum toxin substrate (sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con la proteína Ras); GLUT-4: glucose transporter type 4 (transportador de glucosa tipo 4); AMPK: adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (proteína-quinasa activada por monofosfato de adenina 5).

Figura 9: Papel de la complexina 2 en la exocitosis de GLUT-4 en células musculares.

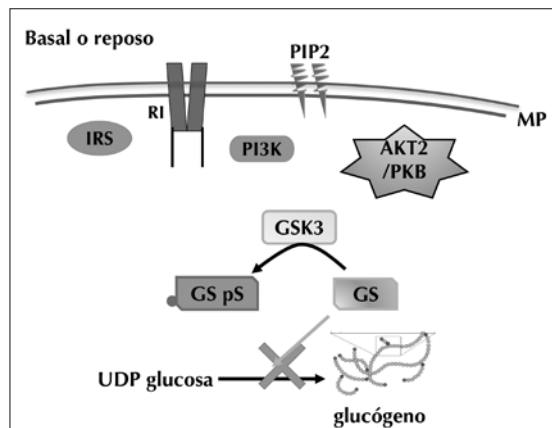
Papel de la insulina en la síntesis del glucógeno muscular

La glucosa, que entra en el miocito tras la estimulación con la insulina, tiene principalmente dos destinos posibles: la glucólisis o la síntesis de glucógeno. Tanto en el ME de sujetos sanos como en individuos con DM2, la principal vía de utilización de la glucosa es la síntesis de glucógeno. Se sabe

que el glucógeno está sujeto a una regulación aguda por parte de la insulina tanto de los efectos anabólicos (glucógeno-sintasa [GS]) como catabólicos (glucógeno-fosforilasa [GP])⁴⁶. La síntesis de glucógeno en el ME, estimulada por la insulina, es principalmente una consecuencia del aumento en el transporte de glucosa y la subsiguiente regulación alostérica de GS. Además, la insulina

modula la actividad y aumenta la transcripción de la hexoquinasa II, la principal isoforma muscular de la primera enzima en la vía glucolítica, lo que proporciona un vasto control de la capacidad glucolítica. La regulación aguda en la síntesis del glucógeno se produce por la acción alostérica de la glucosa-6-fosfato sobre la GS y por la acción de la insulina, que promueve su desfosforilación. La GS fue la primera enzima cuya regulación por la insulina se demostró en 1960⁴⁷. La regulación de GS basada en su desfosforilación desencadenada por la insulina ocurre a través de la activación de Akt, la cual fosforila e inactiva la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3) (Figura 10). En ausencia de insulina, GSK3 desempeña un papel inhibitorio en la síntesis de glucógeno, ya que fosforila e inactiva la GS e impide la síntesis de glucógeno muscular. Por el contrario, la activación de Akt, por acción de la insulina, permite la fosforilación de GSK3 inactivándola, lo que impide la fosforilación de GS. La falta de fosforilación de GS aumenta su actividad y, por lo tanto, la síntesis de glucógeno. Simultáneamente a la fosforilación de GSK3, la insulina activa una proteína fosfatasa 1 (PP1) que promueve la desfosforilación de GS (Figura 11). Así, la combinación de la inactivación de GSK3 y la activación de PP1 refuerza la activación de GS, y facilita la síntesis de

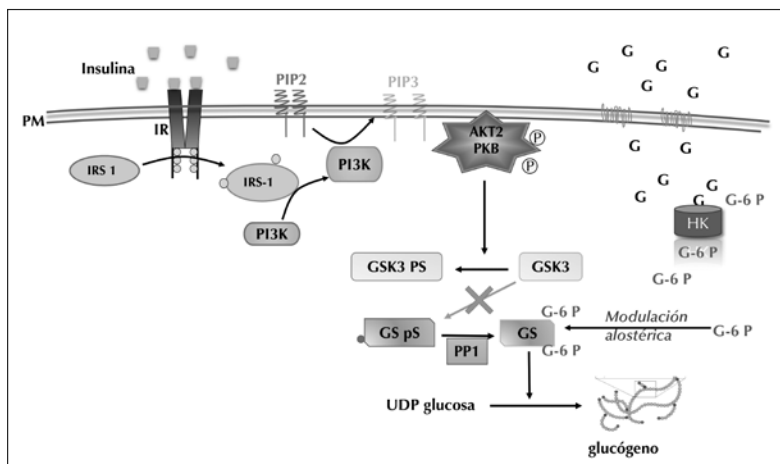
glucógeno. El estado de fosforilación de GS provocaría una regulación fina al modular la afinidad de la enzima por el sustrato UDP-glucosa* y la sensibilidad a la glucosa-6-fosfato. En otras palabras, la GS desfosforilada sería más sensible a la regulación alostérica por la glucosa-6-fosfato, lo cual parece favorecer la activación de la síntesis de glucógeno estimulada por la insulina⁴⁷. En el lado catabólico del metabolismo del glucógeno, se sabe que la insulina inhibe la glucogenólisis. La actividad de GP es regulada por la insulina mediante mecanismos muy similares a los de GS: fosforilación y regulación alostérica. Por efecto adrenérgico y de la contracción muscular, se activa la fosforilasa-quinasa que, a su vez, estimula la GP e induce la liberación de residuos de glucosa-1-fosfato⁴⁸. Contrariamente, la insulina, a través de la activación de la fosfatasa PP1, promueve la desfosforilación y la inactivación de la fosforilasa-quinasa y de GP, lo cual reduce la glucogenólisis muscular. Al igual que con GS, el control alostérico de GP a través de la inhibición de la glucosa-6-fosfato es un mecanismo crítico para el control de la glucogenólisis por parte de la insulina. Así, ambos mecanismos puestos en marcha por la insulina permiten, por un lado, disminuir la glucogenólisis y, por el otro, favorecer la síntesis neta de glucógeno.



En ausencia de insulina, la síntesis de glucógeno se bloquea gracias a la activación constitutiva de GSK3, que fosforila e inhibe a la GS. MP: membrana plasmática; RI: receptor de insulina; IRS: insulín receptor substrate (sustrato del receptor de insulina); PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa (fosfatidilinositol 3-quinasa); PIP2: fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (fosfatidil inositol 4,5 bifosfato); Akt2: RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-beta serina treonina proteína quinasa); PKB: protein kinase B (proteína-quinasa B; sinónimo de Akt2); GSK3: glycogen synthase kinase 3 (glucógeno sintasa quinasa-3); GS: glycogen synthase (glucógeno sintasa); GSps: phospho glycogen synthase (glucógeno sintasa fosforilada en serina).

Figura 10: Bloqueo de la síntesis de glucógeno en ausencia de insulina.

*El UDP-glucosa es un nucleótido (base nitrogenada [uridina] + glucosa + difosfato) descubierto por el bioquímico argentino Luis Federico Leloir, quien recibió el Premio Nobel de Química en 1970 por revelar los procesos por los cuales los azúcares se almacenan en forma de glucógeno, y describir la estructura y la función de los nucleótidos, moléculas esenciales para la transmisión de la información genética y la producción de energía celular.



La presencia de insulina activa a Akt2, que entre tantas proteínas diana, fosforila a GSK3 inhibiéndola, lo que impide la fosforilación de GS. La falta de fosforilación de GS permite su activación y la síntesis de glucógeno. La fosfatasa PP1, también activada en presencia de insulina, contribuye a la desfosforilación de GS, mientras que el incremento de glucosa-6-fosfato, por modulación alostérica, activa la GS.

PM: plasma membrane (membrana plasmática); IR: insulin receptor (receptor de insulina); IRS: insulin receptor substrate (sustrato del receptor de insulina); PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase (fosfatidilinositol 3-quinasa); PIP2: phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato); PIP3: phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato); Akt2: RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-beta serina treonina proteína quinasa); PKB: protein kinase B (proteína-quinasa B, sinónimo de Akt2); GSK3: glycogen synthase kinase 3 (glucógeno sintasa quinasa-3); GS: glycogen synthase (glucógeno sintasa); GSps: phospho glycogen synthase (glucógeno sintasa fosforilada en serina); G-6-P: glucose-6-phosphatase (glucosa-6-fosfato); HK: hexokinase2 (hexoquinasa 2); PP1: protein phosphatase 1 (proteína fosfatasa 1).

Figura 11: Activación de la síntesis de glucógeno por acción de la insulina.

Aspectos metabólicos y moleculares del ejercicio físico

La insulina es la principal hormona anabólica que aumenta el depósito de reservas energéticas en forma de glucógeno y lípidos. Por el contrario, la actividad física es una condición catabólica que aumenta la movilización de carbohidratos y lípidos para la generación inmediata de energía. La disponibilidad de ATP es fundamental para la actividad contráctil del ME tanto en eventos de potencia explosiva, que duran segundos, como de resistencia aeróbica, que duran horas. Por lo tanto, el ATP es el combustible celular requerido para la actividad de las enzimas claves involucradas en la excitabilidad de la membrana (Na⁺/K⁺ ATPasa), el manejo del Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (Ca²⁺ ATPasa), los ciclos de entrecruzamiento de actina y miosina, etc. Sabemos que las reservas intramusculares de ATP son escasas: ~5 mmol por kilogramo de músculo. Si el ATP almacenado fuera la única fuente de energía del músculo, entonces la duración de la actividad contráctil para el ejercicio máximo (p. ej., carreras de 100 m), donde la tasa estimada de utilización de ATP es de 3,7 mmol ATP kg⁻¹ s⁻¹, sería de solo 2 segundos, mientras que para el ejercicio submáximo, al 75% de VO₂ máx, donde la tasa de utilización de ATP es de 0,4 mmol kg⁻¹ s⁻¹, las reservas alcanzarían para unos 15 segundos.

Sin duda, el incremento de las demandas ener-

géticas de la actividad contráctil por el ejercicio requiere el aumento de la translocación de GLUT-4 para una mayor absorción de la glucosa muscular. Los estudios muestran que la actividad física aumenta al doble la cantidad de GLUT-4 en la membrana plasmática en relación con el estado de reposo^{49,50}. Sin embargo, la tasa de captación de glucosa es hasta 100 veces mayor durante el ejercicio intenso⁵¹. Como puede observarse, hay una gran discrepancia entre el aumento de la captación de glucosa y el aumento en la translocación de GLUT-4. Si bien no hay respuestas concretas que fundamenten la diferencia, se han planteado algunas hipótesis para justificarla. Una posibilidad es que los métodos utilizados para evaluar la translocación de GLUT-4 en el músculo subestimen los valores reales. Otra respuesta posible es que la actividad intrínseca de GLUT-4 aumente en el ME durante el ejercicio, probablemente debido al incremento de la temperatura muscular, así como a los efectos mecánicos durante los ciclos de contracción/relajación⁵².

Como ya señalamos, la captación de glucosa muscular puede aumentar unas 100 veces durante el ejercicio intenso. Los mecanismos coordinados responsables de este fenómeno son: 1) el aumento del suministro de glucosa; 2) el incremento del transporte de glucosa; 3) la activación de las vías glucolítica y oxidativa⁵³.

1) Suministro de glucosa. Existe un incremento de unas 20 veces en el suministro de glucosa du-

rante el ejercicio respecto del estado de reposo⁵⁴. Este incremento tiene como principal responsable una mayor perfusión del tejido muscular^{55,56} y, en menor medida, un incremento de la relación arteriovenosa de glucosa durante el ejercicio⁵⁷.

2) Transporte de glucosa. Translocación de GLUT-4. Así como la insulina ejerce un efecto preponderante sobre el incremento en la incorporación de glucosa, es innegable que la actividad física activa la translocación y la cantidad de GLUT-4 sobre los túbulos en T y la membrana plasmática. Se conoce que el señalamiento desencadenado por la actividad física es independiente de la insulina, ya que en los sujetos insulinoresistentes la translocación de GLUT-4 por acción de la contracción muscular está conservada^{17,58}. Más adelante se describen los mecanismos propuestos en este evento.

3) Activación de las vías glucolítica y oxidativa. Las mayores demandas energéticas durante el ejercicio disparan un incremento en el metabolismo de la glucosa (vías glucolítica y oxidativa) y, con ello, una mayor captación de glucosa. La glucosa incorporada es transformada por la hexoquinasa II en glucosa-6-fosfato para su uso en la vías glucolítica y oxidativa. Durante el ejercicio moderado y continuo la demanda energética es constante. Esto disminuye los niveles celulares de glucosa y glucosa-6-fosfato, mantiene activa la hexoquinasa II y, con ello, la mayor incorporación de glucosa^{51,59}. Sin embargo, en el ejercicio máximo, en el contexto de la fatiga muscular, el gran aumento inicial en la incorporación de glucosa, con el consiguiente aumento de glucosa-6-fosfato, inhiben la hexoquinasa II, lo que disminuye la tasa de fosforilación y la utilización de glucosa. Además, la mayor tasa de glucogenólisis genera un aumento adicional de glucosa-6-fosfato que también contribuye a la inhibición de la hexoquinasa II y a la utilización de la glucosa libre⁵¹. En nuestra opinión, este aumento de glucosa-6-fosfato podría producirse en dos etapas: inicialmente por un incremento de la captación de glucosa por las mayores demandas energéticas y, en una segunda etapa, por el aumento en la glucogenólisis. En otras palabras, durante el ejercicio intenso, la glucosa se acumula en la célula probablemente debido a la inhibición de la hexoquinasa II, que frenaría, por gradientes de concentración, la incorporación de glucosa.

Señalización y mecanismo de translocación de GLUT-4 desencadenados por la actividad física

Si bien el aumento de la translocación de GLUT-4 desencadenado por el ejercicio es un hecho bien

estudiado, todavía hay aspectos no bien dilucidados o, al menos, discutibles. Desde siempre, se ha supuesto que la activación de AMPK por cambios en la relación de AMP/ATP permite un aumento de la translocación de GLUT-4 y, con ello, una mayor captación de glucosa^{60,61}. Sin embargo, se han propuesto otros posibles mecanismos⁶²⁻⁶⁵. El aumento de GLUT-4 en la membrana plasmática por la insulina y la actividad física se produce a través de vías de señalización independientes, pero teniendo en cuenta que el ejercicio induce un aumento de la sensibilidad a la insulina durante y después de la actividad, podría considerarse que esta independencia es una verdad a medias. Es decir, se han encontrado puntos en los que ambas vías convergen y comparten parte de los mecanismos utilizados para aumentar la exocitosis de GLUT-4.

Estrés metabólico

La activación de AMPK ($\alpha 2\beta 2\gamma 3/1$) por estrés metabólico (incremento de la relación AMP/ATP) o por fármacos similares al AMP (p. ej., AICAR), se ha relacionado con la translocación de GLUT-4 a la membrana plasmática⁶⁶. En apoyo de estas observaciones, se notó un aumento aproximado del 90% en las reservas de glucógeno en las personas que poseen una mutación puntual en la subunidad $\gamma 3$ de AMPK, que conduce a un aumento de la actividad intrínseca⁶⁷. Surge la pregunta: ¿cómo aumenta la activación de AMPK la translocación de GLUT-4? AMPK está vinculada a la activación de proteínas Rab y al aumento de fosfatidilinositol 3,5-bifosfato (PI(3,5)P2). Como ya mencionamos, las proteínas GAP (*GTPases activating protein*) están activas en estado de reposo, lo que facilita la hidrólisis de Rab-GTP a Rab-GDP y Pi mediante la inhibición de Rab y el tráfico de vesículas. De manera similar a la activación de Akt2 por la insulina, la activación de AMPK por la actividad física permite la fosforilación de la proteína GAP, TBC1D4/AS160 y, probablemente, de otra GAP denominada TBC1D1, que se encuentra presente principalmente en las fibras de tipo 2. Así, la fosforilación y la inhibición de ambas GAP contribuirían a la carga de Rab con GTP y liberarían el freno al tráfico de las vesículas GSV, con la consiguiente exocitosis de GLUT-4. Por el momento, se desconoce qué proteínas Rab participan en este proceso, pero dadas las similitudes observadas con los mecanismos estimulados por la insulina, Rab 8, 13 y 14 serían las principales candidatas. También se ha descubierto que AMPK tiene como blanco la quinasa PIKfyve, que habilita

la generación de fosfatidilinositol-5-fosfato (PI(5)P) y fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato (PI(3,5)P₂)⁶⁸. En cuanto al incremento de PI(3,5)P₂, la actividad de PIKfyve se ha vinculado a un aumento de la exocitosis de GLUT-4, pero AMPK solo parece provocar un cambio en la localización intracelular de esta quinasa⁶⁸, lo que contribuiría al aumento de la exocitosis de GLUT-4.

Por último, según algunos estudios, la sacarosa-quinasa no fermentada relacionada con AMPK (SNARK) parece estar vinculada a la regulación del metabolismo de la glucosa y la captación de glucosa en el ME en respuesta a la contracción muscular⁶⁹. Más concretamente, se cree que SNARK se activa por la contracción muscular y esta última activa la AMPK, lo que permite la translocación de GLUT-4, donde participa como un “amplificador” para aumentar la respuesta metabólica a la contracción muscular (Figura 12, panel central).

Señalización del calcio

Los incrementos de Ca²⁺ desencadenados por la contracción muscular tienen múltiples orígenes y secuencialidades, y se los ha vinculado a eventos de señalización como la activación de quinasa (p. ej., CaMKK, CaMKII, nPKC), el aumento de la exocitosis de GLUT-4 y la incorporación de glucosa^{70,71}. El cambio de potencial de la membrana generado por el estímulo nervioso sobre la placa motora terminal posibilita la apertura de canales de Ca²⁺ denominados receptores de dihidropiridina (R-DHP), los cuales, por contacto físico con los canales denominados receptores de rianodina (RyR, *ryanodin receptor*), ubicados en las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico, permiten un incremento mayor de Ca²⁺ intracelular por la salida desde este compartimento. El aumento de Ca²⁺ es el responsable final de la contracción muscular, es decir, de generar el entrecruzamiento entre la actina y la miosina. Se notó que, si se bloquea farmacológicamente este entrecruzamiento, se inhibe la exocitosis de GLUT-4⁶⁰. Sin embargo, este aumento de Ca²⁺, mediado por los receptores de R-DHP y RYR en las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico, no serían los responsables de generar un mayor ingreso de glucosa⁶⁰. Por otra parte, el aumento de la glucólisis por estímulos eléctricos produce un aumento de segundos mensajeros como ADP ribosa cíclico (cADPR) y ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP)⁷², los cuales generan un incremento extra de Ca²⁺ (proveniente del interior y el exterior celular) y la activación de CaMKII^{73,74}. Además, estos incrementos de Ca²⁺ son detectados

por la calmodulina (CaM), evento que también sería necesario para activar la CaMKII⁷⁵. En este sentido, el bloqueo de la activación de CaMKII frena la incorporación de glucosa. En función de lo expuesto, y según nuestro punto de vista, las señales de Ca²⁺ desencadenadas por el propio proceso contráctil (aumento del calcio intracelular por R-DHP y RyR) no serían responsables de la incorporación de glucosa muscular por el ejercicio físico. No obstante, las moléculas provenientes de la actividad glucolítica actuarían como segundos mensajeros, y permitirían los incrementos subsiguientes de Ca²⁺ tanto desde el interior como desde el exterior de la célula, lo que dispararía a través de calmodulina y CaMKII la incorporación de glucosa.

Las señales de Ca²⁺ generan mecanismos y eventos complejos aún no dilucidados del todo, pero que parecen tener un impacto positivo en la incorporación de la glucosa muscular.

Alternativamente a esta vía y en relación con la apertura de los canales de Ca²⁺ durante la contracción muscular (receptores de rianodina, ubicados sobre las cisternas terminales), parece producirse la liberación de ATP al exterior celular a través de los canales de panexina-1^{62,76}. En estos estudios se halló que tales eventos provocan un aumento de la fosforilación de Akt y de TBC1D4/AS160 durante el ejercicio físico⁷⁷. Al parecer, el incremento del ATP extracelular provoca una activación autocrina de los receptores purinérgicos P2Y del miocito, los cuales activan una PI3Kγ e incrementan los niveles de PIP3. Esto permitiría el accionar de la señalización posterior de PIP3 utilizando la vía común de la insulina e incrementando la captación de glucosa^{62,78} (Figura 12, panel izquierdo).

Acción mecánica de la actividad física sobre la incorporación de glucosa. Estrés mecánico

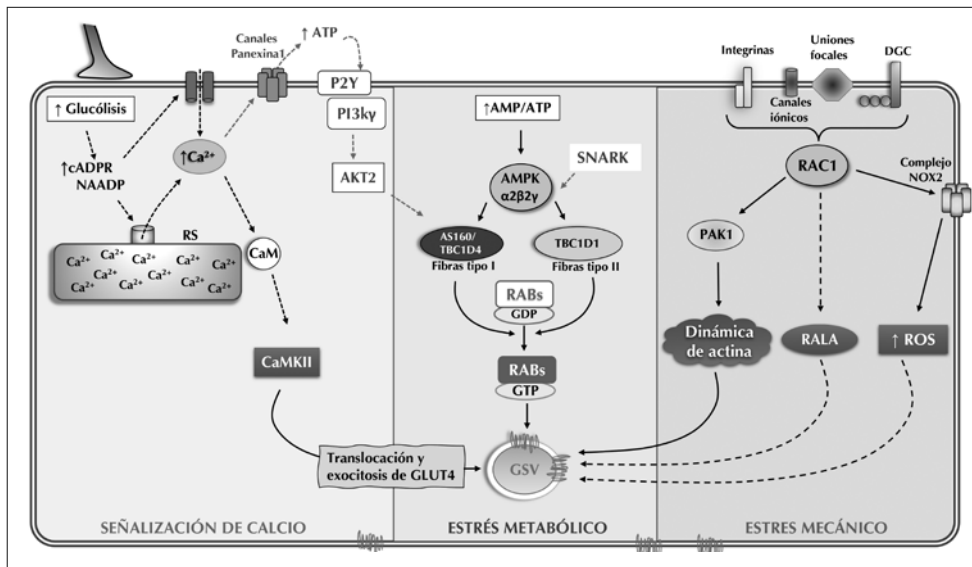
Si se bloquea la tensión muscular generada por la contracción, ya sea mecánica o químicamente, se observa una reducción en la captación de glucosa^{60,79}. Esto parece indicar que la señalización desencadenada por el estrés mecánico durante la actividad física está relacionada con los eventos de incorporación de glucosa. De manera similar, se ha demostrado que el estiramiento pasivo aumenta la incorporación de glucosa al músculo⁷⁹. Una candidata que podría explicar el efecto del estiramiento en la incorporación de glucosa es la proteína RAC-1. Si bien RAC-1 es activada por la insulina, el estiramiento pasivo también activaría a RAC-1 y permitiría la incorporación de glucosa^{24,80}. En roedores y

seres humanos, la quinasa PAK, blanco de RAC-1 activado por la insulina, también se activa por el ejercicio físico y en el proceso contráctil⁸¹. La inhibición farmacológica de RAC-1 o la supresión de su expresión produce una disminución del 30-40% en la incorporación de glucosa estimulada por el estiramiento pasivo⁷⁹. Se han estudiado proteínas de la membrana plasmática que serían las encargadas de captar los cambios de tensión sobre el miocito mediante la activación de RAC-1. Entre las proteínas estudiadas están el complejo glucoproteico de la distrofina (DGC: *dystrophin glycoprotein complex*), canales iónicos, uniones de adhesión focal e integrinas, que tienen la capacidad de detectar cambios de tensión, y que serían necesarias para activar a RAC-1⁸²⁻⁸⁴. Una vez activada RAC-1, se especula que podría ejercer su acción en al menos tres sitios distintos para promover la incorporación

de glucosa: 1) al igual que en la señalización promovida por la insulina, aquí también RAC-1 estimularía el reordenamiento del citoesqueleto de actina²⁴; 2) RAC-1 también activaría otra GTPasa denominada RALA (proteína Ral-A asociada a Ras), que parece estar implicada en el tráfico de GLUT-4⁸⁵; 3) RAC-1 formaría parte del complejo NOX2 (NADPH oxidasa 2), el cual se ha vinculado a la incorporación de glucosa muscular mediante el proceso contráctil⁸⁶.

En conclusión, tanto el bloqueo de la actividad de RAC-1 como su ausencia provocan una disminución parcial en el ingreso de glucosa. Esto nos autoriza a pensar que existen otros mecanismos y moléculas capaces de modular este proceso activado por la contracción muscular y el estiramiento pasivo (Figura 12, panel derecho).

En la Figura 12 se resumen esquemáticamente los tres mecanismos propuestos.



Señalización del calcio: el calcio está vinculado a la incorporación de glucosa en el músculo. El mecanismo parece requerir segundos mensajeros (cADPR y NAADP), proteínas detectoras de calcio como la calmodulina y la quinasa CaMKII. Otro mecanismo propuesto es la salida de ATP que activaría de forma autocrina los receptores purinérgicos, los cuales activarían una PI3K gamma distinta de la activada por la insulina.

Estrés metabólico: la actividad contráctil permite la activación de la quinasa AMPK, que detecta el desequilibrio energético, se activa, y fosforila e inhibe las GAP (TBC1D4 y TBC1D1) de las proteínas Rab. Esto libera el tráfico vesicular y la exocitosis de GLUT4.

Estrés mecánico: parece que las tensiones generadas por la contracción son detectadas por proteínas de la superficie celular. El blanco de estos sensores es RAC1, que se activa tanto durante la contracción como durante el estiramiento pasivo. Al igual que en el caso de la insulina, RAC1 activa la dinámica de la actina, pero también activaría otras vías como la proteína RALA y el aumento de ROS, lo cual incrementa el tráfico de GSV y la exocitosis de GLUT4.

cADPR: Cyclic ADP-ribose (ADP ribosa cíclico); NAADP: nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato); CaMKII: calmodulin kinase 2 (calmodulina quinasa 2); SR: sarcoplasmic reticulum (retículo sarcoplásmico); P2Y: purinergic 2 receptor (receptor purinérgico 2 acoplado a proteína G); PI3ky: phosphatidylinositol 3-kinase gamma. (fosfatidilinositol 3-quinasa gama); Akt2: RAC-beta serine/threonine-protein kinase (RAC-beta serina treonina proteína quinasa); AMPK: adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (proteína-quinasa activada por monofosfato de adenina 5); SNARK: sucrose nonfermenting AMPK-related kinase (sacarosa quinasa no fermentada relacionada con AMPK); DGC: dystrophin glycoprotein complex (complejo glucoproteico de la distrofina); RAC1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con la proteína Ras); PAK1: p21 (RAC1) activated kinase (quinasa p21 activada por RAC1); RALA: Ras-related protein Ral-A (proteína Ral-A asociada a Ras); ROS: reactive oxygen species (especies reactivas del oxígeno); ATP: adenosine triphosphate (trifosfato de adenosina); AMP: adenosine monophosphate (monofosfato de adenosina); AS160: Akt substrate of 160 KDa (sustrato de Akt de 160 KDa); GTP: guanosine triphosphate (trifosfato de guanosina); GSV: GLUT4 storage vesicle (vesículas de almacenamiento de GLUT4).

Figura 12: Mecanismos moleculares del ejercicio físico responsables de la translocación de GLUT-4 en el músculo.

Interacción entre la actividad física y la insulina. Eventos fisiológicos y moleculares

Aspectos fisiológicos de la actividad física

En la actividad física se observa una marcada disminución de los niveles de insulina debido a la inhibición alfa-adrenérgica de las células beta pancreáticas⁸⁶. No obstante, se ha sugerido que se requiere un mínimo nivel "permissivo" de insulina para lograr una incorporación más eficaz de glucosa⁸⁷. Si bien la insulina parece innecesaria para la captación de glucosa inducida por la contracción⁸⁸, se cree que existe una sinergia entre los efectos de la actividad física y la insulina, lo que podría estar vinculado a un mayor flujo sanguíneo muscular, como a un incremento en la translocación de GLUT-4. Una observación en consonancia con la sinergia propuesta es que la insulinopenia extrema durante el ejercicio reduce la captación de glucosa por el músculo⁸⁹. Sin embargo, es más probable que esto se deba a la severa hiperlipidemia asociada a la deficiencia de insulina que a los efectos directos de la falta de insulina¹. DeFronzo et al. realizaron en 10 sujetos sanos un *clamp* euglicémico e hiperinsulinémico con cateterismo arterial y venoso de un miembro inferior, el cual fue seguidamente sometido a 30 minutos de ejercicio⁹⁰. La absorción de glucosa aumentó notablemente como resultado de un incremento de nueve veces en el flujo sanguíneo y una diferencia de cuatro veces en la relación arteriovenosa de la glucemia. Este incremento en la captación de glucosa fue significativamente mayor que la suma de la actividad física sola y la insulina sola, lo que demuestra que la acción conjunta o simultánea, entre la hiperinsulinemia y el ejercicio, provoca una acción sinérgica. En este sentido, la ingesta de hidratos de carbono durante la actividad física es beneficiosa, ya que produce un aumento de los niveles de insulina, lo que incrementa aún más la captación de glucosa muscular, con una probable contribución adicional del aumento de la glucemia *per se* tras la ingesta⁸⁸. Hoy se sabe que el entrenamiento físico regular provoca un aumento de la densidad capilar muscular en los seres humanos. Por otra parte, la insulina también induce un aumento de la densidad capilar y de la vasodilatación que conduce a un mayor suministro de nutrientes. Por lo tanto, podemos concluir que la actividad física y la insulina son mecanismos sinérgicos que contribuyen a la mejora sostenida de la captación de glucosa estimulada por la insulina después del entrenamiento regular⁶⁶.

Además del aumento de la captación de glucosa muscular durante la actividad física, se produce un incremento en la captación de glucosa después de la actividad. La captación de glucosa aumenta hasta 4 horas después de la actividad, con independencia de la insulina. Luego, en una segunda fase posactividad, se observa una mayor sensibilidad a la insulina que dura cerca de 48 horas⁹¹. Esto se debe principalmente a un mecanismo local inducido por la contracción del músculo activo. Así, el ejercicio con una sola pierna conduce a una captación de glucosa muscular estimulada por insulina dos a cuatro veces mayor tras el ejercicio en comparación con la pierna no ejercitada⁹². Además, la sensibilidad a la insulina de los músculos no activos disminuye, lo que indica que las respuestas sistémicas al ejercicio exhaustivo prolongado (¿debido a la elevación de catecolaminas y de ácidos grasos?) pueden disminuir la acción de la insulina en los músculos no involucrados en el ejercicio. Fisiológicamente, esto tiene sentido, ya que una resistencia leve a la insulina en los músculos inactivos redistribuiría la glucosa sanguínea a los músculos activos. La sensibilidad a la insulina de todo el cuerpo tras el ejercicio dependerá, entonces, de la relación entre los músculos activos e inactivos, así como de la duración y la intensidad del ejercicio⁹³. Todo ello justificaría ampliamente indicar la realización de ejercicios aeróbicos y de fuerza, con la premisa de utilizar el mayor número posible de músculos y grandes grupos musculares.

Aumento de la sensibilidad a la insulina después del ejercicio. Mecanismos moleculares

La mayor sensibilidad a la insulina tras el ejercicio puede explicarse, en parte, por un aumento en la respuesta vasodilatadora del lecho microvascular a la insulina debido a un incremento del óxido nítrico (NO), probablemente por fosforilación y activación de eNOS por acción de AMPK en las células endoteliales durante el ejercicio⁹⁴.

Además de aumentar la respuesta vasodilatadora a la insulina en el período posterior al ejercicio, existen mecanismos moleculares en el miocito responsables del aumento de la translocación de GLUT-4 por la insulina que no modifican los pasos proximales de la señalización de la insulina. En otras palabras, la posactividad no incrementa la actividad tirosina-quinasa de RI, la fosforilación de tirosina del IRS1, la actividad de PI3K asociada a IRS1 ni la fosforilación de Akt2¹. Llamativamente, tampoco se debería a una mayor síntesis de

GLUT-4⁹⁵. Por otro lado, aunque la actividad de GS aumenta después de la depleción de glucógeno muscular provocada por el ejercicio, esto no se debería a un mayor efecto de la insulina⁹⁶.

Para comprender el aumento de la sensibilidad a la insulina tras la actividad física en el ME se debe prestar atención a los elementos comunes en ambas vías, es decir, los eventos moleculares que se activan tanto por la actividad física como por la insulina y que involucran la translocación de GLUT-4. Deberíamos centrar nuestra atención en los activadores de la exocitosis de GLUT-4 que persisten activos después de la actividad y en la recuperación. De esta manera, la insulina podría causar una activación adicional de los elementos ya activos posactividad y desencadenar una mayor incorporación de glucosa. Entre los elementos comunes activados por la insulina y por la actividad física la proteína GAP/TBC1D4/AS160 surge como molécula candidata, ya que además de ser fosforilada en varios sitios por acción de la insulina, es fosforilada en otros residuos por acción de la actividad física. Se ha demostrado que los ratones con desactivación génica (*knockout*, KO) para TBC1D4/AS160 incorporan glucosa normalmente durante el ejercicio, pero la sensibilización a la insulina se bloquea durante el período posterior a la actividad⁹⁷, lo que avalaría que TBC1D4/AS160 es el elemento clave de la sensibilización posterior al ejercicio. Por otro lado, su parólogo TBC1D1 también sería responsable de la translocación de GLUT-4 estimulada por la actividad física, pero no estimulada por la insulina⁹⁸. Por lo tanto, se cree que ambas proteínas GAP (TBC1D4/AS160 y TBC1D1) tienen similares Rab como proteínas blanco (Rab 13, Rab 8), lo que puede explicar la activación del mismo evento (exocitosis de GLUT-4) con estímulos diferentes. Sobre la base de experimentos en ratones KO para AMPK, esta última parece ser en gran medida responsable de la fosforilación de TBC1D4/AS160 durante el ejercicio y, de hecho, el ME de estos animales no evidencia una mayor sensibilidad a la insulina en la posactividad⁹⁹. En otras palabras, la activación de AMPK y TBC1D4/AS160 en la actividad física sería responsable del aumento de la sensibilidad a la insulina tras el ejercicio.

Los efectos de una sola sesión de ejercicio sobre el aumento de la sensibilidad a la insulina duran como máximo 48 horas. No obstante, el entrenamiento regular induce adaptaciones más duraderas, y mejora la acción de la insulina tanto

en las personas sanas como en los pacientes con DM2, incluso en mayor magnitud que los fármacos utilizados contra la DM.

Algunos de los efectos observados con el entrenamiento regular incluyen una mayor expresión de proteínas involucradas en la cascada de señalización de la insulina, el aumento en la cantidad de GLUT-4, la mayor cantidad de hexoquinasa II y de glucógeno, y la mayor cantidad y volumen de las mitocondrias¹⁰⁰. No obstante, estos mecanismos propuestos son controvertidos y se necesitan más investigaciones al respecto.

El entrenamiento físico regular también mejora la sensibilidad a la insulina y la vascularización del tejido adiposo². En un estudio en seres humanos después de 10 semanas de entrenamiento se observó un aumento de la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo subcutáneo evaluado por la supresión de la lipólisis, y mayor expresión de proteínas del receptor de insulina y de hexoquinasa II. Por lo tanto, al igual que el ME, el entrenamiento parece potenciar la acción de la insulina en el tejido adiposo³.

En síntesis, la insulina y la actividad física son, en gran parte, responsables del equilibrio entre los depósitos y las demandas energéticas. Si esta homeostasis energética se altera como en el caso del sedentarismo, la obesidad y la DM2, se generan desequilibrios metabólicos que conducen a diversos estados patológicos. El tejido muscular es un órgano que cumple una función esencial en el metabolismo energético y en la regulación de la glucemia. Si bien conocemos numerosos eventos desencadenados por el ejercicio, aún quedan muchos mecanismos moleculares por estudiar que pueden influir y modular la incorporación de la glucosa en el ME. Se ha demostrado que luego del estímulo contráctil más de mil proteínas musculares cambian su estado de fosforilación; sin embargo, se desconocen en gran medida sus implicaciones metabólicas¹⁰¹. Así, poco a poco, los avances científicos nos ayudan a comprender, aunque de manera muy minimalista, los distintos eventos y regulaciones sobre el ingreso de la glucosa tanto por la insulina como por el ejercicio. Por consiguiente, los conocimientos moleculares y fisiológicos aquí detallados aportan argumentos más que suficientes para apoyar la idea de que la actividad física es fundamental en la regulación de la glucemia, y la convierten en una aliada en el mantenimiento de la homeostasis energética no solo en las personas sanas, sino también en aquellas con patologías metabólicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Sylow L, Tokarz VL, Richter EA, Klip A. The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia. *Cell Metab* 2021;33(4):758-780.
- Jaldin-Fincati JR, Pavarotti M, Frendo-Cumbo S, Bilan PJ, Klip A. Update on GLUT-4 vesicle traffic. A cornerstone of insulin action. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28(8):597-611.
- Richter EA, Sylow L, Hargreaves M. Interactions between insulin and exercise. *Biochem J* 2021;478(21):3827-3846.
- Lawrence MC. Understanding insulin and its receptor from their three-dimensional structures. *Mol Metab* 2021;52:101255.
- De Meyts P, Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(10):769-783.
- De Meyts P. The insulin receptor and its signal transduction network. En: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK378978/> [Consultado febrero 2023].
- Boucher J, Kleinriders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6(1):a009191.
- Kaburagi Y, Yamauchi T, Yamamoto-Honda R, et al. The mechanism of insulin-induced signal transduction is mediated by the insulin receptor substrate family. *Endocr J* 1999;46(Suppl):S25-34.
- Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins. *Cell Cycle* 2011;10(11):1750-1756.
- Chang L, Chiang S-H, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 2004;10(7-12):65-71.
- Swiderska E, Strycharz J, Wróblewski A, et al. Role of PI3K/Akt pathway in insulin-mediated glucose uptake. *Intech Open*; 2018.
- Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signaling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand* 2005;183(1):3-12.
- Farese RV. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283(1):E1-11.
- Osorio-Fuentealba C, Klip A. Dissecting signaling by individual Akt/PKB isoforms, three steps at once. *Biochem J* 2015;470(2):e13-16.
- Manning BD, Toker A. Akt/PKB signaling: navigating the Network. *Cell* 2017;169(3):381-405.
- Nomiyama R, Emoto M, Fukuda N, et al. Protein kinase C iota facilitates insulin-induced glucose transport by phosphorylation of soluble NSF attachment protein receptor regulator (SNARE) double C2 domain protein b. *J Diabetes Investig* 2019;10(3):591-601.
- Mann G, Riddell MC, Adegoke OAJ. Effects of acute muscle contraction on the key molecules in insulin and Akt signaling in skeletal muscle in health and in insulin resistant states. *Diabetology* 2022;3(3):423-446.
- Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 2008;27(41):5527-5541.
- Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(8):513-525.
- Sun Y, Bilan PJ, Liu Z, Klip A. Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT-4 translocation in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):19909-19914.
- Sano H, Peck GR, Kettenbach AN, Gerber SA, Lienhard GE. Insulin-stimulated GLUT-4 protein translocation in adipocytes requires the Rab10 guanine nucleotide exchange factor Dennd4C. *J Biol Chem* 2011;286(19):16541-16545.
- Klip A, Sun Y, Chiu TT, Foley KP. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT-4 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014;306(10):C879-886.
- Sylow L, Jensen TE, Kleinert M, et al. RAC1 signaling is required for insulin-stimulated glucose uptake and is dysregulated in insulin-resistant murine and human skeletal muscle. *Diabetes* 2013;62(6):1865-75.
- Sylow L, Jensen TE, Kleinert M, et al. RAC1 is a novel regulator of contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes* 2013;62(4):1139-1151.
- Balamatsias D, Kong AM, Waters JE, et al. Identification of P-Rex1 as a novel RAC1-guanine nucleotide exchange factor (GEF) that promotes actin remodeling and GLUT-4 protein trafficking in adipocytes. *J Biol Chem* 2011;286(50):43229-43240.
- Takenaka N, Yasuda N, Nihata Y, et al. Role of the guanine nucleotide exchange factor in Akt2-mediated plasma membrane translocation of GLUT-4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Cell Signal* 2014;26(11):2460-2469.
- Chiu TT, Patel N, Shaw AE, Bamburg JR, Klip A. Arp2/3- and cofilin-coordinated actin dynamics is required for insulin-mediated GLUT-4 translocation to the surface of muscle cells. *Mol Biol Cell* 2010;21(20):3529-3539.
- Rudich A, Klip A. Putting RAC1 on the path to glucose uptake. *Diabetes* 2013;62(6):1831-1832.
- Foster LJ, Klip A. Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279(4):C877-890.
- Thurmond DC, Pessin JE. Molecular machinery involved in the insulin-regulated fusion of GLUT-4-containing vesicles with the plasma membrane (review). *Mol Membr Biol* 2001;18(4):237-245.
- Grusovin J, Macaulay SL. Snares for GLUT-4 mechanisms directing vesicular trafficking of GLUT-4. *Front Biosci* 2003;8:d620-641.
- Bryant NJ, Gould GW. SNARE Proteins underpin insulin-regulated GLUT-4 traffic. *Traffic* 2011;12(6):657-664.
- Jewell JL, Oh E, Ramalingam L, et al. Munc18c phosphorylation by the insulin receptor links cell signaling directly to SNARE exocytosis. *J Cell Biol* 2011;193(1):185-199.
- Latham CF, López JA, Hu S-H, et al. Molecular dissection of the Munc18c/syntaxin4 interaction: implications for regulation of membrane trafficking. *Traffic* 2006;7(10):1408-1419.
- Macaulay SL, Grusovin J, Stoichevska V, Ryan JM, Castelli LA, Ward CW. Cellular munc18c levels can modulate glucose transport rate and GLUT-4 translocation in 3T3L1 cells. *FEBS Lett* 2002;528(1-3):154-160.
- Bakke J, Bettaieb A, Nagata N, Matsuo K, Haj FG. Regulation of the SNARE-interacting protein Munc18c tyrosine phosphorylation in adipocytes by protein-tyrosine phosphatase 1B. *Cell Commun Signal* 2013;11:57.
- Yu H, Rathore SS, Shen J. Synip arrests soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)-dependent membrane fusion as a selective target membrane SNARE-binding inhibitor. *J Biol Chem* 2013;288(26):18885-18893.
- Saito T, Okada S, Nohara A, et al. Syntaxin4 interacting protein (Synip) binds phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate. *PLoS ONE* 2012;7(8):e42782.
- Yamada E, Okada S, Saito T, et al. Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT-4-containing vesicles. *J Cell Biol* 2005;168(6):921-928.
- Miyazaki M, Emoto M, Fukuda N, Hatanaka M, Taguchi A, Miyamoto S, Tanizawa Y. Doc2b is a SNARE regulator of glucose-stimulated delayed insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;384(4):461-465.
- Yu H, Rathore SS, Davis EM, Ouyang Y, Shen J. Doc2b promotes GLUT-4 exocytosis by activating the SNARE-mediated fusion reaction in a calcium- and membrane-bending-dependent manner. *Mol Biol Cell* 2013;24(8):1176-1184.
- Ramalingam L, Oh E, Thurmond DC. Doc2b enrichment enhances glucose homeostasis in mice via potentiation of insulin secretion and peripheral insulin sensitivity. *Diabetologia* 2014;57(7):1476-1484.

43. Cai H, Reim K, Varoquaux F, et al. Complexin II plays a positive role in Ca²⁺-triggered exocytosis by facilitating vesicle priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(49):19538-19543.
44. Huntwork S, Littleton JT. A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth. *Nat Neurosci* 2007;10(10):1235-1237.
45. Pavarotti MA, Tokarz V, Frendo-Cumbo S, et al. Complexin-2 redistributes to the membrane of muscle cells in response to insulin and contributes to GLUT-4 translocation. *Biochem J* 2021;478(2):407-422.
46. Bertrand L, De Loof M, Beauloye C, Horman S, Bultot L. A new degree of complexity (n)ty in the regulation of GLUT-4 trafficking. *Bioch J* 2021;478(7):1315-1319.
47. Bouskila M, Hunter RW, Ibrahim AFM, et al. Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell Metabolism* 2010;12(5):456-466.
48. Richter EA, Ruderman NB, Gavras H, Belur ER, Galbo H. Muscle glycogenolysis during exercise: dual control by epinephrine and contractions. *Am J Physiol* 1982;242(1):E25-32.
49. Kennedy JW, Hirshman MF, Gervino EV, et al. Acute exercise induces GLUT-4 translocation in the skeletal muscle of normal human subjects and subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48(5):1192-1197.
50. Richter EA, et al. Sarcolemmal glucose transport and GLUT-4 translocation during exercise are diminished by endurance training. *Am J Physiol* 1998;274(1):E89-95.
51. Katz A, Broberg S, Sahlin K, Wahren J. Leg glucose uptake during maximal dynamic exercise in humans. *Am J Physiol* 1986;251(1 Pt 1):E65-70.
52. Richter EA. Is GLUT-4 translocation the answer to exercise-stimulated muscle glucose uptake? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2021;320(2):E240-E243.
53. Richter EA, Hargreaves M. Exercise, GLUT-4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev* 2013;93(3):993-1017.
54. Andersen P, Saltin B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *J Physiol* 1985;366:233-249.
55. Dawson D, Vincent MA, Barrett EJ, et al. Vascular recruitment in skeletal muscle during exercise and hyperinsulinemia assessed by contrast ultrasound. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(3):E714-20.
56. Inyard AC, Clerk LH, Vincent MA, Barrett EJ. Contraction stimulates nitric oxide-independent microvascular recruitment and increases muscle insulin uptake. *Diabetes* 2007;56(9):2194-200.
57. Rowell LB, Shepherd JT, editors. *Handbook of Physiology: Section 12: Exercise: regulation and integration of multiple systems*. 1st ed. American Physiological Society/Oxford Univ Press; 1996.
58. Martin IK, Katz A, Wahren J. Splanchnic and muscle metabolism during exercise in NIDDM patients. *Am J Physiol* 1995;269(3 Pt 1):E583-90.
59. Hargreaves M, Meredith I, Jennings G. Muscle glycogen and glucose uptake during exercise in humans. *Exp Physiol* 1992;77(4):641-644.
60. Jensen TE, Sylow L, Rose AJ, et al. Contraction-stimulated glucose transport in muscle is controlled by AMPK and mechanical stress but not sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Molecular Metabolism* 2014;3(7):742-753.
61. Wright DC, Hucker KA, Holloszy JO, Han DH. Ca²⁺ and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes* 2004;53(2):330-335.
62. Osorio-Fuentealba C, Contreras-Ferrat AE, Altamirano F, et al. Electrical stimuli release ATP to increase GLUT-4 translocation and glucose uptake via PI3K γ -Akt-AS160 in skeletal muscle cells. *Diabetes* 2013;62(5):1519-1526.
63. Witczak CA, Jessen N, Warro DM, et al. CaMKII regulates contraction-induced, but not insulin-induced, glucose uptake in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298(6):E1150-1160.
64. Chambers MA, et al. Stretch-stimulated glucose uptake in skeletal muscle is mediated by reactive oxygen species and p38 MAP-kinase. *J Physiol* 2009;587(Pt 13):3363-3373.
65. Sandström ME, Zhang S-J, Bruton J, et al. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J Physiol* 2006;575(1):251-262.
66. Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2005;99(1):330-337.
67. Costford SR, Kavaslar N, Ahituv N, et al. Gain-of-function R225W mutation in human AMPK γ 3 causing increased glycogen and decreased triglyceride in skeletal muscle. *PLOS ONE* 2007;2(9):e903.
68. Liu Y, Lai Y-C, Hill EV, et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) is an AMPK target participating in contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Bioch J* 2013;455(2):195-206.
69. Koh HJ, et al. Sucrose nonfermenting AMPK-related kinase (SNARK) mediates contraction-stimulated glucose transport in mouse skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(35):15541-15546.
70. Jensen TE, Angin Y, Sylow L, Richter EA. Is contraction-stimulated glucose transport feedforward regulated by Ca²⁺? *Exp Physiol* 2014;99(12):1562-1568.
71. Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signaling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol* 2006;574(Pt 3):889-903.
72. Park DR, Park KH, Kim BJ, Yoon CS, Kim UH. Exercise ameliorates insulin resistance via Ca²⁺ signals distinct from those of insulin for GLUT-4 translocation in skeletal muscles. *Diabetes* 2015;64(4):1224-1234.
73. Lee HC. Cyclic ADP-ribose and NAADP: fraternal twin messengers for calcium signaling. *Sci China Life Sci* 2011;54(8):699-711.
74. Guse AH, Wolf IMA. Ca (2+) microdomains, NAADP and type 1 ryanodine receptor in cell activation. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(6 Pt B):1379-1384.
75. Jensen TE, Rose AJ, Hellsten Y, Wojtaszewski JFP, Richter EA. Caffeine-induced Ca²⁺ release increases AMPK-dependent glucose uptake in rodent soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293(1): E286-292.
76. Li J, King NC, Sinoway LI. Interstitial ATP and norepinephrine concentrations in active muscle. *Circulation* 2005;111(21):2748-2751.
77. Yano S, Morino-Koga S, Kondo T, et al. Glucose uptake in rat skeletal muscle L6 cells is increased by low-intensity electrical current through the activation of the phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI-3K)/Akt pathway. *J Pharmacol Sci* 2011;115(1):94-98.
78. Kim MS, Lee J, Ha J, et al. ATP stimulates glucose transport through activation of P2 purinergic receptors in C(2)C(12) skeletal muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 2002;401(2):205-14.
79. Sylow L, Møller LLV, Kleinert M, Richter EA, Jensen TE. Stretch-stimulated glucose transport in skeletal muscle is regulated by RAC1. *J Physiol* 2015;593(3):645-656.
80. Sylow L, Nielsen IL, Kleinert M, et al. RAC1 governs exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle through the regulation of GLUT-4 translocation in mice. *J Physiol* 2016;594(17):4997-5008.
81. Zhou Y, Jiang D, Thomason DB, Jarrett HW. Laminin-induced activation of RAC1 and JNKp46 is initiated by Src family kinases and mimics the effects of skeletal muscle contraction. *Biochemistry* 2007;46(51):14907-14916.
82. Oak SA, Zhou YW, Jarrett HW. Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and RAC1. *J Biol Chem* 2003;278(41):39287-39295.
83. Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, et al. TRPC3-mediated Ca²⁺ influx contributes to RAC1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;409(1):108-113.
84. Huveneres S, Danen EH. Adhesion signaling crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci*. 2009 Apr 15;122(Pt 8):1059-1069.

85. Nozaki S, Ueda S, Takenaka N, Kataoka T, Satoh T. Role of RalA downstream of RAC1 in insulin-dependent glucose uptake in muscle cells. *Cell Signal* 2012;24(11):2111-2117.
86. Järhult J, Holst J. The role of the adrenergic innervation to the pancreatic islets in the control of insulin release during exercise in man. *Pflügers Arch* 1979;383(1):41-45.
87. Berger M, Hagg S, Ruderman NB. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Interaction of insulin and exercise on glucose uptake. *Biochem J* 1975;146(1):231-238.
88. Ploug T, Galbo H, Richter EA. Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin. *Am J Physiol*. 1984;247(6 Pt 1):E726-31.
89. Wasserman DH, Mohr T, Kelly P, Lacy DB, Bracy D. Impact of insulin deficiency on glucose fluxes and muscle glucose metabolism during exercise. *Diabetes* 1992;41(10):1229-1238.
90. DeFronzo RA, Ferrannini E, Sato Y, Felig P, Wahren J. Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. *J Clin Invest* 1981;68(6):1468-1474.
91. Mikines KJ, et al. Effect of physical exercise on sensitivity and responsiveness to insulin in humans. *Am J Physiol* 1988;254(3 Pt1):E248-259.
92. Wojtaszewski JF, et al. Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle. *Diabetes* 2000;49(3):325-331.
93. Steenberg DE, et al. A single bout of one-legged exercise to local exhaustion decreases insulin action in nonexercised muscle leading to decreased whole-body insulin action. *Diabetes* 2020;69(4):578-590.
94. Cacicedo JM, Gauthier M-S, Lebrasseur NK, Jasuja R, Ruderman NB, Ido Y. Acute exercise activates AMPK and eNOS in the mouse aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301(4):H1255-1265.
95. Fisher JS, Gao J, Han DH, Holloszy JO, Nolte LA. Activation of AMP kinase enhances sensitivity of muscle glucose transport to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(1):E18-23.
96. Pehmøller C, Brandt N, Birk JB, et al. Exercise alleviates lipid-induced insulin resistance in human skeletal muscle-signaling interaction at the level of TBC1 domain family member 4. *Diabetes* 2012;61(11):2743-2752.
97. Kjøbsted R, Chadt A, Jørgensen NO, et al. TBC1D4 is necessary for enhancing muscle insulin sensitivity in response to AICAR and contraction. *Diabetes* 2019;68(9):1756-1766.
98. Whitfield J, Paglialunga S, Smith BK, et al. Ablating the protein TBC1D1 impairs contraction-induced sarcolemmal glucose transporter 4 redistribution but not insulin-mediated responses in rats. *J Biol Chem* 2017;292(40):16653-16664.
99. Kjøbsted R, Munk-Hansen N, Birk JB, et al. Enhanced muscle insulin sensitivity after contraction/exercise is mediated by AMPK. *Diabetes* 2016;66(3):598-612.
100. Moore TM, Zhou Z, Cohn W, et al. The impact of exercise on mitochondrial dynamics and the role of Drp1 in exercise performance and training adaptations in skeletal muscle. *Mol Metab* 2018;21:51-67.
101. Deshmukh AS, Murgia M, Nagaraj N, Trebak JT, Cox J, Mann M. Deep proteomics of mouse skeletal muscle enables quantitation of protein isoforms, metabolic pathways, and transcription factors. *Mol Cell Proteomics* 2015;14(4):841-853.