



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Laboratorio de Metabolismo y Remodelado Vascular

## **INTERLEUQUINA 6 INDUCE DESDIFERENCIACIÓN DE LÍNEA CELULAR DE MUSCULO LISO VASCULAR**

Memoria de título presentada a la Universidad de Chile para optar al título de  
Bioquímico

**Tomás Alonso Hernández Díaz**

**Profesor Patrocinante**  
**Dr. Mario Chiong Lay**

**Director de Memoria**  
**Dr. Mario Chiong Lay**

**Santiago, Chile**  
**Octubre 2019**

## DEDICATORIA



Ushuaia  
Argentina

En algún lugar algo increíble está esperando a ser descubierto.  
Carl Sagan

## AGRADECIMIENTOS

En primera instancia deseo agradecer a las circunstancias que hicieron posible vivir, desarrollar y terminar esta hermosa etapa de mi vida llamada Universidad. Agradecido de la carrera misma, tan compleja como bella, pues intentar dilucidar y entender la vida, sus por qué y para qué, me han enseñado nuevas perspectivas con las cuales enfrentar la vida.

Manifiesto infinito agradecimiento a mi Familia que incondicionalmente me han apoyado (en todo aspecto) desde el principio, hasta el final y aún más allá. Agradecido de su compañía durante el cierre de esta etapa y el inicio de un nuevo camino. Madre, gracias por tanto y perdón por tan poco, gracias a ti soy la persona que soy. Carlos, Marco, Gata, Hermi, Valentina, Matías y Edgard, ustedes son parte fundamental de este camino recorrido, todos ustedes son parte de mi formación personal y profesional y gracias a ustedes estoy donde estoy. Sepan que lo vivido como Familia nunca lo olvidaré, son parte de mí, por lo que siempre están presentes.

Agradezco a los Profesores que me han entregado las herramientas profesionales con las cuales ejerceré como científico. Especialmente agradecido de mi Profesor Tutor Mario Chiong, quien desde un principio confió en mí, como ayudante y como tesista. Su confianza ha sido necesaria para aprender a ser autónomo y poder alcanzar las metas propuestas.

Agradecer con cariño al Profesor Paredes, un goleador innato, con quien codo a codo ganamos y perdimos partidos. Agradecido de ambos por su apoyo en mis decisiones y por sus recomendaciones para el doctorado y para Conicyt.

Agradecer a Jaime, Daniça, Pablo Morales, Feña, Carlita, Yani, Pablo Shico, Mati, Karina, Moni, Pancho, Pancha, Cami y Vale, compañeros de laboratorio que en el transcurso de esta memoria hicieron que cada día fuese aún mejor. Mención honrosa a Don Fidel, a la tía Gindra y Apu, que con su gran labor técnica permiten el normal y buen funcionamiento del laboratorio.

Agradecido de mis amigos: Negro, Val, Negra, Nanda, Jotape, Danae, Toño y Vicho. Con cada uno de ustedes aprendí algo distinto, gracias a lo cual crecí como persona. Agradezco ese abrazo que nunca faltó, esa palabra de apoyo y ánimo que nunca sobró. Palabras faltan para describir y recordar las historias y anécdotas juntos. Negro, los lazos sanguíneos no son requisito para ser familia. También agradecer a Angela, que este último tiempo aportó en el término de esta etapa. Agradezco a mis amigos del colegio: Aguayo, Suxi y Bruno. Con quienes he compartido buenos momentos a lo largo del colegio y la Universidad.

Agradezco con orgullo haber sido parte de distintos equipos de futbol, Sport el Negro, Neurobq, Real Cólicos FC, Neurolácticos, Sport el Chico FC, Neuróticos y Dopaminas. En cada partido con cada equipo, aprendí a que no estamos solos, a veces me apoyaban o apoyaba, lo importante siempre fue, es y será pasarla bien juntos como equipo. Destaco 2 cosas importantes: las derrotas enseñan más que las victorias y un equipo a veces es una familia.

Quiero agradecer a Camila. Una persona que admiro, y además con quien compartí penas y alegrías, fracasos y triunfos, pero por sobre todo cariño, confianza y amor.

Finalmente agradecer especialmente a Ignacio y a Poli. Quienes me ayudaron con los experimentos durante esta memoria. Junto a ellos aprendí mucho,

tanto del laboratorio como de la vida. Gracias a ellos no solo seré un mejor profesional, también soy y seré una mejor persona. Chiquillos (todos), cada uno de ustedes se mostró dispuesto a ayudarme y a enseñarme con paciencia cada vez que lo requería y con cada uno de ustedes aprendí algo distinto y valioso, gracias.

En fin, agradecido de la vida por poner en mi camino a personas maravillosas, gracias a las cuales he crecido profesional y personalmente.

## FINANCIAMIENTO Y EXPOSICIÓN DE RESULTADOS

Esta memoria de título ha sido financiada por la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT), Chile, a través de Proyecto FONDECYT 1180157 y FONDAP ACCDiS 15130011.

Resultados obtenidos en el desarrollo de esta memoria han sido presentados en:

### XXXV Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica ANEB

Universidad de Santiago de Chile

Santiago, Chile, 30 julio – 3 agosto 2018

Título: Interleuquina 6 induce migración de células de musculo liso vascular

Autores: Hernández T., Villar P., Norambuena-Soto I., Cancino N., Sanhueza F., Chiong M.

Premio Mención Honrosa en Exposición de Paneles.

### XXXIII Reunión Anual Sociedad de Ciencias Fisiológicas

International Society for Heart Research (ISHR) Latin American Section

Reserva Ecológica Huilo-Huilo, Chile, 28 – 31 agosto 2018

Título: *Interleukin 6 promotes dedifferentiation of vascular smooth muscle cells*

Autores: Hernández T., Villar P., Norambuena-Soto I., Cancino N., Sanhueza F., Chiong M.

XXXVI Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica ANEB

Universidad de la Frontera (UFRO)

Temuco, Chile, 29 julio – 1 agosto 2019

Título: Interleuquina 6 induce migración de células de musculo liso vascular.

Autores: Hernández T., Villar P., Norambuena-Soto I., Cancino N., Sanhueza F.,  
Chiong M.

XLII Annual meeting of SBBMCh/ XIV Annual meeting of Chilean Society of Plant  
Biologist

Hotel Gavina Sens Iquique, Chile, 8 – 11 octubre 2019

Título: *Interleukin 6 promotes dedifferentiation of vascular smooth muscle cells.*

Autores: Hernández T., Villar P., Norambuena-Soto I., Cancino N., Sanhueza F.,  
Chiong M.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	iii
FINANCIAMIENTO Y EXPOSICIÓN DE RESULTADOS .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
ABREVIATURAS .....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
Enfermedades cardiovasculares .....	1
Fisiopatología arterial.....	3
Células musculares lisas vasculares .....	4
Remodelado vascular y deporte.....	7
Mioquinas y CMLV .....	9
Interleuquina-6 .....	10
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general .....	15
Objetivos específicos .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
Cultivo celular .....	16
Protocolo de estimulación con IL-6.....	16
Lisis celular .....	17
Cuantificación de las proteínas .....	18
Preparación de las muestras .....	18
Evaluación de los niveles de proteínas contráctiles por Western blot.....	19
Evaluación de la migración por cierre de herida .....	20
Evaluación de la migración por ensayo transwell .....	21
Ensayo de proliferación celular por MTT .....	21



Conteo celular .....	22
Expresión de resultados y análisis estadístico .....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
Efecto de IL-6 sobre la migración celular en CMLV .....	24
Efecto de IL-6 sobre la proliferación de las CMLV .....	32
Efecto de IL-6 sobre los niveles de proteínas contráctiles en CMLV .....	35
PROYECCIONES .....	42
CONCLUSIONES .....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Principales causas de mortalidad a nivel mundial en el año 2016. ....	1
Figura 2.	Progreso de obstrucción de una arteria por aterosclerosis. ....	4
Figura 3.	Fenotipos de células de musculo liso vascular. ....	6
Figura 4.	Fisiopatología de la aterosclerosis. ....	7
Figura 5.	Remodelado vascular y sus principales factores. ....	8
Figura 6.	Liberación de IL-6 por el musculo esquelético. ....	10
Figura 7.	Vías de señalización activadas por IL-6. ....	12
Figura 8.	Resumen de antecedentes. ....	14
Figura 9.	Estrategia experimental según parámetro fenotípico a evaluar. ....	17
Figura 10.	Ensayo de cierre de herida. ....	20
Figura 11.	Reducción de MTT a formazán. ....	22
Figura 12.	Validación de PDGF-BB como control positivo. ....	25
Figura 13.	Efecto dosis respuesta de IL-6 sobre la migración de células A7r5. ....	27
Figura 14.	Efecto comparativo de la migración de células A7r5 inducida por IL-6 y PDGF-BB. ....	29
Figura 15.	Efecto de IL-6 sobre la migración de células A7r5 medida por Transwell. ....	30
Figura 16.	Efecto de IL-6 sobre la proliferación de células A7r5 determinada por MTT. ....	33
Figura 17.	Efecto de IL-6 sobre la proliferación de las células A7r5 determinada por conteo celular. ....	35
Figura 18.	Efecto de IL-6 sobre los niveles proteicos de $\alpha$ -SMA en células A7r5. ....	37
Figura 19.	Efecto de IL-6 sobre los niveles proteicos de calponina en células A7r5. ...	39
Figura 20.	Efecto de IL-6 sobre los niveles proteicos de SM22 en células A7r5. ....	40

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-SMA:</b>	Actina de músculo liso isoforma alfa ( <i><math>\alpha</math> smooth muscle actin</i> )
<b>AMP:</b>	Adenosín monofosfato
<b>AMPK:</b>	Proteína quinasa activada por AMP ( <i>AMP-activated protein kinase</i> )
<b>BDNF:</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro ( <i>Brain derived neurotrophic factor</i> )
<b><math>\beta</math>-MHC:</b>	Cadena pesada de $\beta$ miosina ( <i><math>\beta</math> myosin heavy chain</i> )
<b>BrdU:</b>	Bromo-deoxiuridina ( <i>bromodeoxyuridine</i> )
<b>CMLV:</b>	Células de músculo liso vascular
<b>DMEM:</b>	Medio Dulbecco modificado de Eagle
<b>ECV:</b>	Enfermedades cardiovasculares
<b>EEM:</b>	Error estándar medio
<b>FBS:</b>	Suero fetal bovino ( <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FGF:</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos ( <i>fibroblast growth factor</i> )
<b>IL:</b>	Interleuquina ( <i>i.e.</i> IL-6: Interleuquina-6)
<b>IL-1ra:</b>	Antagonista del receptor de Interleuquina 1 ( <i>Interleukin 1 receptor antagonist</i> )
<b>kDa:</b>	kilo Dalton
<b>LIF:</b>	Factor inhibidor de leucemia ( <i>Leukemia inhibitory factor</i> )
<b>MCP-1:</b>	Proteína 1 quimioattractante de monócitos ( <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> )
<b>MEC:</b>	Matriz extracelular
<b>MTT:</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

<b>OMS:</b>	Organización mundial de la salud
<b>PBS:</b>	Amortiguador fosfato salino ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR:</b>	Proteína C reactiva
<b>PDGF:</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
<b>PI:</b>	Yoduro de propidio ( <i>prodim iodide</i> )
<b>PVDF:</b>	Difluoruro de polivinilideno ( <i>polyvinylidene difluoride</i> )
<b>qPCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa ( <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> )
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>RIPA:</b>	Amortiguador de lisis celular ( <i>Radioimmunoprecipitation assay</i> )
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato de sodio ( <i>sodium dodecil sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis</i> )
<b>sIL-6R:</b>	Receptor soluble de interleuquina-6 ( <i>soluble interleukin-6 receptor</i> )
<b>TBS-T:</b>	Amortiguador tris salino – tween ( <i>tris buffered saline - tween</i> )
<b>TEMED:</b>	Tetrametil-etilendiamina
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Factor de crecimiento transformante beta ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>tumoral necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
<b>VEGF:</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular ( <i>Vascular endotelial growth factor</i> )

## RESUMEN

Las células de músculo liso vascular (CMLV) son el principal componente de la túnica media en las arterias. Poseen una gran plasticidad fenotípica pasando de un estado diferenciado a desdiferenciado. Las CMLV desdiferenciadas son capaces de proliferar y migrar, participando en la angiogénesis y en el desarrollo de distintas patologías como aterosclerosis, hipertensión y estenosis. Un factor protector contra estas enfermedades es el deporte. Interleuquina-6 (IL-6) es una cito-mioquina, liberada por el músculo esquelético después de realizar actividad física. IL-6 tiene 2 vías de señalización: una clásica, con su receptor unido a la membrana plasmática, y una trans-señalización, con el receptor soluble de IL-6 (sIL-6R). De esta forma surge la duda del efecto de IL-6 sobre el fenotipo de CMLV. La hipótesis planteada es “Interleuquina 6 induce la desdiferenciación de línea celular de musculo liso vascular”. Los objetivos fueron: evaluar el efecto de IL-6 sobre la migración celular; registrar si IL-6 tiene efecto sobre la tasa de proliferación celular y determinar si IL-6 produce cambios en la cantidad de proteínas contráctiles.

Para estudiar el efecto de IL-6 sobre CMLV se utilizaron 3 marcadores fenotípicos de diferenciación: migración, proliferación y cantidad de proteínas contráctiles. Para evaluar migración se utilizó ensayo de cierre de herida y Transwell; para proliferación se usó viabilidad por MTT y para medir cantidad de proteínas contráctiles se utilizó Western blot.

La señalización clásica de IL-6 produjo migración en CMLV de manera dosis y tiempo dependiente. Sin embargo, IL-6 no indujo proliferación celular y no alteró los niveles de proteínas contráctiles  $\alpha$ -SMA; calponina y SM22.

Con estos resultados *in vitro* se esclarece el rol de IL-6 sobre el proceso de diferenciación de CMLV y su posible participación en la cardioprotección observada en atletas.

## ABSTRACT

### Interleukin 6 induces dedifferentiation of vascular smooth muscle cells

Vascular smooth muscle cells (VSMC) are the main component of the tunica media in the arteries. They have a great phenotypic plasticity ranging from differentiated to dedifferentiated states. Dedifferentiated VSMC are able to proliferate and migrate, participating in angiogenesis and development of different pathologies such as atherosclerosis, hypertension and stenosis. A protective factor against these diseases is sport. Interleukin-6 (IL-6) is a cyto-myokine, released by skeletal muscle after physical activity. IL-6 has 2 signaling pathways: a classical one, with its receptor attached to plasma membrane, and a trans-signaling, with the soluble IL-6 receptor (sIL-6R). Here the question to answer is about the effect of interleukin 6 on vascular smooth muscle cells phenotype. The hypothesis is "Interleukin 6 induces the dedifferentiation of vascular smooth muscle cell line.". The objectives were: evaluate the effect of IL-6 on cell migration; record if IL-6 has an effect on the rate of cell proliferation and determine if IL-6 produces changes in the amount of contractile proteins.

The effect of IL-6 on VSMC was studied using 3 phenotypic differentiation markers: migration, proliferation and contractile protein levels. Migration was assessed by wound closure and transwell assays; viability was evaluated by MTT and Western blot to measure contractile protein levels.

The IL-6 classic signaling triggered migration in VSMC in a dose and time-dependent manner. However, IL-6 did not induce cell proliferation and did not alter contractile proteins  $\alpha$ -SMA, calponin and SM22 levels.

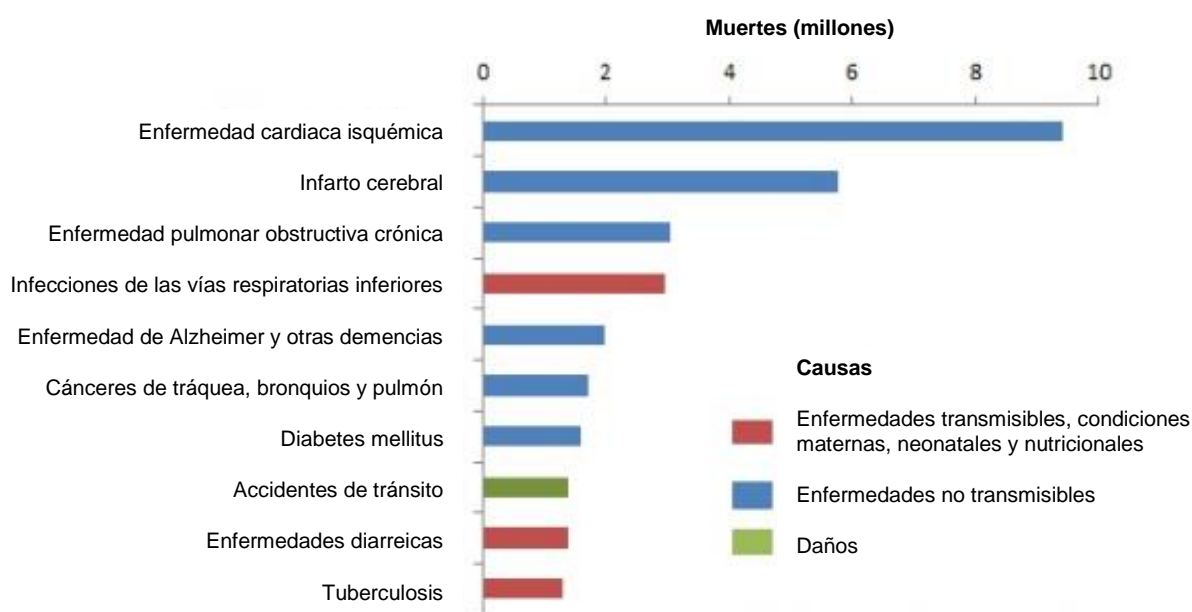
Taking together, these results suggest that IL-6 induces partial VSMC dedifferentiation. This work will contribute to clarify the possible participation of IL-6 in the cardioprotection observed in athletes.



## INTRODUCCIÓN

### Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de patologías que afectan al corazón y los vasos sanguíneos. A nivel mundial son la principal causa de morbilidad y mortalidad de la población. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2016 murieron 17,9 millones de personas a causa de las ECV, siendo la principal causa de muerte durante los últimos 15 años (Figura 1) [1].



**Figura 1. Principales causas de mortalidad a nivel mundial en el año 2016.** Estimación de las principales causas de muerte a nivel mundial. En primer y segundo lugar destacan 2 enfermedades cardiovasculares [1].

En Chile, hubo aproximadamente un 35% de defunciones por ECV, principalmente por ataques cerebrovasculares e infarto agudo del miocardio [2]. A pesar de ser una prioridad a nivel nacional, aún existe una elevada prevalencia

de los factores de riesgo cardiovasculares tales como la hipertensión arterial, obesidad, diabetes, sedentarismo y tabaquismo [1]. Se estima que más de la mitad de la población chilena se encuentra en situación de riesgo de padecer alguna ECV, ya que un 89% es sedentaria; un 64,5% tiene sobrepeso u obesidad; un 49,6% de los chilenos son fumadores y un 38,5% tiene el colesterol total elevado [3]. Sin embargo, la mayoría de estos factores de riesgo son modificables a través de un cambio en el estilo de vida. Ejemplos claros en el cambio de estilo de vida son: aumentar la realización de actividad física y mejorar los hábitos alimenticios, los que en conjunto pueden reducir la probabilidad de desarrollar estas patologías [4].

Dentro de las ECV están las cardiopatías coronarias y congénitas, enfermedades vasculares, enfermedades cerebrovasculares, trombosis venosas y embolias pulmonares [2, 5]. La cardiopatía coronaria y el ataque cerebrovascular causaron un 42,5% y 28,8% de las muertes por ECV en el 2012, respectivamente [5]. A su vez, tanto el accidente cerebro vascular como la cardiopatía coronaria pueden ser manifestaciones clínicas de la enfermedad vascular. Dentro de las enfermedades vasculares se encuentran la hipertensión arterial, aterosclerosis y estenosis, entre otras [5]. Una de las más importantes es la aterosclerosis.

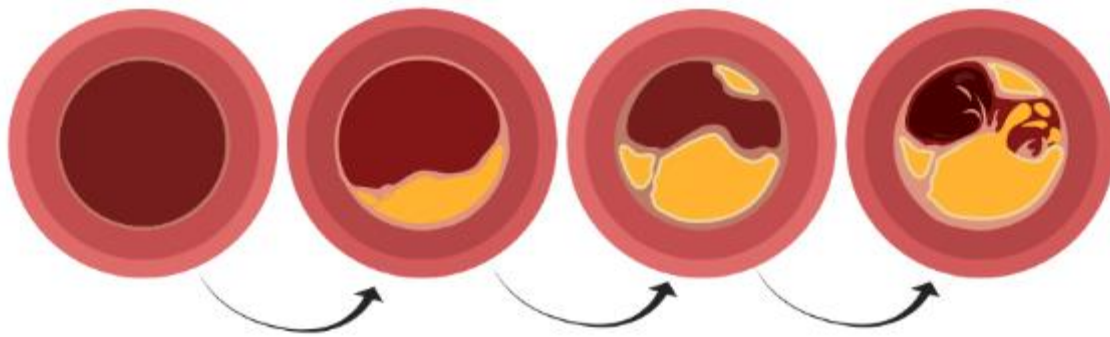
Aunque la aterosclerosis ha sido bastante estudiada, aún no hay un tratamiento efectivo, de manera que el entendimiento de sus bases moleculares puede evidenciar nuevas estrategias terapéuticas para combatir esta patología.

## **Fisiopatología arterial**

Actualmente, la pared vascular es considerada como un órgano activo y dinámico. Está constituida por células endoteliales, musculares lisas y fibroblastos que interactúan con la matriz extracelular (MEC), y se modifican bajo estímulos tanto fisiológicos como patológicos [4]. La pared vascular consta de tres capas: la túnica intima, formada por una monocapa de células endoteliales en contacto directo con el flujo sanguíneo; la túnica media, compuesta por células musculares lisas vasculares (CMLV) encargadas de la contracción y regulación del diámetro del vaso; y por último la túnica adventicia, que es una cubierta externa de tejido conectivo y fibras nerviosas, que otorga soporte estructural y es separada de la túnica media por elementos de la MEC, principalmente colágeno, elastina y proteoglicanos [6, 7]. La integridad de todos estos componentes permite el correcto funcionamiento del sistema vascular. Por el contrario, cuando se producen alteraciones en su estructura y función aparecen patologías asociadas como la hipertensión y/o aterosclerosis.

La aterosclerosis se define como patología arterial inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación de lípidos en las paredes de las arterias y por un cambio fenotípico de las células constituyentes de las arterias. Estos depósitos de lípidos son denominados placas de ateroma que se forman en la túnica intima de la arteria, los que con el tiempo pueden estrechar u obstruir el flujo sanguíneo de las arterias y causar variados problemas en diferentes órganos [8] (Figura 2). La acumulación de lípidos genera un ambiente inflamatorio que contribuye a la disfunción endotelial, el remodelado de la MEC y proliferación y migración de las

CMLV [9]. A pesar de que se pensaba que la contribución a la patología era determinada principalmente por una disfunción endotelial, recientemente se ha demostrado que las CMLV tienen un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, por lo que conocer su regulación y los mecanismos fisiopatológicos involucrados podría otorgar nuevos enfoques en el tratamiento contra esta enfermedad [10].



**Figura 2. Progreso de obstrucción de una arteria por aterosclerosis.** Los infartos ocurren por una obstrucción del flujo sanguíneo. Esta obstrucción es provocada por la formación progresiva de una placa de ateroma acompañada de un remodelado patológico del tejido vascular [8].

### **Células musculares lisas vasculares**

Como se mencionó anteriormente, las CMLV son el principal componente de la túnica media de las arterias, encargadas de regular el tono vascular, el flujo y por ende la presión sanguínea. En condiciones normales, las CMLV se encuentran diferenciadas y en estado quiescente. Proliferan a una velocidad muy baja, y expresan un repertorio único de proteínas contráctiles tales como:  $\alpha$ -actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA), la cadena pesada de  $\beta$ -miosina ( $\beta$ -MHC), h-caldesmona, calponina, SM22, entre otras. La expresión de estas proteínas

otorga la función contráctil de estas células y junto con su baja tasa proliferativa, baja migración y secreción de MEC, determinan lo que se conoce como fenotipo contráctil o diferenciado [11].

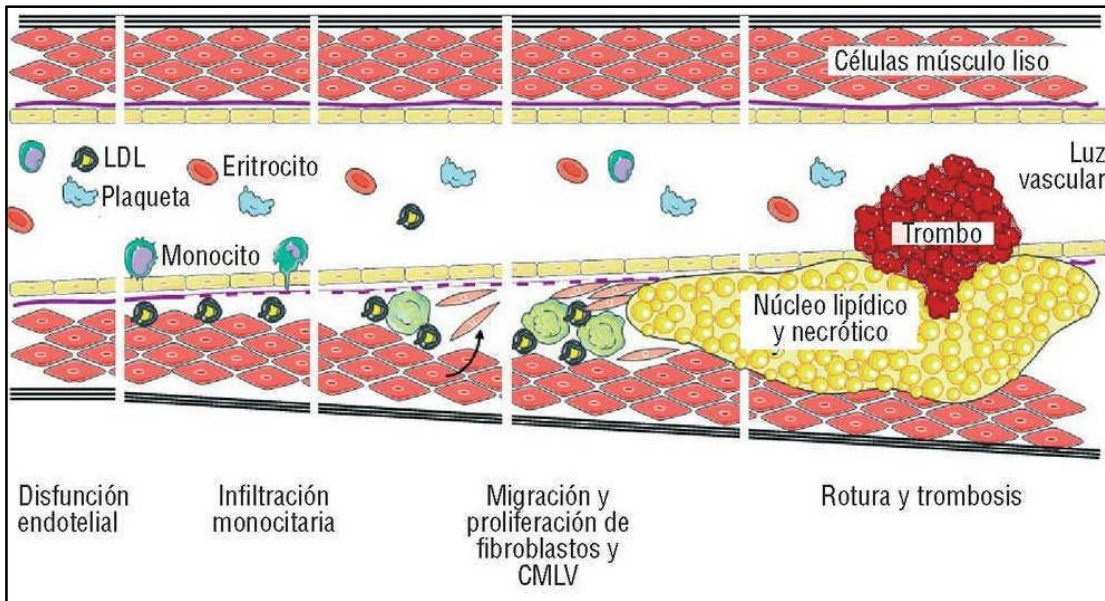
Por otra parte, las CMLV tienen una gran plasticidad y también pueden encontrarse en un estado que no es totalmente diferenciado. Bajo ciertas condiciones o estímulos las CMLV pueden pasar a un estado desdiferenciado, donde aumenta su proliferación y migración, capacidad de síntesis de componentes de la MEC y proteasas (Figura 3) [12]. Generalmente estos cambios son fisiológicos y pueden ocurrir durante la angiogénesis embrionaria, neovascularización y reparación frente a una lesión vascular, denominándose remodelado vascular fisiológico [12, 13]. Otro cambio experimentado por las células es la disminución de los marcadores específicos de músculo liso ( $\alpha$ -SMA;  $\beta$ -MHC; calponina) y aumento en la producción de mediadores inflamatorios, pasando de un fenotipo contráctil a uno proinflamatorio [11, 14]. De esta manera, las CMLV presentan varios tipos de fenotipos, los que pueden cambiar de forma reversible en nuestro organismo. Sin embargo, esta alta plasticidad también puede ser perjudicial ya que puede conducir al desarrollo de enfermedades vasculares, o también llamado remodelado vascular patológico [15]. Este remodelado patológico, se caracteriza por la movilización de las CMLV a la túnica íntima de la arteria, por la producción exacerbada de MEC generando fibrosis e infiltración de células inmunes (fenotipo migratorio-proliferativo), que conlleva la formación de la neointima y al estrechamiento del lumen del vaso sanguíneo (Figura 4) [11, 13, 16].



**Figura 3. Fenotipos de células de musculo liso vascular.**

Las células de musculo liso vascular pueden presentar distintos fenotipos. Cada fenotipo tiene respectivas características celulares que lo caracterizan, de aquí surgen los marcadores fenotípicos de diferenciación. Gracias a estos marcadores es posible caracterizar el estado de diferenciación en el cual se pueden encontrar las CMLV [11].

Actualmente, se han descrito algunos agentes que promueven el cambio fenotípico de las CMLV como fuerzas mecánicas, agonistas contráctiles como angiotensina II, componentes de la MEC, especies reactivas de oxígeno (ROS) y factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante (TGF-1β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), entre otros [17, 18]. De esta manera, las CMLV son importantes en la regulación de la homeostasis de la pared arterial, controlan la estructura y funcionalidad de los vasos sanguíneos a través de su gran plasticidad fenotípica. Entender qué factores y mecanismos influyen en la transición de estado en las CMLV es fundamental para la prevención y tratamiento del remodelado vascular patológico y sus enfermedades asociadas.



**Figura 4. Fisiopatología de la aterosclerosis.**

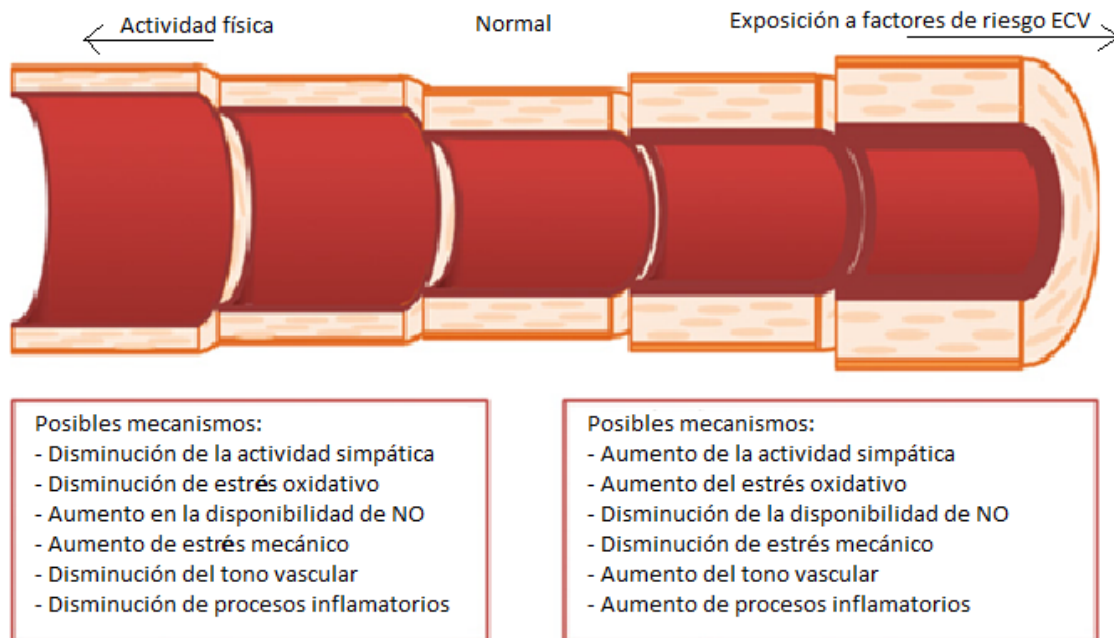
En el desarrollo de la aterosclerosis ocurre un cambio fenotípico de las CMLV de un fenotipo diferenciado a uno desdiferenciado. Estas células aumentan su tasa proliferativa además de migrar de la túnica media a la túnica íntima. De esta forma y sumado a la formación de la placa de ateroma se desarrolla la aterosclerosis [19].

### **Remodelado vascular y deporte**

El ejercicio moderado se considera un elemento esencial para mantener la salud cardiovascular. Los efectos beneficiosos del ejercicio moderado sobre los factores de riesgo tradicionales (obesidad, hipertensión, diabetes e hipercolesterolemia) pueden explicar aproximadamente la mitad de la reducción del riesgo cardiovascular [6]. Se ha propuesto que los efectos directos de éste en los vasos sanguíneos pueden explicar parte de la otra mitad restante. A la fecha, se conocen varios mediadores moleculares responsables del remodelado vascular inducido por el ejercicio, como por ejemplo el factor de crecimiento

endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina 1 y 2, factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y algunas mioquinas [14, 20].

Cabe destacar que el remodelado vascular inducido por el ejercicio es considerado fisiológico y, por el contrario, la existencia de remodelado vascular patológico es la causa subyacente a patologías como hipertensión y aterosclerosis. Se ha demostrado previamente que factores proinflamatorios, estrés oxidativo, aumento de la actividad simpática y en general todos los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, tienen un gran impacto en la fisiología arterial promoviendo este remodelado patológico (Figura 5) [9].



**Figura 5. Remodelado vascular y sus principales factores.**

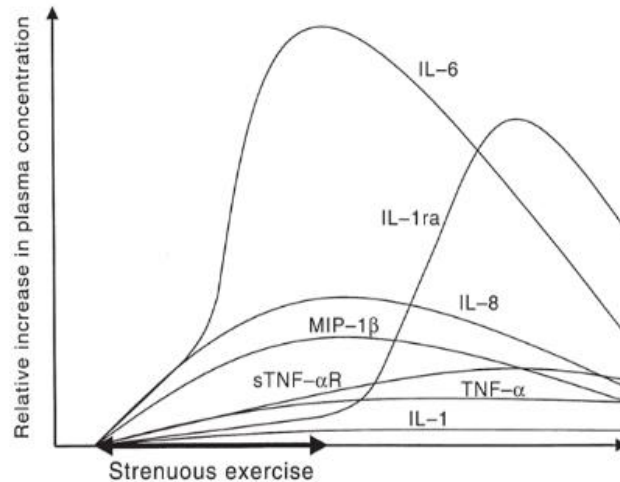
De acuerdo a la exposición de distintos factores el remodelado del tejido vascular puede ser fisiológico o patológico. Este remodelado se caracteriza por un cambio en el grosor de la túnica media, el cual da cuenta de la funcionalidad del vaso sanguíneo durante la contracción [9].



## **Mioquinas y CMLV**

Las mioquinas son citoquinas y proteínas que se sintetizan y liberan al contraer células del músculo esquelético. Las mioquinas tienen efectos autocrinos, paracrinos y endocrinos en órganos como el tejido adiposo, hígado y hueso [20]. Las mioquinas son en parte responsables y la explicación de los efectos beneficiosos de la actividad física. Entre las mioquinas más conocidas está interleuquina 6 (IL-6), IL-7, IL-8, IL-15, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21), factor inhibidor de la leucemia (LIF), irisina, miostatina, folistatina, decorina [20-23].

A pesar de la creencia de que las mioquinas solo se secretaban en el músculo esquelético, hoy en día es conocido que también pueden ser secretadas por el tejido adiposo (adipoquinas), hígado (hepatoquinas) y corazón (cardioquinas). Sin embargo, se ha descrito que las CMLV son capaces de sintetizar y secretar IL-6 cuando son tratadas con estímulos proinflamatorios como IL-1 $\beta$  y la proteína-1 quimioattractante de monocitos (MCP-1), y con estímulos no inflamatorios como PDGF. Aún se desconoce el rol que tendría IL-6 al ser liberada por las CMLV, ya que podría comportarse como citoquina y/o mioquina dependiendo del contexto celular [24].



**Figura 6. Liberación de IL-6 por el musculo esquelético.**

Durante la realización de actividad física se liberan distintas mioquinas, entre ellas IL-6; IL-1ra e IL-8. Sin embargo, IL-6 es la que presenta un aumento significativo durante el ejercicio [22].

### Interleuquina-6

IL-6 es una glicoproteína de 21-26 kDa formada por 212 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de citoquina de IL-6 o también llamada familia de gp130, por lo que presenta homología con varias citoquinas como IL-27, IL-11, IL-31, entre otras. Interleuquina-6 es secretada por diferentes tipos celulares como macrófagos, linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales, músculo esquelético y tejido adiposo. Al comportarse como citoquina y mioquina, parece tener funciones ubicuas en varios procesos fisiológicos y patológicos en nuestro organismo [24-26]. Como citoquina su función es mediar respuestas inmunes innatas y adaptativas. Está involucrada en el desarrollo, crecimiento y activación de células del sistema inmune y en la ejecución de la respuesta inflamatoria. En estados iniciales de inflamación IL-6 participa en la respuesta de fase aguda, estimula la síntesis de proteína C reactiva (PCR), algunas proteínas del sistema

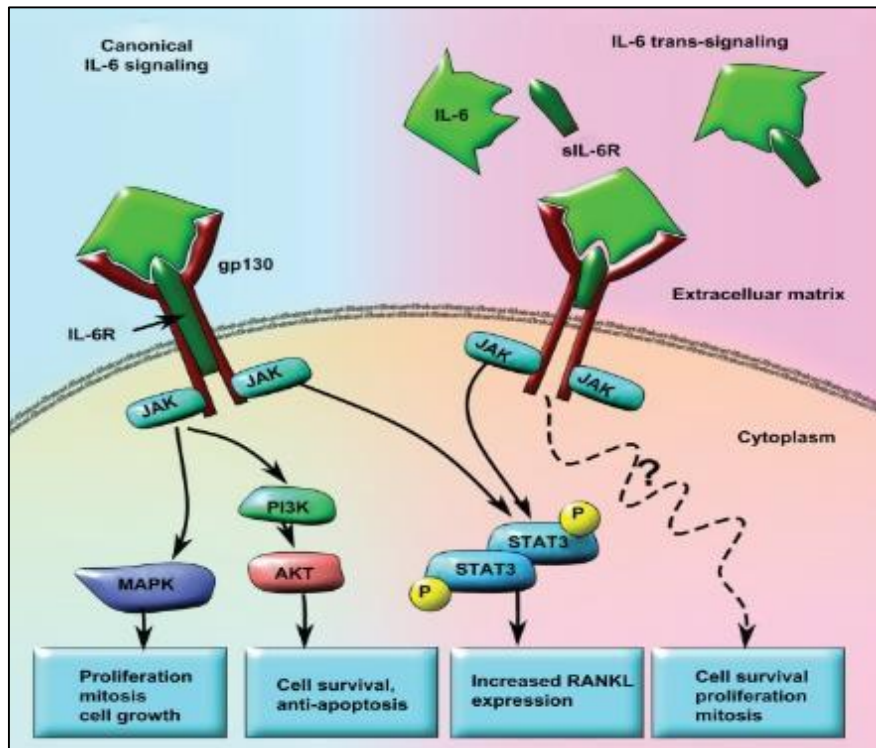
del complemento y de la cascada de coagulación. Regula la termogénesis corporal ya que actúa como pirógeno endógeno, y estimula el crecimiento de precursores hematopoyéticos [25]. Del mismo modo, promueve la diferenciación y maduración de linfocitos T y B, permite el desarrollo de linfocitos T ayudadores 17 (Th-17) y como consecuencia, aumenta la producción de la citoquina proinflamatoria IL-17, encargada de reclutar células del sistema inmune en los tejidos periféricos.

Por otra parte, IL-6 también tiene efectos antiinflamatorios, ya que al comportarse como mioquina y ser liberada durante el ejercicio, induce la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y IL-1ra (agonista del receptor de IL-1) y disminuye la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Del mismo modo, IL-6 puede mejorar el metabolismo de la glucosa, ya que puede aumentar la producción de glucosa hepática durante el ejercicio, actuar como un potente activador de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el músculo esquelético, y aumentar el ingreso de glucosa y la sensibilidad a la insulina. Además, puede inducir lipólisis y oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético [27, 28]. Este comportamiento dual de IL-6 puede ser explicado por su compleja señalización, que involucra dos vías de transducción conocidas como señalización clásica y trans-señalización [26, 29].

La señalización clásica de IL-6 se desencadena por la unión de IL-6 a su receptor (IL-6R) y luego con su correceptor gp130. La señalización alternativa (trans) implica la unión de IL-6 a un IL-6R soluble (sIL 6R) y el complejo sIL-6R/IL-6 se uniría a gp130 unida a membrana, activándolo. También existe en

una forma soluble de gp130 (sgp130) cuya función es inhibir la señalización trans de IL 6, sin interferir con la señalización clásica de IL-6 (Figura 7) [26, 29, 30].

La migración y la proliferación de CMLV son considerados eventos claves en la fisiopatología de la arterosclerosis. Ante una lesión vascular las CMLV migran a la capa íntima de la arteria y se someten a un cambio fenotípico proliferativo y sintético donde disminuyen la cantidad de proteínas contractiles, además de liberar citoquinas proinflamatorias y producir inflamación vascular [15, 31].



**Figura 7. Vías de señalización activadas por IL-6.**

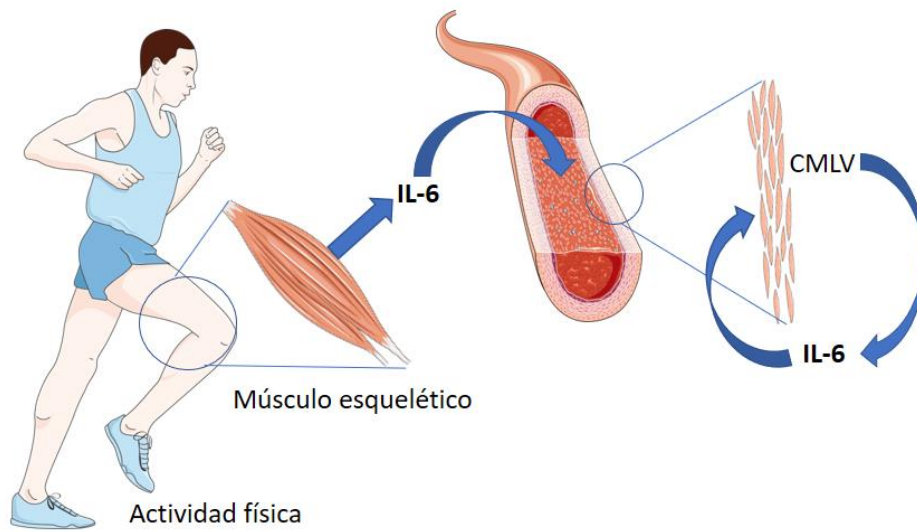
La señalización clásica de IL-6 ocurre con unión de IL-6 a su receptor (IL-6R) y luego con su correceptor gp130. La señalización alternativa (trans) implica la unión de IL-6 a un IL-6R soluble (sIL 6R) y el complejo sIL-6R/IL-6 se une a gp130 [29, 30].

Además, las CMLV son capaces de secretar IL-6 bajo diferentes condiciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias [32, 33]. Frente a un estímulo inflamatorio, IL-6 induce la proliferación y migración de las CMLV, también puede reducir su contractilidad y aumentar la producción de metaloproteinasas de matriz como MMP-1 y MMP-9 [3, 34, 35].

Sin embargo, los niveles de IL-6 también pueden aumentar bajo estímulos no inflamatorios como PDGF y el ejercicio. Se ha demostrado que la actividad física tiene muchos beneficios frente a ECV, y que durante el ejercicio los niveles de IL-6 aumentan en el plasma de manera exponencial registrándose concentraciones cercanas a 300 ng/MI (Figura 8) [36], sin embargo, el efecto de IL-6 como mioquina sobre algunos parámetros fenotípicos de las CMLV no está descrito.

De esta manera surgen las preguntas: ¿Por qué el ejercicio aumenta los niveles de IL-6? ¿Cuáles son las vías relacionadas y cuál es la respuesta fisiológica o patológica asociada? ¿Qué efecto tiene la liberación de IL-6 por CMLV bajo condiciones no inflamatorias? ¿Cuál será el efecto de IL-6 sobre las CMLV y el remodelado vascular?

Así, en este trabajo se determinará el rol de IL-6 en el fenotipo y función de las CMLV *in vitro*. Los resultados obtenidos permitirán contribuir a la comprensión del proceso de diferenciación/desdiferenciación de las CMLV.



**Figura 8. Resumen de antecedentes.**

Durante la actividad física el músculo esquelético libera IL-6. Esta mioquina aumenta hasta 300 veces en el plasma sanguíneo. De forma paralela las células de musculo liso vascular liberan IL-6, la cual actuaría localmente de forma autocrina y paracrina [32, 33, 36].

## **HIPÓTESIS**

“Las mioquina interleuquina-6 induce desdiferenciación de línea celular de músculo liso vascular A7r5”.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar si la interleuquina-6 induce desdiferenciación de la línea celular de músculo liso vascular A7r5.

### **Objetivos específicos**

Para cumplir con el objetivo general, se plantearon 3 objetivos específicos de acuerdo con los parámetros fenotípicos a evaluar: migración celular; cantidad de proteínas contráctiles y proliferación celular. Cada uno de los objetivos fue estudiado en la línea celular A7r5.

1. Evaluar el efecto de IL-6 sobre la migración celular.
2. Registrar si IL-6 tiene efecto sobre la tasa de proliferación celular.
3. Determinar si IL-6 produce cambios en la cantidad de proteínas contráctiles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de músculo liso vascular A7r5, que es una línea comercial de CMLV obtenida de aorta de embriones de rata (*Rattus norvegicus*, CRL-144, ATCC, USA). Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM rico en glucosa suplementado (Sigma-Aldrich, D1152) con  $\text{NaHCO}_3$  (1,2  $\mu\text{g/L}$ , Amresco, 0865), suero fetal bovino inactivado por calor (10% Biological Industries, 04-121-1A) y piruvato (110 g/mL), a 37°C en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% aire (Incubador Nuaire NU4750E). Al alcanzar un 80% de confluencia, las células se soltaron con una solución de tripsina (0,3%; Biological Industries, 03-051-5B) en una solución amortiguador fosfato con EDTA 0,025% libre de  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  y se depositaron en placas nuevas de 100 y/o 60 mm con medio de cultivo fresco.

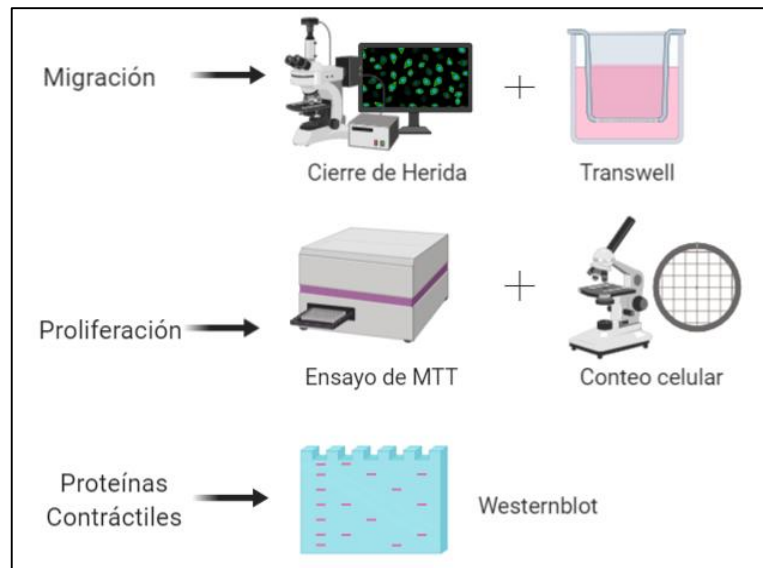
### Protocolo de estimulación con IL-6

A los cultivos celulares se les cambió el medio DMEM al 10% FBS por un medio DMEM fresco al 0% FBS durante 24 h. Pasadas las 24 h con medio al 0%FBS, las células se estimularon con IL-6 (cat #ab218726, Abcam).

Los cultivos celulares se estimularon con PDGF-BB (20 ng/mL; Merck, 521225-10UG) como control positivo y con IL-6 como grupo experimental a evaluar. Ambos estímulos duraron 24 y 48 h, según sea el caso. El control negativo consistió en células cultivadas con vehículo (DMEM al 0% FBS). A diferentes tiempos se



determinaron los niveles de proteínas contráctiles, migración y proliferación celular (Figura 9).



**Figura 9. Estrategia experimental según parámetro fenotípico a evaluar.**

La dediferenciación de las CMLV es un proceso complejo que altera distintos parámetros fenotípicos de las células. Entre los parámetros estudiados se encuentran: migración y proliferación celular y la cantidad de proteínas contráctiles. La migración celular se estudió mediante ensayo de cierre de herida y migración en Transwell. La proliferación celular se estudió a través del ensayo MTT y conteo celular. Finalmente, la cantidad de proteínas contráctiles se determinaron mediante Western blot.

### Lisis celular

Una vez terminada la estimulación del cultivo celular, éste se retiró del incubador y las placas se enfriaron rápidamente en hielo. Se descartó el medio y se lavó con amortiguador fosfato salino (PBS). Posterior al lavado se añadió 70  $\mu$ L de amortiguador RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa a cada placa y se procedió a raspar la placa con un *cell scraper*. El lisado celular se recolectó en un tubo Eppendorf de 1,6 mL.

### **Cuantificación de las proteínas**

El lisado celular se sonicó durante 5 min en agua fría (Sonicador Elma Transsonic 310). Posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm por 12 min a 4°C (Microcentrífuga Hettich Mikro 22R) y el sobrenadante se guardó en otro tubo Eppendorf de 1,6 mL. Se realizó un ensayo de Bradford para cuantificar la cantidad de proteínas. Para ello, en placas de 96 pocillos se agregó a cada pocillo 159 µL de agua ultra pura, 1 µL de muestra y 40 µL de reactivo de Bradford (BioRad, 500-0006). Se utilizó como blanco amortiguador RIPA. Finalmente, se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de placa (Glomax Multi Detection System, Promega) y los resultados se interpolaron en una curva de calibración realizada previamente.

### **Preparación de las muestras**

Las muestras se prepararon a partir del lisado celular. Una vez cuantificadas las proteínas, se procedió a calcular cuánto agregar de muestra, de amortiguador de carga y agua. Este cálculo fue necesario para cargar la misma cantidad de proteína en cada pocillo del gel de acrilamida. En otro Eppendorf se agregó la cantidad calculada de muestra, amortiguador de carga y agua y se calentó a 95°C por 10 min (Thermoblock Heater 2052).

### **Evaluación de los niveles de proteínas contráctiles por Western blot**

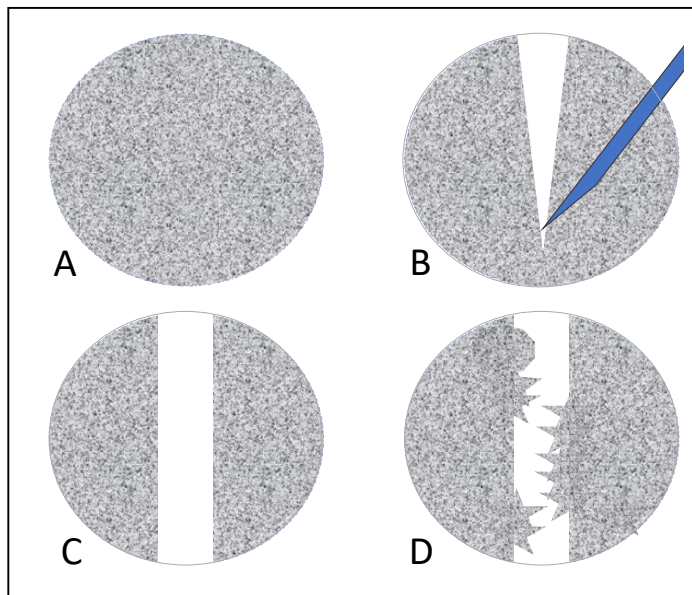
Se evaluaron  $\alpha$ -actina de musculo liso ( $\alpha$ -SMA), calponina y SM22 mediante Western blot. Se utilizó  $\beta$ -tubulina como control de carga [30]. Se cargaron aproximadamente 25 ng de proteína por pocillo en geles de SDS-poliacrilamida. La corrida electroforética se realizó a 80 V por aproximadamente 2 h. Luego, la electrotransferencia se realizó sobre una membrana de PVDF a 400 A constante durante 90 min. La membrana se bloqueó con leche Svelty al 5% en TBS-T durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS-T.

La incubación con anticuerpo primario se efectuó durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos usados fueron: anti-calponina (cat #ab46794, Abcam; conejo, 1:5000); anti  $\alpha$ -SMA (cat #ab7817 Abcam; ratón, 1:5000); anti- $\beta$ -tubulina (ratón, 1:5000); anti-SM22 (cat #ab14106 Abcam; conejo, 1:5000). Luego se repitieron los 3 lavados de 5 min con TBS-T. La incubación con anticuerpo secundario se realizó a temperatura ambiente durante 90 min. Los anticuerpos secundarios usados fueron: anti-conejo (Calbiochem, 401315; 1:5000) y anti-ratón (Calbiochem, 402335; 1:5000). Antes de la detección se repitieron los 3 lavados de 5 min con TBS-T. Para la detección, las membranas se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL.

Finalmente, para revelar y digitalizar las imágenes se usó el equipo revelador Syngene (G-Box Syngene). El análisis densitométrico se realizó mediante el programa UN-SCAN-IT gel.

## Evaluación de la migración por cierre de herida

A una placa de 60 mm en confluencia máxima se le cambió el medio DMEM al 10% FBS por un medio DMEM fresco al 0% FBS durante 24 h. Luego de las 24 h se realizó una “herida” creando un área libre de células en la monocapa del cultivo celular. Esto se efectuó con la ayuda de una punta de micropipeta. Se procedió a cambiar el medio al 0% FBS por uno fresco, y junto a la estimulación con IL-6 y PDGF-BB se agregó 10  $\mu$ L de bromodeoxiuridina (BrdU, 10 mM; Sigma-Aldrich, B5002) por mL de medio, para inhibir la proliferación celular. Luego, se realizó la captura de imágenes de manera periódica durante 24 y 48 h, para finalmente comparar las imágenes y determinar la velocidad de migración de las células y el porcentaje de cierre de herida (Figura 10).



**Figura 10. Ensayo de cierre de herida.**

(A) Cultivo celular con confluencia al 100%. (B) Realización de herida con punta de pipeta P200. (C) Registro fotográfico de herida a tiempo 0 h. (D) Registro fotográfico de herida a 24 y 48 horas.

### **Evaluación de la migración por ensayo transwell**

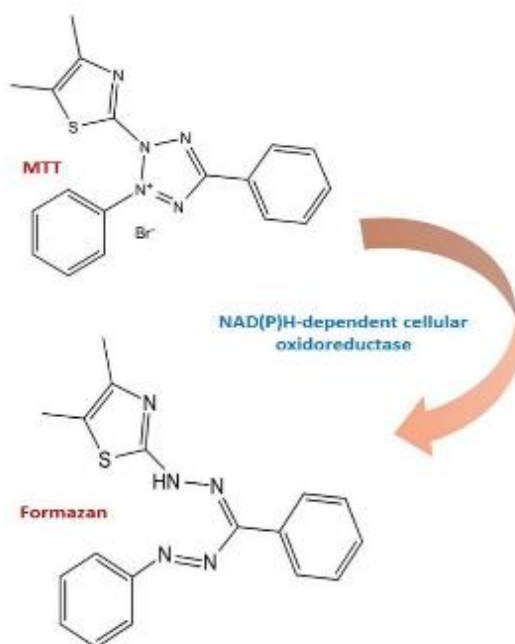
Para realizar este ensayo se utilizaron cámaras de Boyden de 8  $\mu\text{m}$  de poro en placas de 24 pocillos (BD Biosciences, costar). Luego de la estimulación con IL-6 y PDGF-BB, se cultivaron 20.000 células en 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM al 0% FBS en la cámara superior y se colocó 550  $\mu\text{L}$  de medio al 10% FBS en la cámara inferior. Luego de 4 h de migración se removieron las células de la parte superior con un hisopo de algodón. Las células que migraron hacia la cámara inferior se fijaron durante 2 h con cristal de violeta y se lavaron con agua. Posteriormente, se fotografió y cuantificó el número de células migradas mediante observación en el microscopio. Los resultados se expresaron como el número de células que migraron por campo fotografiado.

### **Ensayo de proliferación celular por MTT**

El ensayo colorimétrico MTT se basa en la reducción de la sal de MTT de color amarillo a un producto soluble de color azul llamado formazán (Figura 11). Esta reducción ocurre por acción de enzimas mitocondriales y la cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células vivas presentes durante la incubación con MTT [37].

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Luego del tratamiento farmacológico las células se incubaron con una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma-Aldrich, M5655) a una concentración de 1 mg/mL, preparada en medio DMEM fresco al 0% FBS previamente calentado a 37°C.

Posteriormente, las células se mantuvieron en el incubador a 37°C por 4 h, permitiendo la formación de cristales de formazán. Luego, se retiró el medio de cultivo con MTT y se agregó 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck Millipore, 102931) para lisar las células y solubilizar los cristales de formazán. Después de homogenizar por agitación, los sobrenadantes se añadieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro de placa a 560 nm (Promega, Glomax-multidetecion system).



### Figura 11. Reducción de MTT a formazán.

MTT es una sal de color amarillo que ante la actividad de enzimas oxidoreductasas celulares se reduce a formazan, formando un compuesto soluble de color azul. En un ensayo de MTT, la cantidad de formazan formado da cuenta de la cantidad de células viables.

### Conteo celular

Posterior a la estimulación con IL-6, se lavó el medio con PBS 1X. Posteriormente se añadió 300 µL de Tripsina 1X para solubilizar las células. Se

agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular a un microtubo y 10  $\mu\text{L}$  de solución de Azul de Tripán 0,4%) y se mezclaron. Se tomó 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se dejó en una cámara de Neubauer y se procedió a contar las células vivas en cada cuadrante. Finalmente, la cantidad de células fue calculada siguiendo las siguientes ecuaciones:

$$C_{\text{CÉLULAS}} \left[ \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right] = N_{\text{CUADRANTE}} \cdot F_{\text{DILUCIÓN}} \cdot 10.000.$$

$$N_{\text{CÉLULAS TOTAL}} = C_{\text{CÉLULAS}} \left[ \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right] \cdot V_{\text{SUSPENSIÓN}} [\text{mL}]$$

$C_{\text{células}}$  = Concentración de células

$N_{\text{cuadrante}}$  = promedio de células de los 4 cuadrantes de la cámara de Neubauer.

$F_{\text{dilución}}$  = 20 (primera dilución 1:10 y segunda dilución 1:2 con Azul de tripán).

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

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  EEM de 5 experimentos independientes o se muestran como experimentos representativos ( $n = 5$ ). La comparación entre valores medios se realizó por análisis de varianza (ANOVA) utilizando Holm-Sidak como prueba post-test. Los valores con  $p < 0,05$  se consideraron como diferencias estadísticamente significativas.

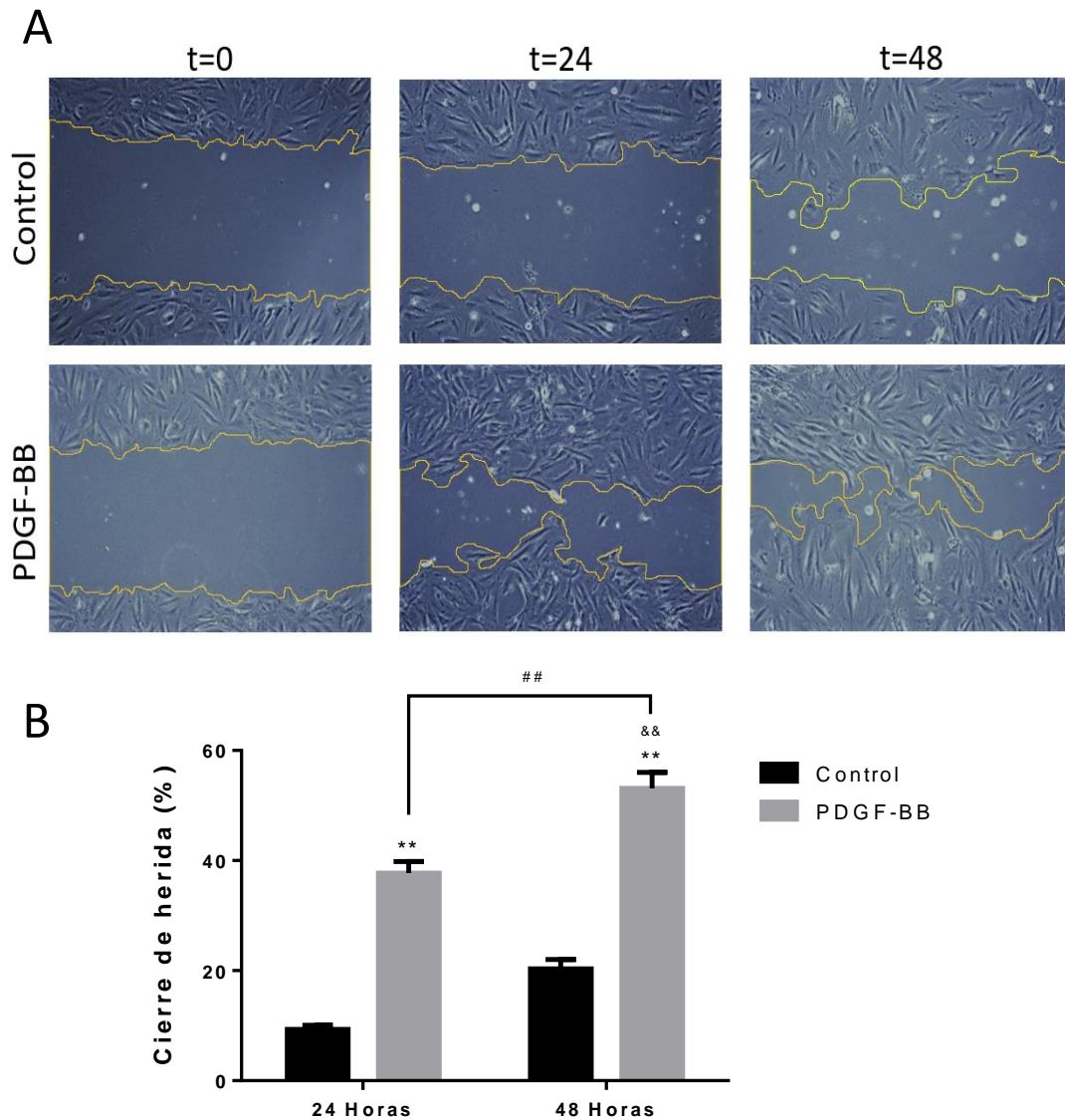
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Efecto de IL-6 sobre la migración celular en CMLV**

Dentro de los parámetros fenotípicos clásicos que caracterizan a las CMLV se encuentra la migración celular [11, 13]. Para evaluar la migración celular se utilizaron 2 técnicas: Ensayo de cierre de herida y migración en transwell. En primera instancia se analizó la migración inducida por PDGF-BB, para corroborar su uso como control positivo de la desdiferenciación de las CMLV, confirmando lo observado por Torres *et al* [18, 38]. En la figura 12 se observa que el control negativo (sin estimulación) migró en menor cantidad que el control positivo, de esta forma PDGF-BB es validado como control positivo de migración para la línea celular A7r5.

Por otra parte, para saber a qué tiempo medir la migración celular, el ensayo de cierre de herida se registró a las 24 y 48 h, con estos tiempos nos aseguramos de que PDGF-BB produciría un cambio fenotípico en las CMLV. Efectivamente según lo observado en la figura 12, PDGF-BB a ambos tiempos produjo un aumento significativo de la migración celular.





**Figura 12. Validación de PDGF-BB como control positivo.**

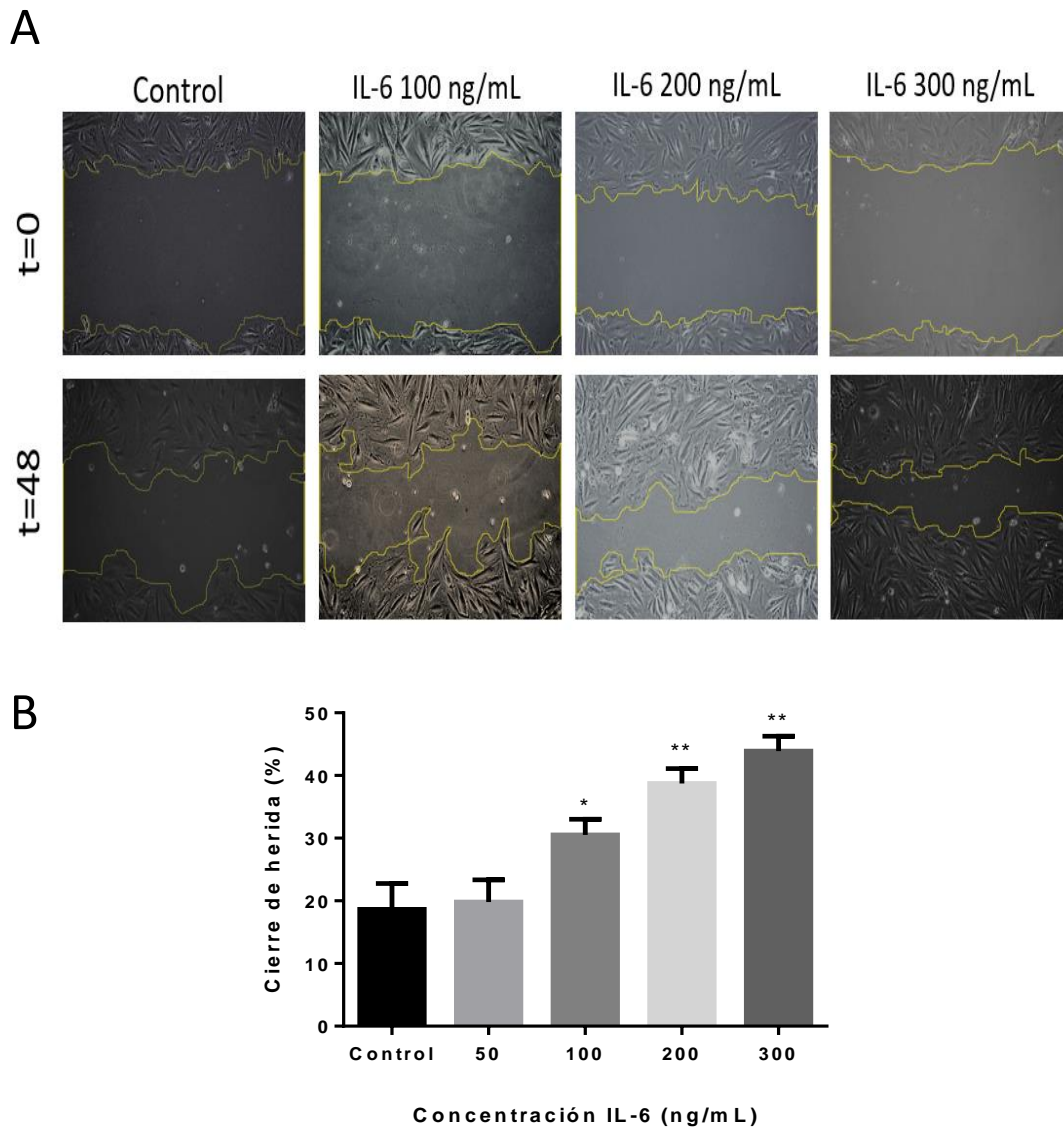
Células A7r5 se cultivaron hasta confluencia máxima. Se realizó ensayo de cierre de herida y se incubaron en ausencia (control) o presencia de PDGF-BB (20 ng/mL) en DMEM (0% FBS) conteniendo BrdU por 24 y 48 h. (A) Fotografía representativa de un ensayo de cierre de herida. (B) Cuantificación del porcentaje de cierre de herida. ANOVA de dos vías, post-test Holm-Sidak. \*\* $p < 0,01$ ; vs control 24 h. && $p < 0,01$ ; vs control 48 h. ## $p < 0,01$ . N=5.

Previamente ya se ha descrito que IL-6 induce migración de CMLV, pero a una concentración de 10 ng/mL y 50 ng/mL [39, 40]. Sin embargo, la concentración

de IL-6 plasmática es  $< 5$  pg/mL y después de realizar actividad física esta concentración aumenta 100 veces aproximadamente y se ha descrito que puede alcanzar alrededor de los 300 ng/mL [24, 25]. Conociendo estos antecedentes es que se decidió realizar una curva dosis/respuesta para determinar que concentración de IL-6 usar. De esta forma es que se eligieron las concentraciones de 50; 100; 200 y 300 ng/mL. Para este ensayo de cierre de herida las células A7r5 se trataron con IL-6 a 50; 100; 200 y 300 ng/mL y PDGF-BB (20 ng/mL) durante 48 h.

En la figura 13 se observa que la migración celular inducida a las 48 h es dependiente de la dosis de IL-6 usada, demostrando que IL-6 induce un fenotipo migratorio de células A7r5. De esta forma se decide utilizar IL-6 a una concentración de 300 ng/mL.

Para describir el fenómeno completo es necesario comparar la migración celular con los respectivos controles, por lo que se estudió el efecto conjunto de IL-6 y PDGF-BB. La figura 14 muestra el ensayo de cierre de herida donde se evaluó la migración celular inducida por IL-6 en comparación con la migración inducida por PDGF-BB. Interleuquina 6 al igual que PDGF-BB indujo un fenotipo migratorio, pero con un efecto menos potente en comparación con el control y en ambos casos, tanto IL-6 y PDGF-BB, indujeron un fenotipo migratorio de CMLV a las 48 de estimulación. Por otra parte, en el grupo experimental donde las células A7r5 se estimularon simultáneamente con IL-6 y PDGF-BB, no se observó un efecto sinérgico de ambos estímulos. PDGF-BB no incrementa la migración celular inducida por IL-6 (Figura 14).



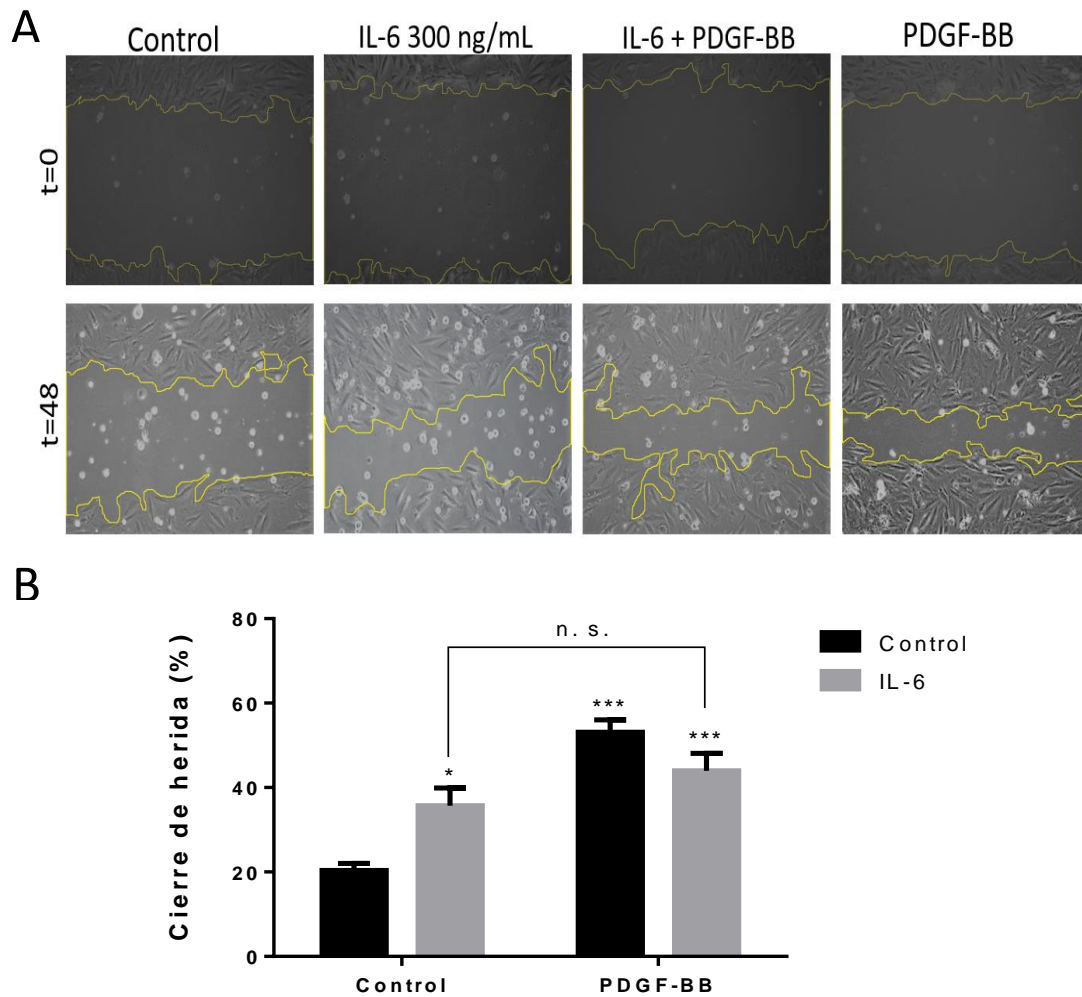
**Figura 13. Efecto dosis respuesta de IL-6 sobre la migración de células A7r5.** Células A7r5 se cultivaron hasta confluencia máxima. Se realizó ensayo de cierre de herida y se incubaron en ausencia (control) o presencia de IL-6 a 50, 100, 200 y 300 ng/mL en DMEM (0% FBS) conteniendo BrdU por 48 h. Se utilizó PDGF-BB (20 ng/mL) por 48 h como control positivo de migración. (A) Fotografía representativa de un ensayo de cierre de herida. (B) Cuantificación del porcentaje de cierre de herida. ANOVA de una vía, post-test Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  comparado con grupo control. N=5.

Otro método usado para evaluar migración celular fue el ensayo de Transwell. Este ensayo se usó para confirmar los datos obtenidos en los ensayos de cierre de herida. Para realizar un ensayo de migración en Transwell es necesario

usar una cámara de Boyden. En el compartimento superior se agregan las células que migraran hacia el compartimento inferior. Luego de 4 h de migración, se cuantifican las células que fueron capaces de migrar hacia la cámara inferior en comparación con las células que migraron en la condición control.

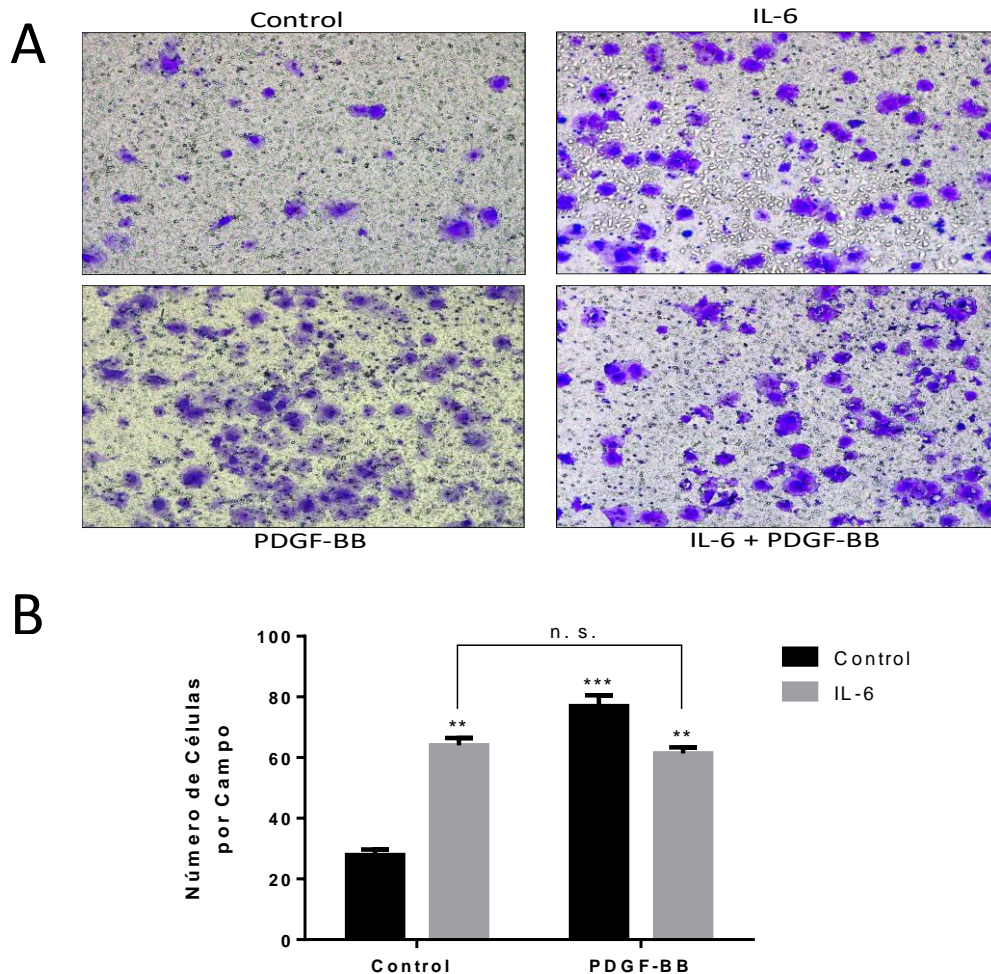
Esta migración es generalmente inducida por una sustancia quimioattractante que se agrega en el compartimento inferior [41]. Sin embargo, en este experimento lo que se hizo fue agregar medio de cultivo al 0% FBS en la cámara superior y medio al 10% FBS en la cámara. La razón de no usar IL-6 como quimioattractante es porque previamente se ha descrito su actividad quimioattractante [25] y porque este experimento no tiene como objetivo dilucidar si IL-6 atrae o no a las células, sino más bien pretende determinar si el fenotipo celular inducido por IL-6 es capaz de pasar a través los poros de la cámara de Boyden.

En la figura 15 se muestra que el control positivo (PDGF-BB) indujo mayor migración celular respecto al grupo control, pues se encontró una mayor cantidad de células en la cámara inferior. Por su parte, las células que se trataron con IL-6 migraron, pero en menor cantidad que las tratadas con PDGF-BB. No obstante, la estimulación simultanea de PDGF-BB e IL-6 no indujo una mayor migración celular que la inducida por PDGF-BB, confirmando los resultados mostrados en la figura 14.



**Figura 14. Efecto comparativo de la migración de células A7r5 inducida por IL-6 y PDGF-BB.**

Células A7r5 se cultivaron hasta confluencia máxima. Se realizó ensayo de cierre de herida y se incubaron en ausencia (control) o presencia de IL-6 (300 ng/mL), PDGF-BB (20 ng/mL), IL-6 (300 ng/mL) + PDGF-BB (20 ng/mL) en DMEM (0%FBS) conteniendo BrdU por 48 h. (A) Fotografía representativa de un ensayo de cierre de herida. (B) Porcentaje de cierre de herida de los respectivos grupos experimentales. ANOVA de dos vías, post-test Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  comparado con control. N=5.



**Figura 15. Efecto de IL-6 sobre la migración de células A7r5 medida por Transwell.**

Se agregó 20.000 células A7r5 en el pocillo superior de la cámara Boyden previamente estimuladas en ausencia (control) o presencia de IL-6 (300 ng/mL), PDGF-BB (20 ng/mL), IL-6 + PDGF-BB. (A) Fotografía representativa de la migración celular a las 4 h. (B) Migración expresado como número de células por campo de los respectivos grupos experimentales. ANOVA de dos vías, post-test Holm-Sidak. \*\*\* $p < 0,001$  comparado con control. N=5.

Finalmente, se concluye que IL-6 a 300 ng/mL induce un fenotipo migratorio de la línea celular A7r5.

IL-6 ya ha sido descrita como una citoquina que induce migración celular en diversos tipos celulares [25], pero es primera vez que se describe su efecto migratorio a la concentración de 300 ng/mL y con un tiempo de estimulación de 2 días. No obstante, este trabajo sólo se enfoca en el efecto fenotípico y no molecular, por ejemplo, no se sabe mediante que vía de señalización está actuando IL-6 sobre estas células. Según lo reportado por Klouche *et al* [42], CMLV humanas expresan el receptor para IL-6, por lo que se podría deducir que IL-6 estaría actuando a través de la señalización canónica. Para poder dilucidar la vía mediante la cual IL-6 ejerce el cambio de fenotipo es necesaria una aproximación farmacológica donde se podrían utilizar fármacos inhibidores o anticuerpos contra el receptor de IL-6.

Por otra parte, los resultados mostrados en las figuras 14 y 15 nos permiten preguntar sobre las vías de señalización participantes. Para el caso de PDGF-BB, un estímulo no inflamatorio que actúa mediante la vía de las MAPK [43] e IL-6, una citoquina descrita ampliamente como pro-inflamatoria y en algunos casos antiinflamatoria actúa mediante la vía JAK/STAT [29, 30]. En el grupo estimulado simultáneamente con ambos compuestos no se observa una potenciación del efecto migratorio, por el contrario, se ve que existe una menor migración en comparación al control positivo PDGF-BB (Figuras 14-15). Esto se podría explicar porque las vías podrían estar interactuando de forma inhibitoria o abajo. Nuevamente la solución sería una estrategia experimental farmacológica, utilizando los respectivos inhibidores farmacológicos de cada vía.

¿Por qué IL-6 induce migración de estas células? Pregunta que subyace al rol biológico de IL-6 y a su respectivo aumento plasmático de 100 veces descrito en

deportistas. Se describe que las CMLV son capaces de migrar cuando existe una lesión vascular que debe ser reparada o cuando existe angiogénesis [12, 13]. Estos eventos se relacionan directamente con la realización de actividad física, en donde el músculo esquelético crece, aumentando su volumen y con ello la demanda de oxígeno y nutrientes. Esta podría ser la explicación por la cual aumenta IL-6 durante el ejercicio, para inducir migración de CMLV y participar en el proceso de angiogénesis para el creciente tejido muscular.

### **Efecto de IL-6 sobre la proliferación de las CMLV**

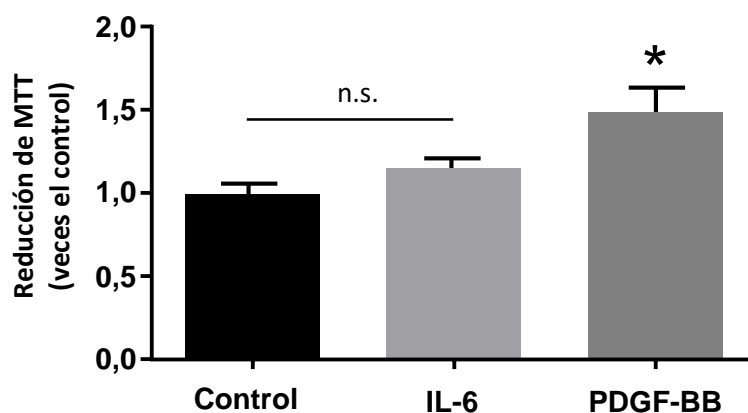
El segundo parámetro fenotípico clásico para evaluar es la proliferación celular. Las CMLV desdiferenciadas tienen una mayor tasa de proliferación que el fenotipo diferenciado [12]. Para evaluar este parámetro se utilizó ensayo de MTT y conteo celular.

Como se mencionó anteriormente el fenotipo desdiferenciado de las CMLV presenta una mayor tasa de proliferación celular que su contraparte diferenciada. La explicación de esta diferencia radica en que el fenotipo desdiferenciado es inducido cuando hay daño tisular y como respuesta a este daño las células deben proliferar para la reparación del tejido [12, 13].

En la figura 16 se muestran los resultados obtenidos con el ensayo MTT al estimular células A7r5 con IL-6. La proliferación celular (medida en actividad MTT) comparada con PDGF-BB (control positivo) muestra que IL-6 no induce actividad reductora sobre estas células.



No obstante, a pesar de no observar una diferencia significativa en la proliferación del grupo control y el grupo tratado con IL-6, el ensayo con MTT presenta algunos inconvenientes. Se han identificado diversos parámetros que pueden afectar el metabolismo celular y otros factores que podrían afectar específicamente la reducción del MTT.



**Figura 16. Efecto de IL-6 sobre la proliferación de células A7r5 determinada por MTT.**

Células A7r5 se trataron con IL-6 (300 ng/mL) durante 48 h. Se utilizó PDGF-BB (20 ng/mL) como control positivo. Posteriormente se incubaron con MTT y se evaluó la formación de formazán. Después de su disolución con DMSO, la cantidad de formazán se determinó por absorbancia a 560 nm. T-student. n.s., no significativo control vs IL-6; \* $p < 0,05$  control vs PDGF-BB. N=4.

Por ejemplo, podría ocurrir que el tratamiento con PDGF-BB o IL-6 altere la dinámica mitocondrial o algún parámetro redox de la célula, como la cantidad de NADH o NADPH disponible, entre otras cosas. Por otra parte, la técnica en si presenta sus desventajas a nivel celular, técnico y metodológico. Desde el punto de vista celular, además de las reacciones enzimáticas existen diferentes reacciones no enzimáticas donde participan moléculas reductoras (ácido ascórbico, glutatión o CoA) que pueden interactuar con MTT, formando formazán

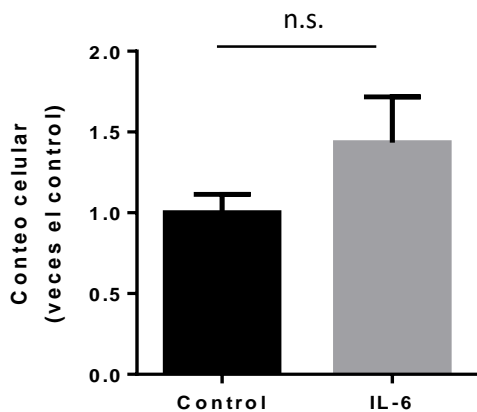
y como consecuencia producir una mayor absorbancia. A nivel técnico, la formación de cristales de formazán destruye la integridad de la célula, conduciendo a la muerte celular. La célula al morir detiene su metabolismo y por ende se interrumpe la reducción del MTT, alcanzado un punto final de reacción relativamente rápido [44-46].

A pesar de los inconvenientes presentados el ensayo MTT es rápido conveniente y económico a la hora de proliferación celular. Sin embargo, estos resultados deben ser confirmados y complementados con alguna otra técnica que evalúe proliferación celular, como por ejemplo incorporación de timidina tritiada, aumento del contenido de DNA por citometría de flujo con yoduro de propidio, entre otras.

Otro método para estudiar proliferación celular es el conteo celular. Técnica sencilla y económica lo que hace que sea ampliamente utilizada. En la figura 17 se muestra el conteo celular realizado posterior a las 48 horas de estimulación de células A7r5 con IL-6 a 300 ng/mL. Se observa que IL-6 no estimula la proliferación celular.

Al analizar las figuras 16 y 17 se ve una diferencia en los resultados obtenidos. Esto se podría explicar por diferencias en las técnicas utilizadas para estudiar proliferación celular. MTT por su parte, no mide proliferación celular directamente si no que mide actividad reductora, que directamente proporcional a la cantidad de células viables [37]. El conteo celular es un indicador directo de la cantidad de células en un determinado cultivo, por lo que se ignora la actividad reductora de las células. Es decir, que puede ocurrir que exista una misma

cantidad de células en 2 placas de cultivo, pero pueden tener actividades metabólicas diferentes y viceversa, observar una misma actividad reductora MTT y tener distinta cantidad de células. Con el conteo celular se concluye que IL-6 no induce migración celular de la línea A7r5 y además no altera la actividad reductora de estas células. No obstante, se podría aplicar otra metodología para el estudio de la proliferación celular de esta línea celular como citometría de flujo, western blot, incorporación de BrdU [47].



**Figura 17. Efecto de IL-6 sobre la proliferación de las células A7r5 determinada por conteo celular.**

Células A7r5 se trataron con IL-6 (300 ng/mL). Posteriormente se tripsinizaron, se tiñeron con azul de Tripán y se contaron usando una cámara de Neubauer. T-student control vs IL-6. n.s., no significativo. N=5.

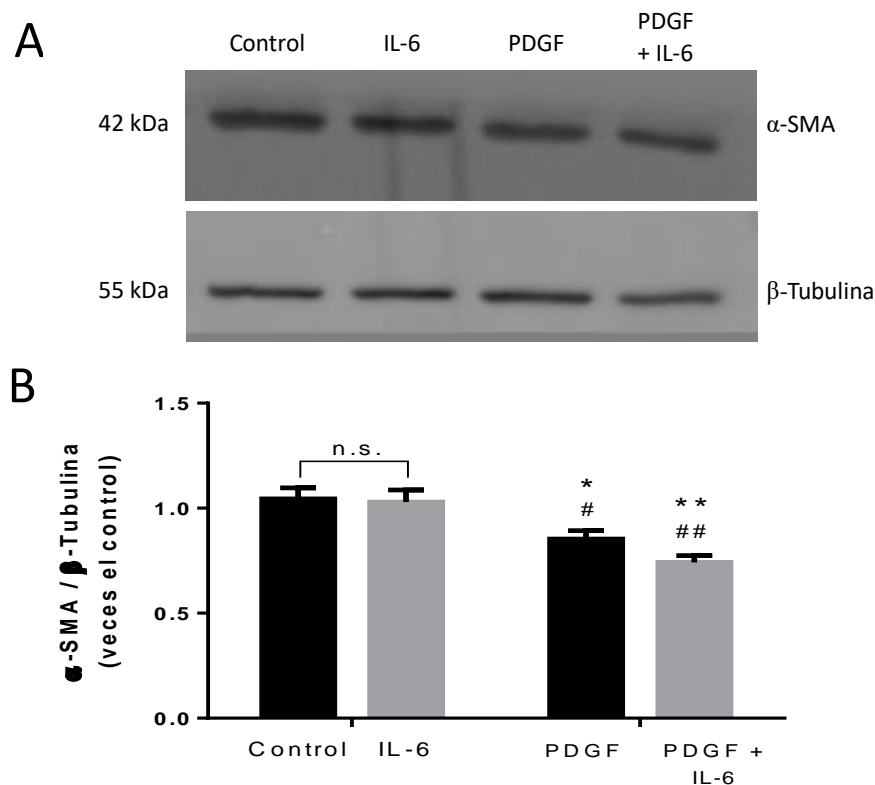
### **Efecto de IL-6 sobre los niveles de proteínas contráctiles en CMLV**

Finalmente, el tercer parámetro fenotípico clásico de diferenciación de CMLV es la cantidad de proteínas contráctiles presentes en estas células, las cuales dan cuenta de su función. Dentro de la variada familia de proteínas

contráctiles presentes en este tipo células están como, por ejemplo:  $\alpha$ -actina de musculo liso, cadena pesada de  $\beta$ -miosina ( $\beta$ -MHC), SM22, h-caldesmona y calponina. Sin embargo, 3 de ellas son las más utilizadas para representar la cantidad de proteínas contráctiles [11]. Estas proteínas son  $\alpha$ -SMA, calponina y SM22, cuya cantidad se evaluó a través de Western blot, como se observa en las figuras 18, 19 y 20, respectivamente.

Nuevamente se utilizó PDGF-BB como control positivo para evaluar el cambio en la cantidad de proteínas contráctiles [17, 18] y  $\beta$ -tubulina como control de carga del Western blot. En la figura 19 se muestran los niveles de  $\alpha$ -SMA al estimular las células A7r5 con IL-6, PDGF-BB y ambos durante 48 h. Se observó que el control positivo PDGF-BB funcionó ya que disminuyó los niveles de  $\alpha$ -SMA. Por su parte, IL-6 no produjo cambios en la cantidad de  $\alpha$ -SMA respecto al grupo control. Sin embargo, la estimulación simultánea de IL-6 con PDGF-BB se observó que IL-6 no previno la disminución inducida por PDGF-BB.

En las figuras 19 y 20 se muestran los Western blot de calponina y SM22, respectivamente. En ambos se observó que la estimulación con IL-6 a 300 ng/mL durante 48 h no indujo cambios significativos respecto al control negativo. Por su parte, la estimulación con PDGF-BB en ambos casos disminuyó los niveles de proteína contráctil. Sin embargo, la estimulación con IL-6 (300 ng/mL) y con PDGF-BB (20 ng/mL) se observó que IL-6 no previno la disminución de la cantidad de proteínas contráctiles  $\alpha$ -SMA y calponina inducida por PDGF-BB.



**Figura 18. Efecto de IL-6 sobre los niveles proteicos de α-SMA en células A7r5.**

Células A7r5 se incubaron en ausencia (vehículo) o presencia de IL-6 (300 ng/mL), PDGF-BB (20 ng/mL), IL-6 (300 ng/mL) + PDGF-BB (20 ng/mL) en DMEM (0% FBS) por 48 h. (A) Western blot representativo. (B) Cuantificación por análisis densitométrico de los niveles de α-SMA relativizados por β-tubulina. ANOVA de dos vías, post-test Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  comparado con control. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  comparado con respectivo control. N=5.

En resumen, IL-6 a 300 ng/mL no disminuyó los niveles de proteínas contráctiles en células A7r5.

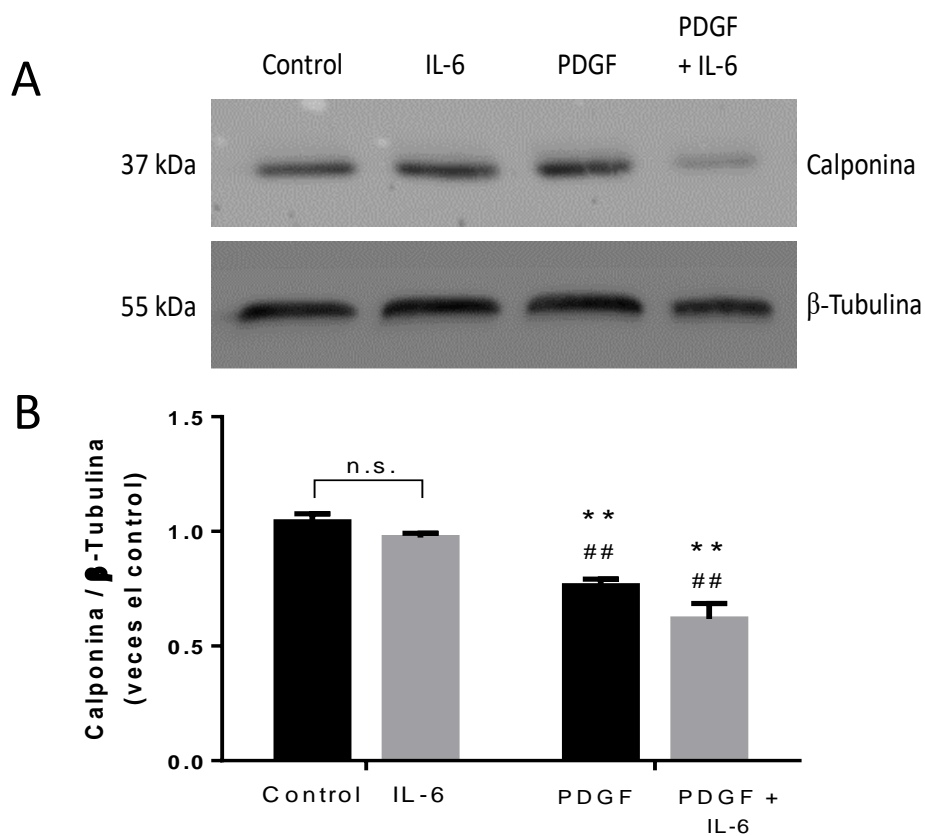
En el artículo publicado por Ohkawa *et al* [3] se describe que al tratar tejido aórtico de rata con 50 U/mL de IL-6, ocurría una disminución en la capacidad contráctil del vaso sanguíneo. A partir de aquí comienzan los indicios sobre los efectos de IL-6 sobre la capacidad contráctil del tejido vascular. Recientemente, se

describió que al tratar disecciones de tejido aórtico humano con 20 ng/mL de IL-6 disminuye la cantidad de proteínas contráctiles a las 12 h de estimulación [48]. Este resultado contrasta con lo observado en esta memoria. Sin embargo, esto se podría explicar por las diferencias existentes entre la aproximación experimental utilizada en el artículo y en esta memoria. En el trabajo descrito se utiliza tejido humano como modelo de estudio, una concentración de IL-6 15 veces menor en comparación a esta memoria (20 y 300 ng/mL, respectivamente) y el tiempo de estimulación es 4 veces menor (12 y 48 h, respectivamente).

Es importante señalar la importancia de las condiciones experimentales, ya que, en otro artículo [49], donde también se utilizaron aortas humanas y CMLV humanas, se describió que la estimulación con 10 ng/mL de IL-6 tiene efectos diferenciales según el tiempo de estimulación. Se observó que reduce los niveles de CK7, CK18 y  $\beta$ -catenina durante las primeras 12 h de tratamiento. Mientras que a las 24 h de estimulación, la cantidad de estas mismas proteínas aumenta respecto al grupo control. Además, se observó que IL-6 disminuye la expresión de marcadores de desdiferenciación de membrana como CD31 y CD34 [49].

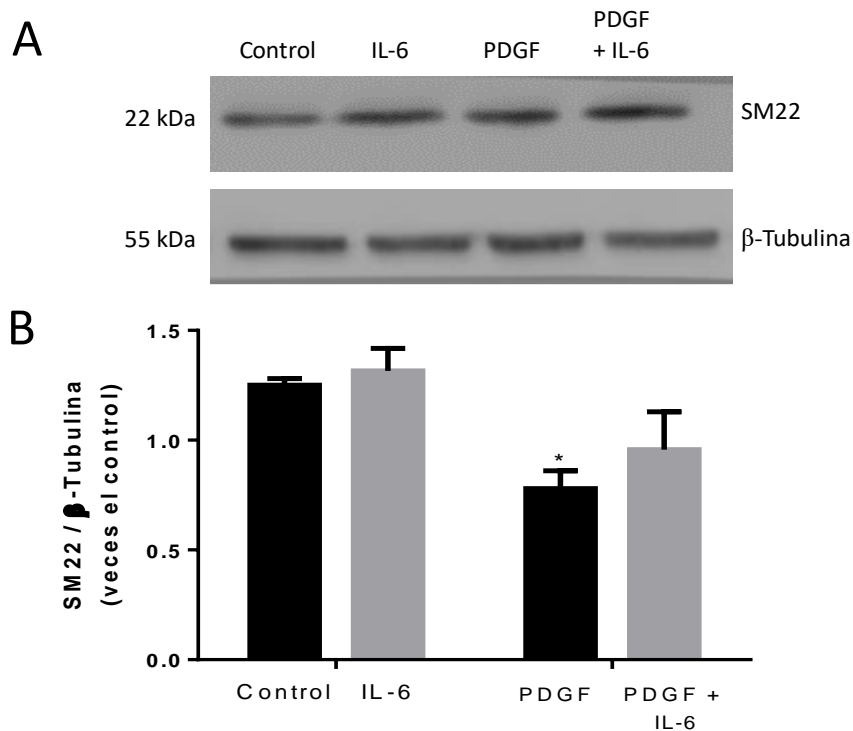
De esta manera, el contraste de resultados podría tener distintas explicaciones como, por ejemplo: el modelo utilizado, la concentración de IL-6 y el tiempo de estimulación con la cito-mioquina. Respecto al modelo utilizado es importante señalar el origen de las CMLV usadas en esta memoria, el cual es de aorta de rata embrionaria, cuya respuesta puede diferir de CMLV humanas y además puede diferir si las células usadas son líneas o cultivos primarios. Por otra parte, las condiciones experimentales también son importantes ya que la

concentración de 300 ng/mL es alta en comparación a los distintos trabajos mencionados (10, 20, 50 ng/mL) y finalmente el tiempo de estimulación con IL-6, donde se describió que efectivamente hace la diferencia a la hora de observar fenómenos celulares.



**Figura 19. Efecto de IL-6 sobre los niveles proteicos de calponina en células A7r5.**

Células A7r5 se incubaron en ausencia (vehículo) o presencia de IL-6 (300 ng/mL), PDGF-BB (20 ng/mL), IL-6 (300 ng/mL) + PDGF-BB (20 ng/mL) en DMEM 0% FBS por 48 h. (A) Western blot representativo. (B) Cuantificación por análisis densitométrico de los niveles de calponina relativizados por  $\beta$ -tubulina. ANOVA de dos vías, post-test Holm-Sidak. \*\* $p < 0,01$  comparado con control. ## $p < 0,01$ ; comparado con su respectivo control. N=5.



**Figura 20. Efecto de IL-6 sobre los niveles proteicos de SM22 en células A7r5.** Células A7r5 se incubaron en ausencia (vehículo) o presencia de IL-6 (300 ng/mL), PDGF-BB (20 ng/mL), IL-6 (300 ng/mL) + PDGF-BB (20 ng/mL) en DMEM 0% FBS por 48 h. (A) Western blot representativo. (B) Cuantificación por análisis densitométrico de los niveles de SM-22 relativizados por  $\beta$ -tubulina. ANOVA de dos vías, post-test Holm-Sidak. \* $p < 0,05$  comparado con control. N=4.

Por otra parte, se ha descrito que no solo existen los fenotipos diferenciado y desdiferenciado, si no que estas células se pueden encontrar en un abanico de distintos fenotipos intermedios [11, 12]. Un ejemplo claro es el de esta memoria donde se ha observado que al estimular células A7r5, se induce un fenotipo migratorio, proliferativo pero contráctil. Esto coincide con lo descrito durante la



angiogénesis, donde es necesario que las CMLV migren y proliferen sin dejar de ser contráctiles [13].

En esta memoria se estudiaron solo 3 parámetros fenotípicos de CMLV (migración, proliferación y cantidad de proteínas contráctiles). Sin embargo, existen otros parámetros asociados al estudio de estas células como, por ejemplo: síntesis y secreción de componentes de MEC (colágeno), secreción de MMPs, síntesis y secreción de citoquinas y marcadores de membrana específicos [12].

Cabe mencionar que el análisis realizado de los parámetros estudiados puede mejorar desde el punto de vista experimental. Actualmente la tecnología permite grabar y registrar en tiempo real la migración celular. Por otra parte, la proliferación celular también se puede determinar mediante citometría de flujo, donde se observaría en qué etapa del ciclo celular se encuentran las CMLV o también se puede estudiar mediante el estudio de la incorporación de timidina tritiada [17] y por su parte, la cantidad de proteínas contráctiles puede ser complementada con qPCR para observar y relacionar la cantidad de transcrito respecto a la cantidad de proteína.

Con todas estas técnicas mencionadas anteriormente se lograría realizar un estudio acabado de los 3 parámetros clásicos de diferenciación de las células musculares lisas vasculares. Con estudios de este tipo será posible comprender de mejor manera el rol de IL-6 en el fenotipo y función de las CMLV *in vitro*. Los resultados obtenidos permitirán contribuir a la comprensión del proceso de diferenciación/desdiferenciación de las CMLV.

## PROYECCIONES

Como citoquina, IL-6 participa en la respuesta inmune innata y es un activador de la respuesta de fase aguda [25]. Como mioquina, actúa de forma autocrina y paracrina en el músculo esquelético y de forma endocrina para mediar efectos metabólicos y antiinflamatorios [27, 28]. La pregunta que resulta es por qué IL-6 aumenta de forma sostenida hasta 20 veces durante una inflamación crónica y también aumenta forma transiente hasta 100 veces después de hacer ejercicio [22, 24], siendo una interleuquina con distintos efectos a nivel sistémico ¿Cuál es la diferencia entre su actividad como citoquina y mioquina?; ¿Cuáles son sus efectos sobre las CMLV? Preguntas como éstas siguen sin tener respuesta

No obstante, se debe considerar que las CMLV también participan en los procesos inflamatorios, pero su efecto es local. Se ha descrito que ante estímulos proinflamatorios y no inflamatorios las CMLV son capaces de secretar IL-6 [50, 51]. Esta IL-6 secretada por las CMLV tendría efectos autocrinos y paracrinos sobre el tejido vascular, de esta forma IL-6 estaría cambiando el fenotipo de estas células (Figura 8).

Además, comprender como funciona la señalización diferencial de IL-6 y sIL-6R y sus efectos celulares sobre las CMLV, ayudaría a encontrar las diferencias entre la señalización clásica y la trans-señalización de esta interleuquina. De esta forma, se podría encontrar el mecanismo mediante el cual IL-6 actúa diferencialmente como citoquina y como mioquina.

Sin embargo, aún hace falta otras aproximaciones experimentales como por ejemplo utilización de cultivos primarios de CMLV o técnicas *in vivo*. De esta forma se espera dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales el deporte produce beneficios en nuestro organismo, entre ellos el efecto vascular y cardioprotector.

### **CONCLUSIONES**

1. Interleuquina 6 induce migración de línea celular A7r5 de forma dosis-tiempo dependiente.
2. Interleuquina 6 no promueve la proliferación celular de CMLV
3. Interleuquina 6 mantiene los niveles de proteínas contráctiles de células A7r5

Finalmente se concluye que interleuquina 6 produce una desdiferenciación parcial de línea celular de musculo liso vascular, ya que, cambia solo un parámetro fenotípico, la migración celular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lanas F, Avezum A, Bautista LE, Diaz R, Luna M, Islam S, Yusuf S, America IliL. Risk factors for acute myocardial infarction in Latin America: the INTERHEART Latin American study. *Circulation*. 2007; 115:1067-1074.
2. DEIS. Indicadores básicos de salud Chile 2016. Ministerio de Salud. 2016. <http://www.deis.cl/wp-content/uploads/2018/12/IBS-2016.pdf>.
3. Ohkawa F, Ikeda U, Kawasaki K, Kusano E, Igarashi M, Shimada K. Inhibitory effect of interleukin-6 on vascular smooth muscle contraction. *Am J Physiol*. 1994; 266:H898-902.
4. Dawson EA, Cable NT, Green DJ, Thijssen DHJ. Do acute effects of exercise on vascular function predict adaptation to training? *Eur J Appl Physiol*. 2018; 118:523-530.
5. Fernando L, Pamela S, Alejandra L. Cardiovascular disease in Latin America: the growing epidemic. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014; 57:262-267.
6. Mora S, Cook N, Buring JE, Ridker PM, Lee IM. Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. *Circulation*. 2007; 116:2110-2118.
7. Morris JN, Crawford MD. Coronary heart disease and physical activity of work; evidence of a national necropsy survey. *Br Med J*. 1958; 2:1485-1496.
8. Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep*. 2014; 47:1-7.
9. Thijssen DH, Cable NT, Green DJ. Impact of exercise training on arterial wall thickness in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122:311-322.
10. Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens*. 2013; 2013:808353.
11. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*. 2007; 45 Suppl A:A25-32.
12. Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Exercise-induced vascular remodeling. *Exerc Sport Sci Rev*. 2003; 31:26-33.
13. Cecchetti A, Rocchiccioli S, Boccardi C, Citti L. Vascular smooth-muscle-cell activation: proteomics point of view. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011; 288:43-99.
14. Raschke S, Eckel J. Adipo-myokines: two sides of the same coin--mediators of inflammation and mediators of exercise. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:320724.
15. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2015; 214:33-50.
16. Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*. 1985; 42:139-162.
17. Garcia-Miguel M, Riquelme JA, Norambuena-Soto I, Morales PE, Sanhueza-Olivares F, Nunez-Soto C, Mondaca-Ruff D, Cancino-Arenas N, San Martin A, Chiong M. Autophagy mediates tumor necrosis factor-alpha-induced phenotype switching in vascular smooth muscle A7r5 cell line. *PLoS One*. 2018; 13:e0197210.

18. Torres G, Morales PE, Garcia-Miguel M, Norambuena-Soto I, Cartes-Saavedra B, Vidal-Pena G, Moncada-Ruff D, Sanhueza-Olivares F, San Martin A, Chiong M. Glucagon-like peptide-1 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation through mitochondrial dynamics regulation. *Biochem Pharmacol.* 2016; 104:52-61.
19. Rodriguez JA, Orbe J, Paramo JA. [Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes]. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60:959-967.
20. Ahima RS, Park HK. Connecting Myokines and Metabolism. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2015; 30:235-245.
21. Gorgens SW, Eckardt K, Jensen J, Drevon CA, Eckel J. Exercise and Regulation of Adipokine and Myokine Production. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015; 135:313-336.
22. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews.* 2008; 88:1379-1406.
23. Raschke S, Eckardt K, Bjorklund Holven K, Jensen J, Eckel J. Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells. *PLoS One.* 2013; 8:e62008.
24. Sarvas JL, Khaper N, Lees SJ. The IL-6 Paradox: Context Dependent Interplay of SOCS3 and AMPK. *J Diabetes Metab.* 2013; Suppl 13.
25. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18:773-789.
26. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2012; 122:143-159.
27. Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Ritov VB, Menshikova EV, Kelley DE, Hidalgo J, Pedersen BK, Kelly M. Interleukin-6 Regulation of AMP-Activated Protein Kinase: Potential Role in the Systemic Response to Exercise and Prevention of the Metabolic Syndrome. *Diabetes.* 2006; 55:S48-S54.
28. Gray SR, Ratkevicius A, Wackerhage H, Coats P, Nimmo MA. The effect of interleukin-6 and the interleukin-6 receptor on glucose transport in mouse skeletal muscle. *Exp Physiol.* 2009; 94:899-905.
29. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine.* 2014; 70:11-20.
30. Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Curr Opin Immunol.* 2015; 34:75-82.
31. Wang D, Liu Z, Li Q, Karpurapu M, Kundumani-Sridharan V, Cao H, Dronadula N, Rizvi F, Bajpai AK, Zhang C, Muller-Newen G, Harris KW, Rao GN. An essential role for gp130 in neointima formation following arterial injury. *Circ Res.* 2007; 100:807-816.
32. Geiger T, Andus T, Klapproth J, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol.* 1988; 18:717-721.
33. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature.* 1994; 368:339-342.

34. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*. 2000; 101:1372-1378.
35. Kinlay S, Egido J. Inflammatory biomarkers in stable atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2006; 98:2P-8P.
36. Pedersen BK. Exercise and cytokines. *Immunology and cell biology*. 2000; 78:532-535.
37. Bahuguna A, Khan I, Bajpai V, Kang S. MTT Assay to Evaluate the Cytotoxic Potential of a Drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017; 12:115-118.
38. Sun L, Zhao R, Zhang L, Zhang T, Xin W, Lan X, Huang C, Du G. Salvianolic acid A inhibits PDGF-BB induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation while does not constrain endothelial cell proliferation and nitric oxide biosynthesis. *Molecules*. 2012; 17:3333-3347.
39. Wang Z, Newman WH. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *Journal of Surgical Research*. 2003; 111:261-266.
40. Lee GL, Wu JY, Tsai CS, Lin CY, Tsai YT, Lin CS, Wang YF, Yet SF, Hsu YJ, Kuo CC. TLR4-Activated MAPK-IL-6 Axis Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Function. *Int J Mol Sci*. 2016; 17.
41. Senger DR, Perruzzi CA, Streit M, Koteliansky VE, de Fougères AR, Detmar M. The  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *The American journal of pathology*. 2002; 160:195-204.
42. Klouche M, Bhakdi S, Hemmes M, Rose-John S. Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor. *J Immunol*. 1999; 163:4583-4589.
43. Heldin CH, Lennartsson J. Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5:a009100.
44. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*. 2017;1-17.
45. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*. 2005; 11:127-152.
46. Sylvester PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. In: *Drug design and discovery* (Springer, 2011; pp. 157-168).
47. Lu QB, Wan MY, Wang PY, Zhang CX, Xu DY, Liao X, Sun HJ. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NF $\kappa$ B/mTOR/P70S6K signaling cascade. *Redox Biol*. 2018; 14:656-668.
48. An Z, Qiao F, Lu Q, Ma Y, Liu Y, Lu F, Xu Z. Interleukin-6 downregulated vascular smooth muscle cell contractile proteins via ATG4B-mediated

- autophagy in thoracic aortic dissection. *Heart and vessels*. 2017; 32:1523-1535.
49. Stintzing S, Ocker M, Hartner A, Amann K, Barbera L, Neureiter D. Differentiation patterning of vascular smooth muscle cells (VSMC) in atherosclerosis. *Virchows Archiv*. 2009; 455:171-185.
  50. Loppnow H, Libby P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest*. 1990; 85:731-738.
  51. Viedt C, Vogel J, Athanasiou T, Shen W, Orth SR, Kubler W, Kreuzer J. Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:914-920.



San Clemente  
Chile

“...I cannot put my  
Finger on it now  
The child is grown  
The dream is gone...”

Comfortably numb – Pink Floyd