

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Papel del receptor soluble de Interleuquina-6 en el cambio fenotípico de las células musculares lisas vasculares

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica

Paulina Fernanda Villar Fincheira

Director de Tesis: Dr. Mario Chiong

Santiago-CHILE

enero 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

Paulina Fernanda Villar Fincheira

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

Director de Tesis:

Dr. Mario Chiong

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Inés Becker

Dra. Marcela Hermoso

Dra. Sonja Buvinic

Dr. Mauricio Boric

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
PRÓLOGO	v
DEDICATORIA	vi
FINANCIAMIENTO	vii
PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....	viii
Publicaciones	viii
Congresos.....	ix
AGRADECIMIENTOS	x
PROYECCIONES	xiii
GLOSARIO	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT	xix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades cardiovasculares (ECV)	1
1.2. Epidemiología de las ECV	1
1.3. Factores de riesgo de las ECV	2
1.4. Fisiopatología vascular	2
1.5. Componentes estructurales de la vasculatura	3
1.6. Fenotipos de las células musculares lisas vasculares (CMLV)	4
1.7. Remodelado vascular	5
1.8. Efecto del ejercicio físico en las ECV.....	7

1.9. Ejercicio y remodelado vascular	8
1.10. Ejercicio físico y mioquinas.....	8
1.11. Interleuquina-6	9
1.12. Señalización de IL-6	9
1.13. Regulación de los niveles de IL-6 durante el ejercicio	11
1.14. Regulación del metabolismo vía AMPK	12
1.15. Regulación del metabolismo vía IL-6	13
1.16. Influencia de IL-6 en los fenotipos de las CMLV	14
1.17. Resumen	15
2. HIPÓTESIS.....	16
3. OBJETIVO GENERAL.....	16
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1. Cultivo celular.....	17
5.2. Preparación de extractos de proteínas totales.....	17
5.3. Niveles proteicos por western blot	17
5.4. Migración por ensayo de herida.....	19
5.5. Ensayo de transwell	19
5.6. Ensayo MTT	19
5.7. Análisis estadístico	20
6. RESULTADOS	21
6.1. Determinación de la presencia de gp130 en CMLV A7r5	21
6.2. Estudio del efecto de IL-6 y sIL-6R sobre el fenotipo de las CMLV A7r5	21
6.2.1. Efecto de IL-6 y sIL-6 sobre la migración de CMLV A7r5.....	22

6.2.2. Efecto de IL-6 y sIL-6 sobre los niveles de proteínas contráctiles en CMLV A7r5	28
6.2.3. Efecto de IL-6 y sIL-6 sobre los niveles de colágeno I en CMLV A7r5.....	30
6.2.4. Efecto de IL-6 y sIL-6 sobre la proliferación de CMLV A7r5	32
6.3. Estudio del efecto de sIL-6R sobre la activación de AMPK en las CMLV A7r5.....	28
6.3.1. Efecto de sIL-6R sobre la fosforilación de AMPK en CMLV A7r5.....	35
6.3.2. Rol de AMPK en la inhibición de la migración de las CMLV A7r5 dependiente de sIL-6R.....	37
7. DISCUSIÓN	39
8. CONCLUSIONES	53
9. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo de aterosclerosis.	3
Figura 2.	Principales tipos de remodelad vascular.	6
Figura 3.	Arteriogénesis y angiogénesis.	7
Figura 4.	Señalización de IL-6.	11
Figura 5.	Niveles proteicos de gp130 en las CMLV A7r5.....	21
Figura 6.	Efecto de IL-6 y PDGF-BB en la migración de las CMLV A7r5.....	23
Figura 7.	Efecto de IL-6 y sIL-6R en la migración de las CMLV A7r5.....	24
Figura 8.	Efecto de PDGF-BB y sIL-6R en la migración de las CMLV A7r5.	25
Figura 9.	Efecto del cotratamiento de IL-6 con PDGF-BB y sIL-6R en la migración de las CMLV A7r5.....	26
Figura 10.	Efecto de sIL-6R sobre la fosforilación de FAK en CMLV A7r5.	27
Figura 11.	Efecto de sIL-6R sobre la fosforilación de FAK inducida por PDGF-BB.	28
Figura 12.	Efecto de IL-6 sobre los niveles de proteínas contráctiles en las CMLV A7r5.	29
Figura 13.	Efecto de IL-6 y sIL-6R sobre los niveles de proteínas contráctiles en las CMLV A7r5.	30
Figura 14.	Efecto de IL-6, sIL-6R y PDGF-BB sobre los niveles de α -SMA en las CMLV A7r5 a las 48 h.....	31
Figura 15.	Efecto de IL-6 y sIL-6R en el contenido de colágeno I en las CMLV A7r5.	32
Figura 16.	Efecto de PDGF-BB y sIL-6R en el contenido de colágeno I en las CMLV A7r5.....	33
Figura 17.	Efecto de IL-6 y sIL-6R en la proliferación de las CMLV A7r5.	34
Figura 18.	Efecto de sIL-6R en la fosforilación de AMPK en las CMLV.	35
Figura 19.	Efecto de sIL-6R en la fosforilación de AMPK en las CMLV desdiferenciadas con PDGF-BB.	36
Figura 20.	Efecto de sIL-6R en los niveles de PGC-1 α en las CMLV A7r5.	37
Figura 21.	Efecto de la inhibición de AMPK en la migración de las CMLV.	38
Figura 22.	Liberación de IL-6 por PDGF-BB y trans-señalización.....	45
Figura 23.	Esquema del mecanismo de acción de la trans-señalización de IL-6.	47
Figura 24.	Modelo del mecanismo de señalización involucrado en la migración de las células.....	51

PRÓLOGO

La muerte es la única certeza que tenemos, a lo que inevitablemente estamos destinados,
Un resultado con 100% de probabilidad de éxito,
Una experiencia impostergable.

El tiempo, nuestro bien máspreciado frente a esta certeza,
Tic-tac,
¿Cuánto tiempo llevas consciente?

La energía; condicionada por tus pensamientos e influida por el ambiente,
Una sensación subjetiva de un estímulo real,
¿Es real la realidad?

¿Qué es lo que te pertenece? Un grado académico, tu propia vida, tus decisiones o creencias.
¿A qué le tienes tanto miedo o rabia? A despertarte vacío por las mañanas, al vacío que el reconocimiento o el dinero no pueden llenar, y buscas más y más, y nunca estas satisfecho, llenarte de títulos, de propiedades, de más vacío.

Te tengo una noticia, estás hecho de vacío. Disfrútalo. Déjate sumergir. Imagina que estás mirando la inmensidad del universo con un lente con otro enfoque que apunta hacia dentro, hacía una profundidad que aún no tenemos la certeza de conocer.

DEDICATORIA

Dedicado a todos los pensamientos rebeldes que a lo largo de la historia creyeron que había una mejor explicación o una respuesta más sencilla.

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta tesis de doctorado se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales Moleculares, el cual pertenece al Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Este trabajo contó con el apoyo y financiamiento de los siguientes proyectos:

- Beca CONICYT 2017 - 2021 (PV)
- Extensión de Beca CONICYT 2021 (PV)
- Proyecto FONDECYT 1180157 (MC)
- Proyecto FONDAP 15130011 (MC)

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis han sido publicados y presentados en revistas científicas y congresos.

Publicaciones

1. **Villar-Fincheira P**, Paredes AJ, Hernández-Díaz T, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Sanhueza-Olivares F, Contreras-Briceño F, Mandiola J, Bruneau N, García L, Ocaranza MP, Troncoso R, Gabrielli L, Chiong M. Soluble Interleukin-6 Receptor Regulates Interleukin-6-Dependent Vascular Remodeling in Long-Distance Runners. *Front Physiol.* 2021 Oct 11;12:722528. doi: 10.3389/fphys.2021.722528. PMID: 34707507; PMCID: PMC8542859.
2. **Villar-Fincheira P**, Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Hernandez-Vargas F, Troncoso R, Gabrielli L, Chiong M. Role of Interleukin-6 in Vascular Health and Disease. *Front Mol Biosci.* 2021 Mar 16;8:641734. doi: 10.3389/fmolb.2021.641734. PMID: 33786327; PMCID: PMC8004548.
3. Norambuena-Soto I, Ocaranza MP, Cancino-Arenas N, Sanhueza-Olivares F, **Villar-Fincheira P**, Leiva-Navarrete S, Mancilla-Medina C, Moya J, Novoa U, Jalil JE, Castro PF, Lavandero S, Chiong M. Angiotensin-(1-9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1-dependent mechanism. *Biochem Pharmacol.* 2020 Oct;180:114190. doi: 10.1016/j.bcp.2020.114190. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32768401.
4. Mondaca-Ruff D, Riquelme JA, Quiroga C, Norambuena-Soto I, Sanhueza-Olivares F, **Villar-Fincheira P**, Hernández-Díaz T, Cancino-Arenas N, San Martín A, García L, Lavandero S, Chiong M. Angiotensin II-Regulated Autophagy Is Required for Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Front Pharmacol.* 2019 Feb 5;9:1553. doi: 10.3389/fphar.2018.01553. PMID: 30804791; PMCID: PMC6371839.

Congresos

1. **Villar P**, Hernandez-Díaz T, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Sanhueza-Olivares F, Contreras-Briceño F, Mandiola J, Troncoso R, Gabrielli L, Chiong M. Role of soluble Interleukin-6 receptor in vascular smooth muscle cell phenotype. XLIV Reunión anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (SBBMCh). (Presentación oral).
2. **Villar P**, Hernandez-Díaz T, Norambuena-Soto I, Sanhueza-Olivares F, Cancino-Arenas N, Chiong M. Soluble IL-6 receptor inhibits PDGF-BB and IL-6 induced vascular smooth muscle cell migration. XLII Reunión anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (SBBMCh)/ XIV reunión anual de la Sociedad de Biología Vegetal de Chile (CSPB), 8-11 de octubre del 2019, Iquique. Chile. (Presentación oral).
3. **Villar P**, Hernández-Díaz T, Cancino-Arenas N, Norambuena-Soto I, Sanhueza-Olivares F, Chiong M. Rol del receptor soluble de interleuquina-6 (sIL-6R) en el control de la proliferación y migración de las células musculares lisas vasculares (CMLV). XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas (SChCF), 28-31 agosto del 2018, Reserva Biológica Huilo-Huilo, Chile.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los maestros que pasaron por mi vida, cada conversación, cada energía o experiencia recibida me impulsaron a crecer y estar donde estoy hoy día.

Agradezco tener la fortuna de haber formado parte del ACCDiS, en donde durante todo el desarrollo de mi tesis compartí con personas brillantes y de una calidad humana excepcional. Allí siempre encontré un alto nivel académico y científico; logré formar mi pensamiento crítico, y compartir con los profesores en un ámbito profesional de respeto y humildad.

Agradezco en especial a mi equipo de trabajo conformado por Ignacio Norambuena, Tomás Hernández, Nicole Cancino y Fernanda Sanhueza, junto a ellos compartí penas, frustraciones, días y noches infinitas en el laboratorio; algunas veces ganas locas de tirar los experimentos por la ventana y romper la mayoría de las veces en llanto. Pero ahí estaban ellos convirtiendo toda esa energía en risas, bailes, y borracheras.

En especial agradezco al líder de mi equipo, el Dr. Mario Chiong, siempre con una sonrisa a pesar de estar siempre lleno de trabajo, con miles de proyectos encima, y con toda la responsabilidad de lograr que termináramos las tesis sin morir en el intento. Su apoyo constante y confianza en mi trabajo lograron impulsar mi carrera y llegar hasta el final del camino. En el encontré más que un tutor de tesis, encontré cariño, empatía, y un gran amigo.

Agradezco a la familia Guevara-Vergara por refugiarme y amarme en tiempos tormentosos y días soleados, solo tengo infinito amor para todos ellos. A mis compañeros y amigos de facultad, en especial a Daniela Herrera, Constanza Morgado y Lissette Colomer, cuyas locuras y viajes, conversaciones existenciales, y salidas a cenar, trajeron a mi vida mucha felicidad.

A los Dres. Sergio Lavandero, Valentina Parra y Jaime Riquelme por todo el apoyo, cariño y confianza que entregan a todos sus alumnos día a día. A mi comisión de tesis los Dres. María Inés Becker, Marcela Hermoso, Sonja Buvinic y Mauricio Boric, por todo el apoyo y enseñanza brindada en el proceso.

A mis compañeros de laboratorio, Yareni Avalos, Danica Jiménez y Sebastián Leiva por su alegría y cariño incondicional, por el humo y las botellas de espumante detrás. A Fidel Albornoz, por toda su gestión burócrata y buena disposición. A las secretarías de la facultad y al personal de aseo y seguridad, en ellos encontré siempre dulzura y gentileza.

Agradecida de formar parte de portofino, mi familia paraguaya. A Larissa Alemán por abrirme las puertas de su vida y nación, por mostrarme lo poderosa y guerreras que podemos ser, enseñarme de autoestima y convencerme de que estoy aquí para “comerme el mundo”. A la sabiduría infinita de Isabel Giménez, por enseñarme que vivimos un día a la vez, y que todo si lo piensas va a salir bien. A Cristian Melgarejo y Alejandra Recalde, mis compañeros de aventura europea, me abrieron las puertas del viejo continente y de sus corazones bondadosos. Me abrigaron y dieron techo cuando perdía el rumbo, y me animaron a ver el sol salir otra vez a través de su lealtad, alegría y amor.

A la familia Bueno-Daza, a mi amiga del alma Bélgica Bueno, por crecer conmigo, abrirme su hogar, tener una hija tan maravillosa, regalarme su tiempo y alegría, su compañía y sus ganas de soñar.

A MEDICEL por permitirme trabajar y terminar el doctorado, por enseñarme de rutina, horarios y sistemas de producción. Introducirme al mundo de los negocios, y motivarme a experimentar otras áreas de conocimiento. A Cecilia Salazar, Daniela Smith, Andrea Rojas y Jorge Berendsen. En especial a Paola Moreira por enseñarme que somos capaces de lograr todo lo que nos proponemos y que nunca estamos solos. Al equipo de Vitaclinic y Edutecno, por la lealtad y la buena onda.

A la familia Fincheira por todo el amor que entregan. A mi madre por su apoyo constante, por enseñarme que nunca es tarde para empezar desde cero, que si te caes te levantas, que sin importar tu pasado la vida tiene para ti millones de oportunidades llenas de amor y bendiciones. Que el viaje de la vida es una experiencia que no puedo desperdiciar. Por dejar que continúe mi viaje, aunque no sepa cuan lejos pueda llegar.

Por último, agradecida de la iluminación que me da el conocimiento y el pensamiento crítico. Salir de la automatización y empezar a cuestionar es uno de mis grandes actos de rebeldía. Y aunque era consciente de que los rebeldes no siempre son bienvenidos, durante mi camino siempre encontré mar, solcito, y alegría.

PROYECCIONES

Espero que mis actos me enorgullezcan y siempre estén inspirados en amor y respeto. Sueño con el día en que el amor sea la fuerza vital que sacuda al mundo, y podamos ser cada día más felices y plenos con menos.

Aunque finalizo este viaje académico de 11 años de exploración y esclarecimiento, continúo buscando la excelencia en cada uno de los aspectos de mi existencia.

GLOSARIO

ACC	: Acetil CoA carboxilasa
ADAM17	: Desintegradora y metaloproteínasa 17
AICAR	: 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosida
ANP	: Péptido natriurético atrial
AMPK	: Proteína quinasa activada por AMP
ATP	: Adenosina trifosfato
CaMKKβ	: Quinasa de la quinasa activada por calcio y calmodulina β
CC	: Compuesto C
CMLV	: Células musculares lisas vasculares
EC	: Células endoteliales
FAK	: Quinasa de adhesión focal
GDP	: Guanosina difosfato
GEF	: Factor intercambiador de guanina
GLUT1	: Transportador de glucosa tipo 1
GPCR	: Receptor asociado a proteína G
gp130	: Glicoproteína de membrana 130 kDa
GTP	: Guanosina trifosfato
HIT	: Ejercicio de alta intensidad
IL-1ra	: Agonista del receptor de interleuquina-1
IL-1β	: Interleuquina-1 β
IL-10	: Interleuquina-10
IL-6	: Interleuquina-6
IL-6R	: Receptor de IL-6
IP3	: Fosfatidilinositol trifosfato
IP3R	: Receptor de fosfatidilinositol trifosfato
JAK	: Quinasa Janus
LKB1	: Quinasa hepática B1

mTORC1	: Blanco mecanístico del complejo 1 de rapamicina
NO	: Óxido nítrico
ox-LDL	: Lipoproteína de baja densidad oxidada
PCR	: Proteína C reactiva
PDGF	: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGC-1α	: Proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas
PIP2	: Fosfatidilinositol bifosfato
PKC	: Quinasa dependiente de calcio
PLCβ	: Fosfolipasa β
Ser/Thr	: Serina/Treonina
SFB	: Suero fetal de bovino
SH2	: Región de homología Src 2
SH3	: Región de homología Src 3
sIL-6R	: Receptor soluble de IL-6
SM22:	Proteína del músculo liso 22
SHP-2	: Dominio SH2 contenido en proteínas fosfatasa 2
STAT	: Transductor de señal y activador de la transcripción
SOCS	: Supresor de la señalización de citoquina
TNF-α	: Factor de necrosis tumoral α
TLR4	: Receptor tipo Toll 4
Thr	: Treonina
Tyr	: Tirosina
VEGF	: Factor de crecimiento vascular endotelial
YXXQ	: Tirosina-2 aminoácidos-glutamina

RESUMEN

La práctica regular de ejercicio tiene muchos efectos positivos en la salud física y mental de las personas. Durante el último tiempo, apareció como una beneficiosa estrategia en la prevención y disminución de factores de riesgo para muchas enfermedades, como las enfermedades cardiovasculares (ECV).

A su vez, el desarrollo y progresión de las ECV se asocia a cambios estructurales y funcionales en la vasculatura. En condiciones normales, la vasculatura contiene células musculares lisas vasculares (CMLV) en estado mayoritariamente diferenciado. Estas células son responsables de la regulación de la contracción y relajación de las arterias, controlando la presión y el flujo sanguíneo. En condiciones patológicas, estas células se desdiferencian desde un estado contráctil, a un estado sintético y proliferativo/migratorio. En el estado desdiferenciado, disminuyen su contenido de proteínas contráctiles, secretan proteínas de la matriz extracelular, y aumentan su capacidad proliferativa/migratoria, moviéndose desde la capa media a la íntima de la arteria. Cuando la cantidad de CMLV desdiferenciadas aumenta, se produce un remodelado vascular patológico, un evento relacionado negativamente con la salud vascular. Sin embargo, atletas con alta frecuencia de entrenamiento también pueden presentar un tipo de remodelado vascular conocido como fisiológico. En este remodelado se producen cambios estructurales como un mecanismo de adaptación a la alta demanda de oxígeno y nutrientes; caracterizado por un aumento del diámetro de la arteria, en ausencia de inflamación y fibrosis.

Por otra parte, el ejercicio físico incrementa los niveles circulantes de IL-6, una citoquina ampliamente conocida por sus acciones inflamatorias en las respuestas inmunes del organismo. Sin embargo, al liberarse durante una condición fisiológica como el ejercicio, se comporta como una mioquina e influencia el metabolismo energético a través de la activación de AMPK.

Ambas acciones antagónicas de IL-6 se pueden explicar por la presencia de una forma soluble del receptor de IL-6 (sIL6-R). Además, el ejercicio físico también incrementa los niveles plasmáticos de sIL-6R. sIL-6R permite ampliar el espectro de células que responden a IL-6, particularmente aquellas células que no expresan el IL-6R en la membrana plasmática. Así, la vía de señalización descrita para sIL-6R es conocida como trans-señalización e implica la formación

de un complejo IL-6/sIL-6R que se une a una glicoproteína de membrana, gp130, activándola. Sin embargo, los efectos de la trans-señalización son poco entendidos y aún requieren mayor investigación.

En el presente trabajo, nos propusimos determinar los efectos de la trans-señalización en el cambio fenotípico de las CMLV, con el objetivo de entender el mecanismo por el cual los atletas presentan un remodelado vascular fisiológico. Además, también incluimos evaluar los efectos de la trans-señalización en la activación de AMPK, con el fin de entender las vías de señalización que participan en la acción de sIL-6R.

Como hipótesis planteamos que “El receptor soluble de interleuquina-6 (sIL-6R) previene la disminución de las proteínas contráctiles, síntesis de colágeno, migración y proliferación de las células musculares lisas vasculares (CMLV) inducidas por interleuquina-6 (IL-6), a través de un mecanismo dependiente de la activación de la quinasa activada por AMP (AMPK)”. Los objetivos específicos fueron: (1) Evaluar el efecto de IL-6 en los niveles de proteínas contráctiles, síntesis de colágeno, migración y proliferación de las CMLV A7r5; (2) Evaluar el efecto de sIL-6R en los niveles de proteínas contráctiles, síntesis de colágeno, migración y proliferación de las CMLV A7r5 inducidas por IL-6; (3) Evaluar el papel de AMPK en los efectos de sIL-6R en las CMLV A7r5.

Todos los experimentos se realizaron en la línea celular de CMLV embrionaria de rata, A7r5. Los niveles de las proteínas contráctiles, α -actina de músculo liso (α -SMA), calponina y proteína de músculo liso 22 (SM22), se evaluaron por Western blot. La migración se determinó por el ensayo de cierre de heridas, niveles fosforilados de la quinasa de adhesiones focales (FAK) en la Tyr397, y por transwell. La proliferación celular se evaluó midiendo los niveles de ciclina D por Western blot, y a través del ensayo de reducción de formazán (MTT). La síntesis de matriz extracelular se evaluó a través de los niveles de colágeno I por Western blot. Por último, la activación de AMPK se determinó a través de sus niveles de fosforilación en la Thr172, y los niveles proteicos de PGC1- α , un blanco río abajo.

El tratamiento de las CMLV A7r5 con IL-6, sIL-6R, o la combinación de estas dos proteínas no modificó el contenido de proteínas contráctiles α -SMA, calponina y SM22; ni los niveles proteicos de colágeno I. Tampoco se alteró la proliferación de las CMLV A7r5.

Como control positivo de desdiferenciación se utilizó el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB). Las células estimuladas con PDGF-BB al tratarse con sIL-6R no cambiaron los niveles de proteínas contráctiles, síntesis de colágeno o la proliferación inducida por PDGF-BB.

Sin embargo, el tratamiento con IL-6 o PDGF-BB incrementó la migración de las CMLV A7r5. Interesantemente, la adición de sIL-6R disminuyó la migración celular inducida por IL-6 o por PDGF-BB. En este sentido, la adición de sIL-6R disminuyó la fosforilación de FAK, aún en las menores dosis de sIL-6R ensayadas. Por otra parte, el tratamiento de las células con sIL-6R incrementó los niveles de fosforilación de AMPK. Sin embargo, no se detectaron cambios en los niveles proteicos de PGC1- α . Por último, la adición de un inhibidor de AMPK, compuesto C, reprodujo los efectos anti-migratorios obtenidos con sIL-6R en CMLV A7r5 estimuladas con PDGF-BB.

Así, la trans-señalización de IL-6 aparece como un mecanismo importante de regulación del fenotipo migratorio de las CMLV, y podría explicar, al menos en parte, el mecanismo por el cual el ejercicio físico mantendría la salud vascular de los atletas.

ABSTRACT

Role of the soluble Interleukin-6 receptor on vascular smooth muscle cells phenotypic change

Regular exercise has many positive effects on physical and mental health. For quite a time indeed, it has emerged as a beneficial useful strategy in the prevention and reduction of risk factors for many diseases, such as cardiovascular disease (CVD).

In turn, the development and progression of CVD are associated with structural and functional changes in the vasculature. Under normal conditions, the vasculature contains vascular smooth muscle cells (VSMCs) in mostly a differentiated state; specializing their functions in the regulation of artery contraction and relaxation; regulating pressure and blood flow. Under pathological conditions, these cells change their contractile state to a synthetic and proliferative/migratory state. In the un-differentiated state, these cells decrease the content of contractile proteins, secrete extracellular matrix proteins, and increase their proliferative and migration capacity, allowing the movement of VSMC from the tunica media to the intima layer of arteries. When the synthetic and proliferative/migratory VSMC phenotype occurs, pathological vascular remodeling is triggered, impairing vascular health. However, athletes with high training frequency can also present a physiological vascular remodeling, where structural changes take place as a mechanism of adaptation to the high demand for oxygen and nutrients; and which it is characterized by increasing the diameter of the artery, but in the absence of inflammation and fibrosis.

The physical exercise increases circulating levels of IL-6, a cytokine widely known for its inflammatory actions in the immune response. However, during a physiological condition such as exercise, it behaves as a myokine and influence energy metabolism through the activation of AMPK.

Both antagonist actions of IL-6 can be explained by the production of soluble version of the IL-6 receptor, sIL-6R. The action of sIL-6R allows to broaden the spectrum of cells that respond to IL-6, particularly in cells that do not express the membrane bound IL-6R. Thus, the signaling pathway described for sIL-6R is known as trans-signaling and involves the formation of an

IL-6/sIL-6R complex that binds and activates a membrane glycoprotein, gp130. However, the effects of trans-signaling are poorly understood and still require further investigation.

In the present work, we determined the effects of trans-signaling on phenotypic change of VSMCs, with the objective to understand the mechanism by which athletes exhibit physiological vascular remodeling. In addition, we also evaluated the effects of trans-signaling on energy metabolism through AMPK activation, to understand the signaling involved in the action of sIL-6R.

Thus, we propose that “Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) prevents the decrease in contractile proteins, collagen I content, migration, and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced by interleukin-6 (IL-6), through the activation of an AMP-activated kinase (AMPK) dependent mechanism”.

The specific objectives were: (1) To evaluate the effect of IL-6 in the dedifferentiation of A7r5 VSMCs. (2) To evaluate the effect of sIL-6R on the dedifferentiation of A7r5 VSMCs induced by IL-6. (3) To evaluate the role of AMPK in the effects of sIL-6R on A7r5 VSMCs.

All experiments were performed on the CMLV A7r5 cell line. Contractile protein, α -smooth muscle actin (α -SMA), calponin and smooth muscle protein 22 (SM22), levels were evaluated by Western blot. Migration was determined by the wound closure assay, phosphorylated levels in Tyr397 of focal adhesion kinase (FAK), and by transwell. Cell proliferation was evaluated by measuring cyclin D levels by Western blot, and by the formazan reduction assay (MTT). Extracellular matrix synthesis was evaluated by the levels of collagen I by Western blot. Finally, AMPK activation was assessed by Thr172 phosphorylation levels, and PGC1- α protein levels, a downstream target.

The treatment with of IL-6, sIL-6R, or the combination of both proteins did not alter the contractile protein levels, collagen I content, and proliferation of VSMC A7r5. Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) was used as a positive dedifferentiation control. VSMCs dedifferentiated with PDGF-BB when were treated with sIL-6R did not change the contractile protein levels, collagen synthesis or proliferation induced by PDGF-BB.

However, the treatment with IL-6 or PDGF-BB increased VSMC A7r5 migration. Interestingly, the addition of sIL-6R decreased the migration induced by IL-6 or PDFG-BB. In this

sense, the addition of sIL-6R decreased FAK phosphorylation in a dose-dependent manner. Additionally, the treatment of cells with sIL-6R increased AMPK phosphorylation levels. However, no changes were detected in PGC1- α protein levels. Finally, the addition of an AMPK inhibitor, compound C, reproduced the anti-migratory effects obtained with sIL-6R in PDGF-BB treated VSMC A7r5.

Thus, IL-6 trans-signaling appears as an important mechanism to protect the functional status of VSMCs, and could explain, at least in part, the mechanism by which physical exercise would maintain the vascular health of athletes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades cardiovasculares (ECV)

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un conjunto de patologías que afectan al corazón y los vasos sanguíneos. Entre las ECV más comunes encontramos a las cardiopatías coronarias, accidentes cerebro vasculares, hipertensión arterial y cardiopatía reumática.¹ Se ha demostrado que una de las principales causas de infartos y accidentes cerebrovasculares se debe a un evento aterosclerótico, un proceso inflamatorio que genera la formación de una placa rica en colesterol, que bloquea el flujo sanguíneo e impide la nutrición y oxigenación del cerebro y corazón.² Como consecuencia, se produce una lesión o incluso muerte del tejido, provocando defectos en el correcto funcionamiento de estos órganos.²

1.2. Epidemiología de las ECV

Según datos obtenidos el año 2012 por la Organización Mundial de la Salud, la cardiopatía isquémica y la afección cerebrovascular son las primeras causas de muerte en el mundo. En conjunto provocan aproximadamente 13 millones de muertes, lo que equivale a un 23% de la mortalidad global.³ Además, la enfermedad pulmonar obstructiva genera 3,28 millones de muertes correspondientes a otros 5,8%. Finalmente, existe 1 millón de muertes debido a las cardiopatías hipertensivas, lo que suma un 2% más. En total se estiman unos 17 millones de muertes por ECV, las que corresponden a más de la tercera parte de todas las muertes alrededor del mundo.³

En Chile, los datos son bastante similares, con muertes principalmente por accidentes cerebrovasculares e infarto agudo al miocardio.⁴ Estos datos son preocupantes, primero por todas las consecuencias en la calidad de vida de las personas que las sufren, ya que al ser crónicas deben estar siempre con medicación y monitoreo periódico. Segundo, al tener una prevalencia tan elevada, estas enfermedades representan una tremenda inversión en gasto público para los gobiernos, lo que nos motiva a promover con mucho más ímpetu su prevención.

1.3. Factores de riesgo de las ECV

Las ECV son afecciones crónicas y multifactoriales, esto quiere decir que no existe un tratamiento efectivo para curar la enfermedad y que su aparición y progresión depende de varios factores. Así, podemos definir factores de riesgo que desencadenan el inicio del proceso, que corresponden a eventos o rasgos de una persona que aumentan la probabilidad de desarrollar la enfermedad. Algunos factores de riesgo de las ECV incluyen la obesidad, la diabetes, el tabaquismo y el sedentarismo.⁵ La realidad nacional sigue siendo bastante preocupante ya que actualmente más de la mitad de la población se encuentra en situación de riesgo. Un 89% de la población 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. A pesar de que las cifras son altas, la mayoría de estos factores de riesgo son modificables y controlables. Un cambio en el estilo de vida como un aumento de la actividad física y una alimentación sana pueden reducir la probabilidad de desarrollar ECV.^{4,5}

1.4. Fisiopatología vascular

Nuestro organismo obtiene nutrientes y oxigenación a través del sistema vascular, una red de arterias, venas y capilares sanguíneos que recorren todo nuestro cuerpo y llegan a todos nuestros órganos y tejidos. Las arterias son verdaderas tuberías por la que circula la sangre desde el corazón hacia los capilares, por lo que un deterioro en su estructura o funcionamiento también ocasiona problemas en el funcionamiento de los órganos.⁶

Una de las patologías vasculares más comunes es la aterosclerosis, una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la acumulación de lípidos en las paredes de las arterias. Estos depósitos de lípidos son denominados placas de ateroma, los que con el tiempo pueden estrechar u obstruir el flujo sanguíneo.⁷

Por otra parte, los lípidos acumulados en las paredes de las arterias, al estar en contacto directo con la sangre oxigenada, se oxidan, formando moléculas como el ox-LDL (lípidos de baja densidad oxidado) desencadenando un estado inflamatorio vía estrés oxidativo (Figura 1).^{8,9} Aunque la aterosclerosis ha sido bastante estudiada, aún no hay un tratamiento efectivo para la

enfermedad, por lo que entender sus bases moleculares permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

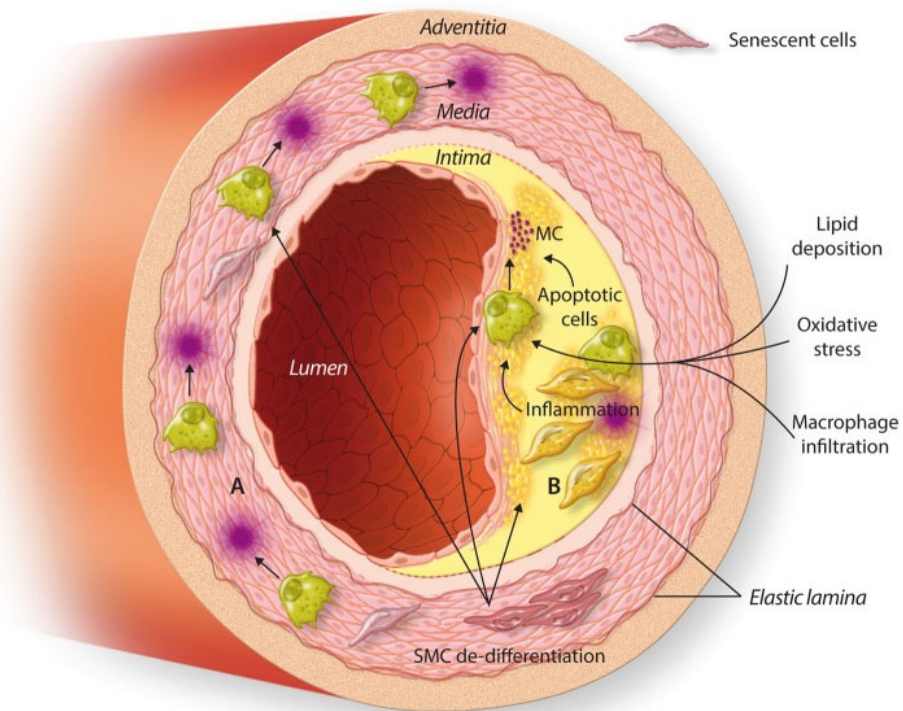


Figura 1. Modelo de aterosclerosis.

La vasculatura cuenta con 3 capas: una capa externa adventicia; una media compuesta por CMLV; y una capa íntima. En la aterosclerosis, se produce la acumulación de lípidos en la capa íntima, que al oxidarse desencadenan una respuesta inflamatoria con infiltración de macrófagos y apoptosis de las células. Este estado inflamatorio, la acumulación de grasa y la migración de CMLV desdiferenciadas desde la media a la íntima, promueven la formación de una placa ateroma en la pared de la arteria, lo que disminuye el lumen del vaso y dificulta el flujo sanguíneo. Imagen reproducida de Durham *et al.*⁸

1.5. Componentes estructurales de la vasculatura

La pared vascular consta de tres capas: la túnica íntima, 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 media por elementos de la matriz extracelular, principalmente colágeno, elastina y proteoglicanos.^{10,11}

Actualmente la vasculatura es considerada un órgano activo y dinámico. Frente a un estímulo como un cambio de presión o flujo sanguíneo, la pared vascular de vasos responde regulando su calibre. Por ejemplo, cuando existe un incremento en el flujo sanguíneo en arterias de conducción o arteriolas grandes se induce un estrés por estiramiento, produciendo un estímulo mecánico que induce la liberación de componentes vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), el cual actúa sobre las CMLV promoviendo la relajación, y como consecuencia, incrementando el diámetro de la vasculatura.¹²

1.6. Fenotipos de las células musculares lisas vasculares (CMLV)

Como ya mencionamos, las CMLV son el principal componente de la túnica media de las arterias. Son células contráctiles encargadas de regular el tono vascular, el flujo y la presión sanguínea.¹³ En condiciones normales, la mayor parte de las CMLV se encuentran en un estado diferenciado. En este estado predomina un fenotipo contráctil, caracterizado por una alta expresión de proteínas contráctiles tales como α -actina del músculo liso (α -SMA), la cadena pesada de β -miosina, proteína de músculo liso 22 (SM22), h-caldesmona y calponina.¹⁴ Gracias a este repertorio específico de proteínas, las CMLV pueden llevar a cabo el proceso contráctil. Además, en este estado cuentan con una baja capacidad proliferativa y migratoria, es decir, están totalmente especializadas en su rol contráctil. Sin embargo, las CMLV también tienen una alta plasticidad y bajo ciertas condiciones pueden variar de fenotipo, desdiferenciándose. Esta capacidad de cambio permite respuestas fisiológicas durante varios procesos celulares como en la angiogénesis embrionaria, neovascularización y reparación del tejido vascular.¹⁵

Los fenotipos desdiferenciados se caracterizan por ser proliferativo/migratorio y sintético. En el fenotipo proliferativo/migratorio las CMLV incrementan su tasa de migración y proliferación, y disminuyen la expresión de proteínas contráctiles. Por ejemplo, durante una lesión vascular se libera el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual se une al receptor en la membrana de las CMLV incrementando su proliferación y migración. Otro fenotipo encontrado es el sintético, caracterizadas por presentar un gran aparato de Golgi y retículo endoplásmico, que permiten el aumento de la síntesis de componentes de la matriz extracelular como el colágeno.^{16,17}

Estos cambios en el fenotipo de las CMLV hacia la proliferación/migración y síntesis de matriz extracelular son parte del denominado **remodelado vascular**, un evento clave en el inicio y desarrollo de las ECV.¹⁸

1.7. Remodelado vascular

Se le llama remodelado vascular a los cambios adaptativos estructurales y funcionales en la vasculatura en respuesta a estímulos fisiológicos y/o patológicos. Cambios crónicos en la fuerzas hemodinámicas, respuestas inflamatorias y cambios en los componentes de la matriz extracelular son algunos de los agentes que inducen la adaptación vascular.¹⁹

En la figura 2 se aprecian algunos ejemplos de remodelado vascular. Incrementos en la presión arterial pueden aumentar el ancho de la pared vascular, por un aumento en la masa muscular caracterizado por la reorganización de las CMLV. Estas células son capaces de migrar y proliferar incrementado el grosor de la arteria, y como consecuencia aumentar la resistencia periférica. Por otra parte, cambios constantes en el flujo sanguíneo pueden variar el diámetro del lumen del vaso, induciendo un remodelado por dilatación vascular sostenida en el tiempo. Por último, una lesión vascular puede promover una respuesta regenerativa asociada a eventos trombóticos, migración y proliferación de CMLV, producción de matriz extracelular e infiltración de células inflamatorias.²⁰

El estrés por incremento del flujo genera una fuerza friccional ("shear stress") sobre la superficie endotelial, generando una respuesta secretora sobre las células endoteliales, incrementando la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas, lo que finalmente promueve la vasodilatación. Cuando esta respuesta es permanente, se produce un remodelado principalmente vía dos procesos: arteriogénesis y angiogénesis. La arteriogénesis consiste en el incremento del diámetro lumen del vaso con el objetivo de disminuir la resistencia al flujo, y normalizar la hemodinámica. Otra forma de arteriogénesis es la formación de una circulación colateral por reensamblaje arterial, es decir, por reorganización de los vasos ya existentes (Figura 3).²¹ Por último, la angiogénesis es un proceso inducido por hipoxia que resulta en la formación de nuevos capilares sanguíneos. La disminución del oxígeno induce la liberación de VEGF (factor

de crecimiento vascular endotelial) por las células endoteliales, promoviendo la migración y proliferación de las CMLV, y formación de nuevos capilares.²¹

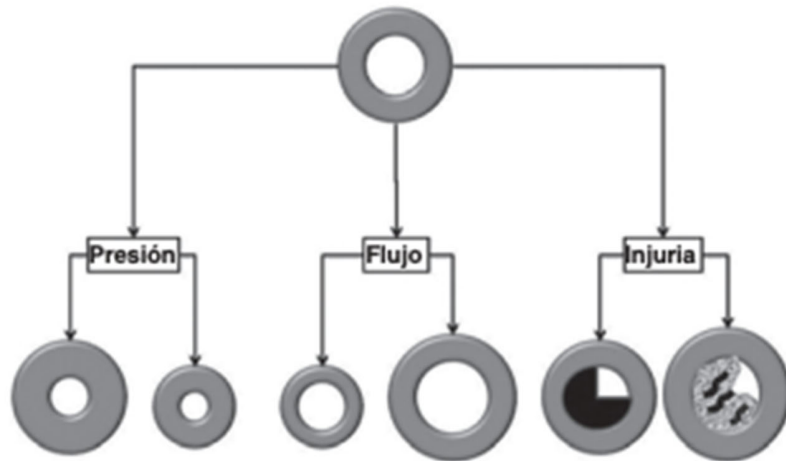


Figura 2. Principales tipos de remodelad vascular.

Incrementos en la presión sanguínea pueden inducir un tipo de remodelado por aumento del grosor de la pared arterial. Incrementos en el flujo sanguíneo produce un remodelado por dilatación vascular. Por último, un daño vascular puede generar la formación de trombos o placas de ateromas. Imagen reproducida de Renna *et al.*²⁰

El remodelado vascular puede tener consecuencias importantes en el funcionamiento del vaso, ya que puede aumentar la rigidez de la pared vascular afectando la capacidad vasodilatadora, y reduciendo la función vascular. Además, una adaptación de los vasos puede generar consecuencias graves en el funcionamiento del corazón, ya que, al no poder regularse la presión y flujo sanguíneo de forma periférica, el corazón puede someterse a eventos de remodelado, disfunción, y pérdida de la capacidad contráctil.²² De esta forma, mantener un buen estado de la vasculatura es un evento clave en el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular.

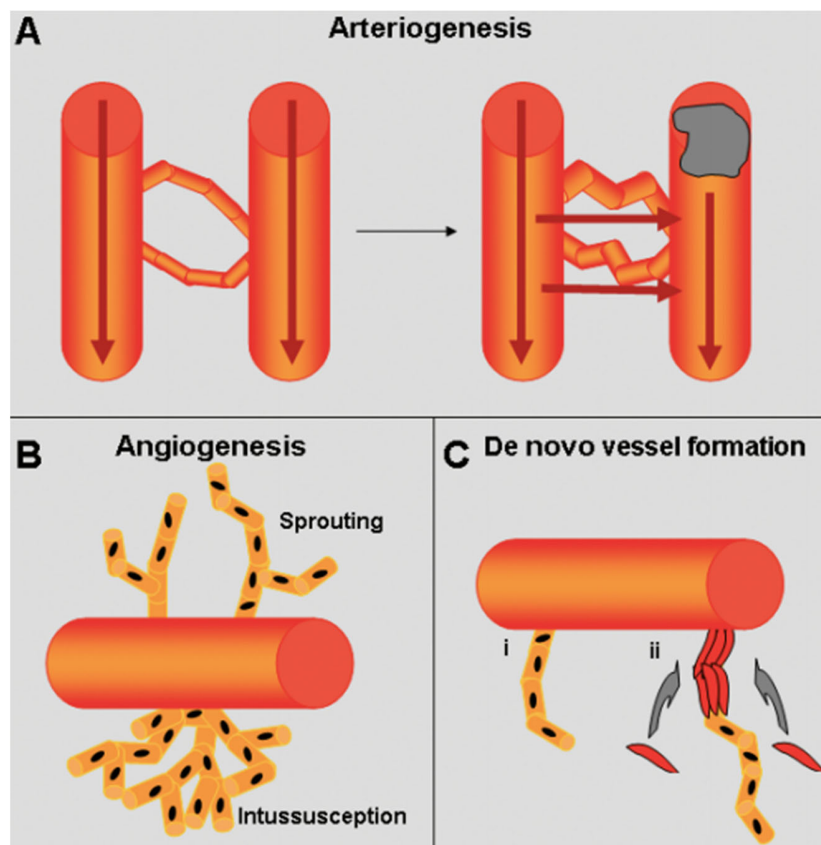


Figura 3. Arteriogénesis y angiogénesis.

(A) Arteriogénesis es un proceso de remodelado de arterias preexistentes a través del agrandamiento de la pared vascular, lo que genera un mecanismo regulatorio principalmente por incremento del lumen. (B) La angiogénesis es la formación de nuevos capilares desde un vaso ya existente, conduciendo a un reordenamiento de la estructura, (C) o por la formación de vasos *de novo* a través del reclutamiento de CMLV, lo que genera una regulación de la resistencia por incremento del número de vasos. Imagen reproducida de Heil *et al.*²¹

1.8. Efecto del ejercicio físico en las ECV

Existen diversos estudios que evidencian los múltiples beneficios que tiene la actividad física en la salud y bienestar de las personas. La práctica regular de actividad física es una estrategia bastante establecida para prevenir el desarrollo y progresión de las ECV. Esto debido a la reducción de varios factores de riesgo además del sedentarismo como la hipertensión, la obesidad y la diabetes. Además, la práctica regular de ejercicio mejora el funcionamiento del sistema vascular, incrementando la distribución de oxígeno a los tejidos y reduciendo la cantidad

de lípidos circulantes.^{23,24} Sin embargo, los efectos funcionales del ejercicio sobre la vasculatura no se comprenden del todo y se estima que dependen de la intensidad y frecuencia de éste.²⁵

1.9. Ejercicio y remodelado vascular

Durante la realización de actividad física existe un aumento en la demanda energética por la musculatura, generando un aumento del flujo de sangre a las extremidades. El incremento considerable del "shear stress" sobre el endotelio por aumento del flujo, activa la respuesta vasodilatadora.²⁶ Tal como se describió en el tópico número 1.7, cuando este evento es sostenido en el tiempo puede producir remodelado vascular.

A nivel celular, el remodelado vascular durante el ejercicio se genera por el proceso de arteriogénesis, un proceso caracterizado por el cambio de fenotipo de las CMLV desde el estado contráctil al migratorio/proliferativo, y sintético. Como consecuencia, se incrementa el tamaño o diámetro de los vasos para regular la resistencia al flujo. Por otra parte, también se activa la formación de nuevos capilares sanguíneos por angiogénesis; permitiendo una mayor perfusión e irrigación en la musculatura.²¹

En efecto, se ha descrito que el entrenamiento aeróbico incrementa en el tamaño y diámetro de las arterias de conductancia respecto a controles sedentarios.²⁷ A pesar de esto, los deportistas siguen teniendo una mejor capacidad de vasodilatación. Una de las hipótesis es que la función endotelial de los deportistas logran una especie de normalidad debido al remodelado vascular.²⁸ Sin embargo, los efectos de este remodelado sobre la función vascular aún requieren mayor investigación.

1.10. Ejercicio físico y mioquinas

Las mioquinas son citoquinas o proteínas pequeñas solubles, sintetizadas y liberadas por células de la musculatura esquelética en respuesta al ejercicio físico. Una vez secretadas pueden ejercer su acción de forma endocrina, paracrina y/o autocrina en diferentes órganos como el hígado, tejido adiposo, músculo esquelético, entre otros. De hecho, los beneficios que tiene el ejercicio en nuestro organismo son en gran parte debido a la acción de las mioquinas.²⁹

Dentro de las mioquinas más conocidas encontramos a la irisina, miostatina, folistatina, decorina e interleuquina-6 (IL-6). IL-6 fue la primera mioquina en ser descubierta, ya que en el año 2000 se demostró que el músculo esquelético produce grandes cantidades de IL-6 luego de un ejercicio físico prolongado.³⁰

1.11. Interleuquina-6

IL-6 es una citoquina de 21-26 kDa bastante conocida por su rol inmunoregulador en las respuestas inmunes innata y adaptativa. Está involucrada en el desarrollo, crecimiento, y activación de células del sistema inmune y en la ejecución de la respuesta inflamatoria.³¹ En estados iniciales de una infección o daño tisular, IL-6 es producida rápidamente contribuyendo a la estimulación de la respuesta de fase aguda a través de la síntesis de proteína C reactiva (PCR), la activación de proteínas del sistema del complemento y de la cascada de coagulación. Además, puede regular la termogénesis corporal actuando como pirógeno endógeno, estimular el crecimiento de precursores hematopoyéticos, y promover la diferenciación y maduración de linfocitos T y B.³²

Por otra parte, IL-6 también tiene efectos antiinflamatorios, ya que al comportarse como mioquina y liberarse durante el ejercicio, induce la secreción de citoquinas antiinflamatorias como interleuquina-10 (IL-10) e IL-1ra (agonista del receptor de interleuquina-1), y disminuye la secreción de citoquinas proinflamatorias como interleuquina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α).³³ Del mismo modo, IL-6 mejora el metabolismo de la glucosa, ya que aumenta la captación de glucosa periférica y producción de glucosa hepática durante el ejercicio, y actúa como un activador de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en el músculo esquelético.³⁴

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.

1.12. Señalización de IL-6

La señalización clásica de IL-6 comienza con la interacción de esta proteína con dos proteínas en la membrana plasmática: el receptor de IL-6 (IL-6R) y la glicoproteína de membrana gp130.³⁵ La primera interacción se produce entre IL-6 y IL-6R, donde se forma un complejo de

alta afinidad pero que no puede transducir la señal por sí solo. Para que se active la señalización, el complejo IL-6/IL-6R se une a gp130, una proteína con expresión ubicua en todas las células, y que posee un dominio citoplasmático de 277 aminoácidos con varios motivos fosforilables y de andamiaje donde se puede transducir la señal.³⁶

El complejo IL-6/IL-6R/gp130 activa a una tirosina quinasa no receptora, la quinasa Janus (JAK), y fosforila a gp130 en los residuos de tirosina con motivos YXXQ. La fosforilación de gp130 y la autofosforilación de JAK, genera sitios de reclutamiento para otras proteínas con dominios de unión SH2, como el factor de transcripción STAT3, que es asociado al crecimiento y proliferación celular. La proteína JAK fosforila a STAT3 induciendo su translocación al núcleo y activación de la transcripción génica de varias citoquinas como IL-1 β e IL-8, y quimioquinas como CCL2, CCL3, y CCL5, que estimulan la proliferación y migración celular (Figura 4).^{37,38}

Por otra parte, en condiciones basales, la expresión de IL-6R está restringida solo a algunos tipos celulares como hepatocitos, macrófagos y algunos leucocitos, por lo que no todas las células pueden responder al estímulo de IL-6.³⁶ Sin embargo, existe una forma de ampliar el espectro de células que responden a IL-6 a través de una trans-señalización. Esta vía involucra la unión de IL-6 a una versión soluble de IL-6R (sIL-6R), que se forma por un corte proteolítico por desintegrasa y metaloproteinasa 17 (ADAM17) o puede generarse por corte y empalme alternativo de su gen. Este receptor soluble se une a IL-6 circulante, y forma un heterodímero con gp130 en la membrana, desencadenando la activación de gp130. La activación de la señalización de IL-6 induce la expresión de un regulador negativo de la vía, SOCS. Esta proteína puede actuar como una ubiquitina ligasa. Además, puede interactuar directamente con JAK y bloquear su actividad catalítica.³⁹ Por otra parte, la señalización también puede bloquearse a través de la formación de una versión soluble de gp130, sgp130. La unión de sgp130 al complejo IL-6/IL-6R desplaza o impide la interacción con gp130 en la membrana deteniendo el inicio de la señalización (Figura 4).⁴⁰

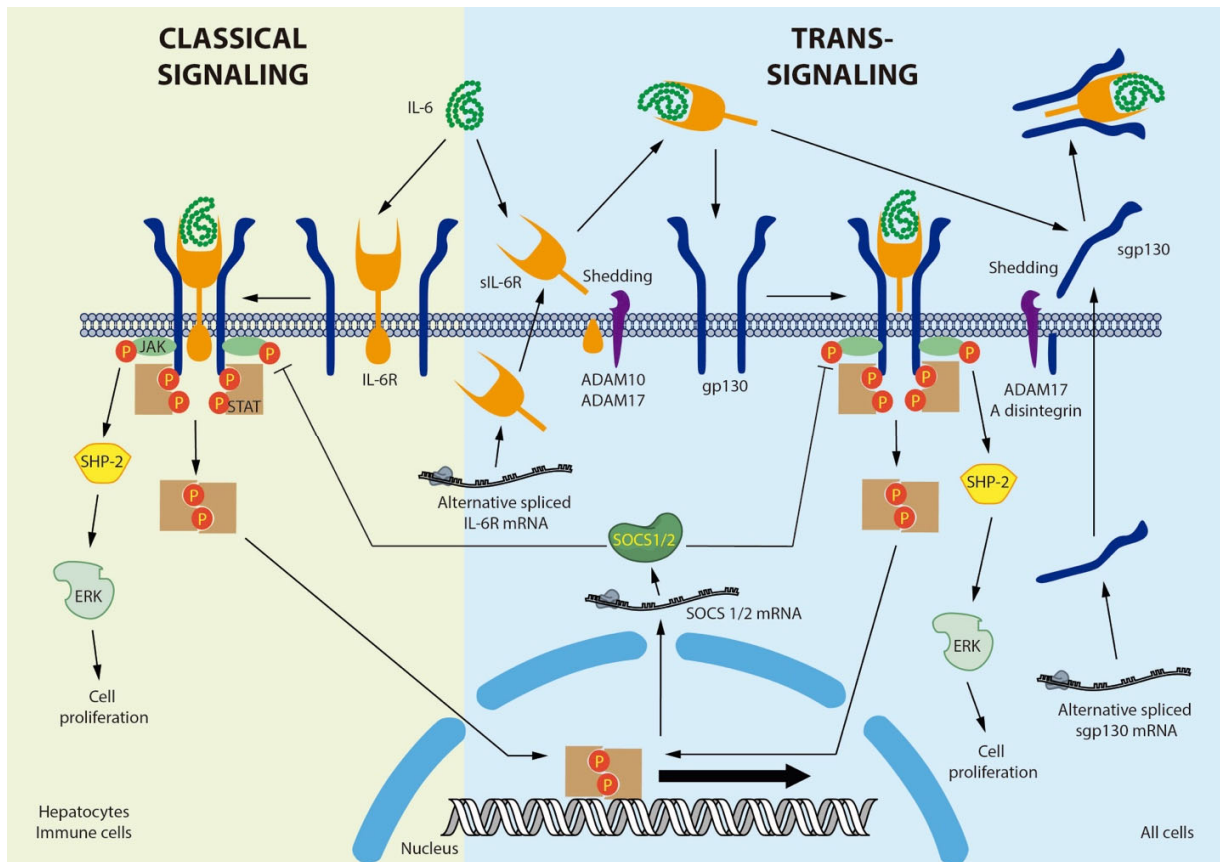


Figura 4. Señalización de IL-6.

Existen dos vías de señalización de IL-6: la señalización clásica y la trans-señalización. En la señalización clásica, IL-6 se une al receptor de membrana, IL-6R, promoviendo la proliferación celular a través de la activación de la vía MAPK. La trans-señalización involucra la formación de una versión soluble del receptor, sIL-6R, generada por el corte proteolítico, o corte y empalme alternativo de su mRNA. La regulación negativa de ambas vías es por medio de la activación de SOCS1/2 (supresor de la señalización de citoquina 1 y 2), y exclusivamente de la trans-señalización por la producción de una versión soluble de gp130, sgp130. Imagen reproducida de Villar *et al.*⁴¹

Así, dependiendo de la expresión de IL-6R y del tipo celular, IL-6 presenta dos vías de señalización por las cuales ejercer su acción. Sin embargo, los efectos diferenciales de estas vías aún no están descritos del todo.

1.13. Regulación de los niveles de IL-6 durante el ejercicio

En condiciones normales, los niveles circulantes de IL-6 están en un rango de concentración que va entre 1 a 10 pg/mL, demostrando que el músculo en reposo tiene una baja

expresión de IL-6.⁴² Durante el ejercicio, la síntesis y secreción de IL-6 se produce en las fibras musculares esqueléticas, incrementando los niveles hasta 100 veces sobre el nivel basal, y disminuyendo rápidamente cuando este finaliza.^{43,44} Ejercicios intensos y prolongados como el ciclismo o las corridas, que involucran el movimiento de varios músculos, son los que más incrementos producen.⁴⁵

Por otra parte, sIL-6R se encuentra en concentraciones de 30-70 ng/mL en el suero humano.^{46,47} En la circulación, debido a los altos niveles plasmáticos de sIL-6R respecto a IL-6, básicamente todo el IL-6 se une al receptor soluble y existe como complejo IL-6/sIL-6R, incrementando la vida media de IL-6.⁴⁷ Del mismo modo, se ha demostrado que el ejercicio físico, además de aumentar los niveles de IL-6, incrementa el sIL-6R y por ende el complejo IL-6/sIL-6R.⁴¹ Como consecuencia, los tejidos aumentan la sensibilidad a IL-6, ya que ahora podrán activar la trans-señalización.⁴¹

Por otra parte, luego de un ejercicio prolongado, los niveles de IL-6 aumentan de forma transitoria mientras que sIL-6R incrementa persistentemente, lo que se relacionaría con la fatiga en reposo y el estado de ánimo post actividad física.⁴⁸ Este último antecedente sugiere que sIL-6R puede tener una función independiente o diferente a la señalización clásica de IL-6.

Las acciones de la trans-señalización de IL-6 no son del todo claras. Sin embargo, en el músculo esquelético el complejo IL-6/sIL-6R estimula el transporte de glucosa y aumenta la fosforilación de AMPK, un importante regulador del metabolismo celular activado por acción de muchas mioquinas.⁴⁹

1.14. Regulación del metabolismo vía AMPK

AMPK es una Ser/Thr quinasa bastante conservada, considerada como el principal regulador del metabolismo y estado redox en las células. Es capaz de integrar señales hormonales y nutricionales manteniendo un correcto balance energético. Esta proteína es un complejo heterotrimérico, formado por una subunidad catalítica α , una subunidad reguladora β que contiene un dominio de unión a glicógeno, y una subunidad γ con dominios cistationina- β -sintasa de unión a AMP. Las tres subunidades son necesarias para su activación. A su vez, en humanos

cada subunidad es codificada en dos a tres genes distintos, existiendo 12 posibles combinaciones de α , β y γ .^{50,51}

Se le considera como un regulador energético pues AMPK puede sensor la razón AMP/ATP en las células. De esta manera, puede activarse en condiciones que aumenten el consumo de ATP como el ejercicio, la privación de nutrientes, isquemia e hipoxia. Así, aumentos en la razón AMP/ATP permiten la unión de AMP a la subunidad γ , generando un cambio conformacional, exposición y autofosforilación del dominio de activación de la subunidad catalítica α (Thr172). De la misma forma, AMPK puede ser activada por quinasas como LKB1 (quinasa hepática B1) y CaMKK β (quinasa de la quinasa activada por calcio y calmodulina β), las que también fosforilan la Thr172 de la subunidad α .⁵²

Dentro de sus funciones más destacadas se encuentra el favorecer el transporte de glucosa a través del aumento de GLUT1 en la musculatura esquelética (efecto sensibilizador de insulina), la biogénesis mitocondrial por el aumento de la proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas, PGC-1 α , la inhibición de la lipogénesis y el aumento de la β -oxidación de ácidos grasos por inhibición de acetil CoA carboxilasa, ACC.⁵³

1.15. Regulación del metabolismo vía IL-6

Varios estudios han establecido que el ejercicio induce un aumento en la actividad de AMPK en hígado, tejido adiposo y músculo esquelético.^{54,55} Además, se ha demostrado que IL-6 es un potente activador de AMPK en el músculo esquelético y tejido adiposo tanto *in vitro* como *in vivo*, y como consecuencia, aumenta la sensibilidad a la insulina y captación de glucosa por parte de estos tejidos.⁵⁶ Un tratamiento agudo de IL-6 en células musculares esqueléticas de rata aumenta la translocación del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana.⁵⁷ Además, un dominante negativo para AMPK anula los efectos de IL-6 sobre la captación periférica de glucosa, sugiriendo que la acción de IL-6 sobre el metabolismo depende de la acción de AMPK.^{57,58} Del mismo modo, ratones C57 knockout para IL-6 presentan una menor activación de AMPK y ACC en el tejido adiposo y musculatura esquelética.⁵⁹ Así, una deficiencia genética de IL-6 es asociada a una menor actividad de AMPK durante el ejercicio.

1.16. Influencia de IL-6 en los fenotipos de las CMLV

Como describimos anteriormente, las CMLV pueden presentar varios fenotipos. Normalmente, en un individuo sano predomina el fenotipo contráctil, el cual permite que la vasculatura pueda responder mediante contracción/relajación a los cambios de flujo y presión sanguínea. En enfermedades como la aterosclerosis las CMLV cambian a un fenotipo desdiferenciado, caracterizado por un aumento de la migración y proliferación de las CMLV, contribuyendo a la formación de la placa de ateroma.^{60,61}

A modo general, los receptores para citoquinas o factores de crecimiento, como el receptor de PDGF o IL-6R interactúan con integrinas, un tipo de receptor en contacto directo con la matriz extracelular, iniciando la formación de adhesiones focales, que son complejos proteicos que dirigen la organización y polimerización de filamentos de actina, y posterior migración celular. En cuanto a la señalización, las integrinas son proteínas de transmembrana que sensan las señales del medio y ejecutan señales intracelulares para el movimiento del citoesqueleto.⁶² Para esto una quinasa de adhesiones focales FAK, fosforila a proteínas como paxilina localizadas en puntos focales. Esta fosforilación permite el desplazamiento de los filamentos de actina retrayendo o impulsando el movimiento de las células, es decir, conectan de manera física la matriz extracelular con el citoesqueleto de las células (estructuras protéticas que le otorgan soporte a las células y los tejidos). Por ello, la fosforilación de FAK en Tyr397 por tirosinas quinasa induce su activación y posterior formación de adhesiones focales.⁶³ De esta forma, la fosforilación de FAK en este residuo, es un indicador de activación de la enzima y se correlaciona con la migración celular.

En condiciones inflamatorias, se describió que la activación de TLR-4 en las CMLV induce la secreción de IL-6 y migración celular, y la utilización de un anticuerpo neutralizante para IL-6 anula los efectos migratorios.⁶⁴ Otro trabajo muestra que en el contexto de la aterosclerosis, IL-6 estimula la migración de las CMLV a través de la fosforilación de FAK.⁶⁵ De la misma forma, se describió que IL-6 induce la migración de las CMLV de manera dosis dependiente.⁶⁶

Sin embargo, no existen estudios que describan el efecto de la trans-señalización en esta activación de la migración celular. Sin duda, queda definir el contexto de activación y las vías de señalización involucradas en esta respuesta migratoria de las CMLV.

1.17. Resumen

Las CMLV son componentes esenciales de la pared vascular cuya función es regular el diámetro y la distensibilidad arterial. Su alta plasticidad les permite pasar de estados diferenciados (donde predomina un fenotipo contráctil) a estados desdiferenciados (donde adquieren la capacidad de migrar y proliferar). Un aumento en el porcentaje de células con un fenotipo desdiferenciado se ha implicado como un paso importante en la disfunción vascular.

A su vez, el remodelado vascular puede ser producido por varios estímulos, algunos patológicos como la acumulación y oxidación de lípidos en la arteria; y otros fisiológicos como la práctica regular de actividad física.

El ejercicio físico promueve un tipo de remodelado vascular que se caracteriza por no presentar fibrosis ni infiltración de células inmunes, y es generado a través de la acción de factores de crecimiento como el PDGF y VEGF, que incrementan la migración y proliferación de las CMLV; y la angiogénesis.

Por otra parte, se ha demostrado que IL-6 es liberada durante el ejercicio físico, donde aparecen nuevas acciones como mioquina actuando en respuestas antiinflamatorias y regulando el metabolismo energético a través de AMPK. Aún no está clara la vía de señalización involucrada en sus acciones como mioquina. Sin embargo, una versión soluble del receptor (sIL-6R) también aumenta durante el ejercicio físico, ampliando el espectro de células capaces de responder a IL-6, incluidas las CMLV. A pesar de esta información, hasta la fecha son pocos los trabajos que describen los efectos de la trans-señalización de IL-6, y son aún menos los que estudian sus efectos sobre los fenotipos de las CMLV y el remodelado vascular inducido por ejercicio.

En el presente trabajo, nos propusimos determinar los efectos de la trans-señalización en los fenotipos de las CMLV, con el objetivo de explorar el mecanismo por el cual los atletas presentan un remodelado diferente al patológico. Además, también incluimos evaluar los efectos de la trans-señalización en el metabolismo energético a través de la activación de AMPK, con el fin de atribuir los efectos benéficos del ejercicio a la liberación de sIL-6R.

2. HIPÓTESIS

El receptor soluble de interleuquina-6 (sIL-6R) previene la disminución de las proteínas contráctiles, el incremento de la síntesis de colágeno, y la migración y proliferación de las células musculares lisas vasculares (CMLV) inducidas por interleuquina-6 (IL-6), a través de un mecanismo dependiente de la activación de la quinasa activada por AMP (AMPK).

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de sIL-6R sobre los niveles de proteínas contráctiles, síntesis de colágeno, migración y proliferación, y la activación de AMPK inducido por IL-6 en las CMLV A7r5.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de IL-6 en los niveles de proteínas contráctiles calponina, SM22 y α -SMA, síntesis de colágeno I, migración y proliferación de las CMLV A7r5.
2. Evaluar el efecto de sIL-6R en la en los niveles de proteínas contráctiles calponina, SM22 y α -SMA, síntesis de colágeno I, migración y proliferación de las CMLV A7r5 inducidas por IL-6.
3. Evaluar el papel de AMPK en los efectos de sIL-6R en las CMLV A7r5.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de músculo liso vascular A7r5, obtenida de la arteria aorta de embriones de rata (CRL-1444, ATCC, EEUU). Las células se cultivaron en un medio de cultivo Dulbecco Eagle Modificado rico en glucosa suplementado con NaHCO_3 (1,2 $\mu\text{g/L}$), suero fetal bovino inactivado por calor (SFB; 10%) y piruvato (110 g/mL), a 37°C en una atmósfera humedecida con 5% de CO_2 en aire. Las células se obtuvieron a un 80% de confluencia soltándolas con una solución de tripsina (0,3%) en una solución buffer fosfato con EDTA 0,025% libre de Ca^{2+} - Mg^{2+} . Los experimentos se realizaron entre los pasajes 3 al 8 (Tesis pregrado Ignacio Norambuena, 2015).

5.2. Preparación de extractos de proteínas totales

Las células se sembraron y cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80-90% y se le cambió el medio a uno suplementado con 2% SFB. Una vez finalizado los diferentes estímulos, se lavaron tres veces con solución de amortiguador fosfato salino PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 10 mM; KH_2PO_4 2 mM; pH 7,4) fría y luego se lisaron con 50 μL de amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1% [v/v]; tritón X-100 1% [v/v]) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). El homogenizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante a través del método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU). Por último, se desnaturalizó el extracto a 100°C por 5 min en amortiguador SDS-PAGE 4x (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; glicerol 32% [v/v]; 2-mercaptoetanol 20% [v/v]; SDS 9,2% [p/v]; azul de bromofenol 0,02% [p/v]). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.^{67, 102}

5.3. Niveles proteicos por western blot

La separación de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de 8-15% dependiendo de la proteína a analizar. En todos los casos, se cargaron alrededor de 30 μg de extracto proteico total. Una vez realizada la electroforesis, las

proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas se incubaron con solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente y, luego, se incubaron toda la noche con los anticuerpos primarios de la tabla 1. Luego, las membranas se lavaron 4 veces por 10 min en TBS 1x-Tween-20 al 0,1% y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o de ratón. Para la detección, las membranas se incubaron durante 1 min en la solución quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL. Para revelar y digitalizar las imágenes se utilizó el equipo Syngene, y finalmente las imágenes se procesaron mediante el programa UN-SCAN-IT gel. Los datos densitométricos se normalizaron respecto al control de carga GAPDH o β -tubulina. Las proteínas fosforiladas se normalizaron con respecto a la proteína total, obteniendo una razón de la proteína fosforilada/proteína total.⁶⁷

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados.

Proteína	Peso Molecular (kDa)	Fuente	Dilución	Código
Colágeno α 1 tipo 1	220	Conejo	1:1000	CST #84336
FAK	125	Ratón	1:1000	SC-1688
p-FAK	125	Conejo	1:1000	CST #8556
gp130	102	Conejo	1:1000	Ab202850
PGC-1 α	91	Conejo	1:1000	NBP1-04676
β -tubulina	55	Ratón	1:5000	Sigma T-0198
AMPK	62	Ratón	1:1000	Ab80039
p-AMPK	62	Conejo	1:1000	Ab133448
α -SMA	42	Ratón	1:1000	Ab7817
Calponina	34	Conejo	1:1000	Ab46794
GAPDH	37	Conejo	1:5000	Sigma G-9545
SM22	22	Conejo	1:1000	Ab14106
Ciclina D1	34	Conejo	1:1000	Ab134175

5.4. Migración por ensayo de herida

A una placa de 60 mm en confluencia máxima se le realizó una “herida” con la ayuda de una punta de micropipeta. Las células se cultivaron en un medio de cultivo suplementado con bromo deoxiuridina 100 μ M para inhibir la proliferación celular. Luego, de realizar la estimulación, se realizó la captura de imágenes de manera periódica durante 0, 24 y 48 h, para finalmente comparar las imágenes y determinar el porcentaje de cierre de herida respecto a los controles. El análisis del % de cierre de herida se calculó $100 - ((\text{área de herida a las 24 o 48 h} / \text{área de herida a las 0 h}) * 100)$.⁶⁸

5.5. Ensayo de transwell

Para realizar este ensayo se utilizaron las cámaras de Boyden de 8 μ m de poro en placas de 24 pocillos (BD Biosciences). Se cultivaron 5.000 células en 100 μ L de medio con 2% de SFB en la cámara superior y se colocó 550 μ L de medio con 2% de SFB en la cámara inferior. Se colocó el estímulo en los dos compartimentos. Después de una incubación de 24 h, se removieron las células de la parte superior con un hisopo de algodón. Las células que migraron hacia la cámara inferior se fijaron durante 1 h con cristal de violeta y tras cuatro lavados con agua se cuantificó el número de células migradas mediante observación en el microscopio. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células estimuladas que migraron respecto a las células que migraron en la condición control.⁶⁷

5.6. Ensayo MTT

La actividad reductasa MTT se determinó en células sembradas en una placa de 96 pocillos con una densidad de 25.000 células/pocillo. El medio de cultivo se retiró tras el estímulo y se reemplazó por 100 μ L de reactivo MTT en concentración 0,25 mg/mL en medio de cultivo sin suplementar. Las placas se incubaron durante 4 h en condiciones estándar de cultivo y posteriormente se descartó el sobrenadante y se adicionó 100 μ L de DMSO para disolver el formazán. La absorbancia se midió a 560 nm en un espectrofotómetro.⁶⁸

5.7. Análisis estadístico

Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm error estándar de la media (EEM) de al menos tres experimentos independientes. Los datos con $n < 5$ se analizaron por una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido de un post test de Dunn. En los experimentos con $n < 5$ en los que se compararon dos condiciones, se utilizó una prueba no paramétrica Mann Whitney. En los ensayos de migración celular se realizó una prueba previa de normalidad Shapiro Wilk, y posteriormente se analizaron los datos por un ANOVA de una vía seguido de una prueba de múltiples comparaciones Holm Sidak. En todos los casos, se consideró un $*p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de la presencia de gp130 en CMLV A7r5

Como describimos en la introducción tanto la señalización clásica como la trans-señalización necesitan la presencia de gp130 en las células para activar su señalización. Publicaciones previas han descrito que la expresión de gp130 es bastante conservada en la mayoría de las células.⁶⁹ En este sentido y con el fin de caracterizar nuestro modelo se determinaron los niveles de expresión del co-receptor gp130 por western blot luego de la estimulación de las células A7r5 con sIL-6R o PDGF-BB por 48 h. El resultado es mostrado en la figura 5 donde no se observaron cambios en los niveles de gp130 luego de los tratamientos.

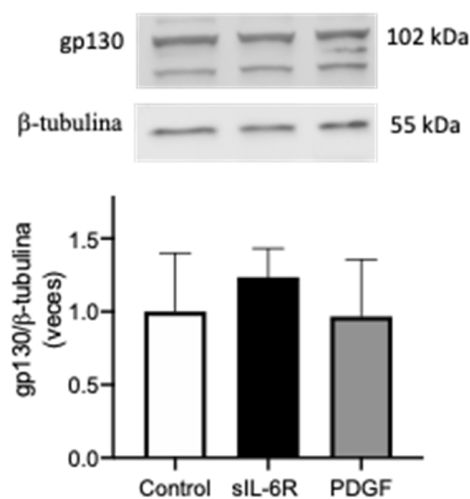


Figura 5. Niveles proteicos de gp130 en las CMLV A7r5.

Células A7r5 se trataron con sIL-6R (200 ng/mL) y PDGF-BB (20 ng/mL) por 48 h. Los niveles proteicos de gp130 se evaluaron por western blot. Los valores se normalizaron con el control de carga β-tubulina (n=5). Los datos son el promedio ± SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por una prueba de múltiples comparaciones Dunn. Sin cambios significativos.

6.2. Estudio del efecto de IL-6 y sIL-6R sobre el fenotipo de las CMLV A7r5

A pesar de que publicaciones previas han descrito que las CMLV expresan bajos niveles de IL-6,⁷⁰ algunos resultados describen que la estimulación de las CMLV con IL-6 induce la

migración y proliferación celular de las CMLV.^{71,72} De esta manera, los niveles existentes de IL-6R podrían ser suficientes para responder a la señalización clásica de IL-6. Además, un trabajo recientemente publicado describe que las CMLV derivadas de rata expresan niveles considerables de IL-6R.⁷³

6.2.1. Efecto de IL-6 y sIL-6 sobre la migración de CMLV A7r5

La desregulación de la capacidad migratoria en las CMLV es una característica importante en el remodelado vascular patológico asociado a la formación de la placa de ateroma.⁷⁴ Debido a esta capacidad migratoria, las células de la túnica media son capaces de desplazarse hacia la túnica íntima para la formación de la placa de ateroma. En este sentido, un aumento en la capacidad migratoria de las CMLV también podría ser un mecanismo relevante en el remodelado vascular observado en atletas.⁴¹

Con el objetivo de explorar este mecanismo, utilizamos el modelo *in vitro* de células A7r5, donde se evaluó la migración de las CMLV luego del tratamiento con IL-6 y PDGF-BB a través del ensayo de cierre de herida (Figura 6A) o por ensayo de transwell usando una cámara de Boyden (Figura 6B). Tal como se describió en estudios previos, el tratamiento con IL-6 indujo la migración de las CMLV. Sin embargo, la migración inducida por IL-6 fue de menor intensidad que aquella inducida por el estímulo positivo de migración, PDGF-BB (Figuras 6A-B).

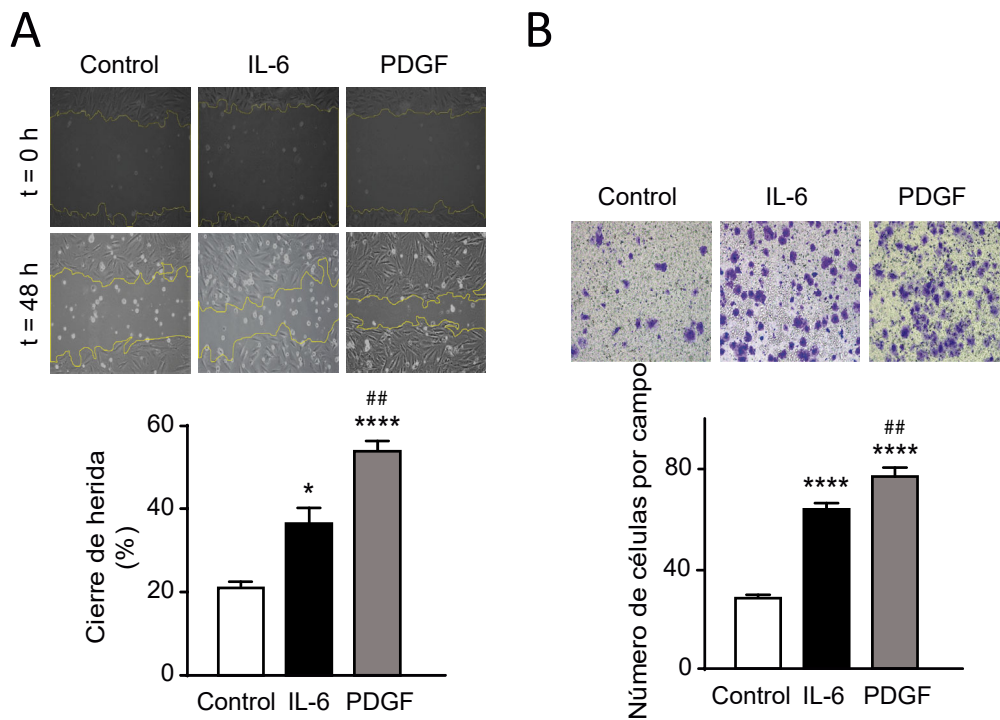


Figura 6. Efecto de IL-6 y PDGF-BB en la migración de las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de IL-6 o 20 ng/mL de PDGF-BB, y la migración celular se evaluó mediante (A) ensayo de cierre de herida o (B) ensayo de Transwell usando una cámara de Boyden. El cierre de la herida (%) se determinó después de 24 h y las células migradas por campo en la cámara Transwell se evaluó después de 4 h usando el software ImageJ (n=5). Los datos representan la media \pm SEM, donde previamente se realizó una prueba de normalidad Shapiro Wilk. Posteriormente los datos fueron analizados por un ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples Holm Sidak. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ vs control; ** $p < 0,01$ vs IL 6.

Para determinar si este mismo efecto se observaba cuando se activa la trans-señalización de IL-6, las células A7r5 se trataron simultáneamente con IL-6 y sIL-6R. Inesperadamente, el tratamiento con sIL-6R inhibió la migración inducida por IL-6 (Figura 7).

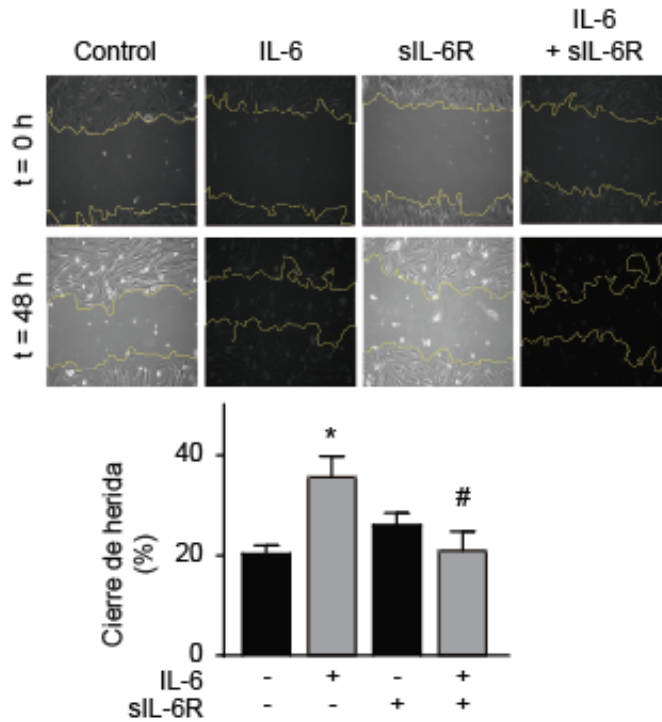


Figura 7. Efecto de IL-6 y sIL-6R en la migración de las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de IL-6, 200 ng/mL de sIL-6R, o 200 ng/mL de IL-6 + 200 ng/mL de sIL-6R, y la migración celular se evaluó mediante ensayo de cierre de herida. El cierre de la herida (%) se determinó después de 48 h (n=5). El panel superior muestra imágenes representativas y el panel inferior muestra la cuantificación. Los datos representan la media \pm SEM, donde previamente se realizó una prueba de normalidad Shapiro Wilk. Posteriormente los datos fueron analizados por un ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples Holm Sidak. * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,01$ vs IL-6.

Como una manera de explorar si este efecto era específico para IL-6, o bien era un mecanismo de inhibición para cualquier inductor de la migración de las CMLV A7r5, se procedió a evaluar el efecto que tendría sIL-6R sobre la migración inducida por PDGF-BB. Así, el tratamiento con sIL-6R inhibió la migración de las CMLV A7r5 inducida por PDGF-BB a las 24 h (Figura 8A) y a las 48 h (Figura 8B).

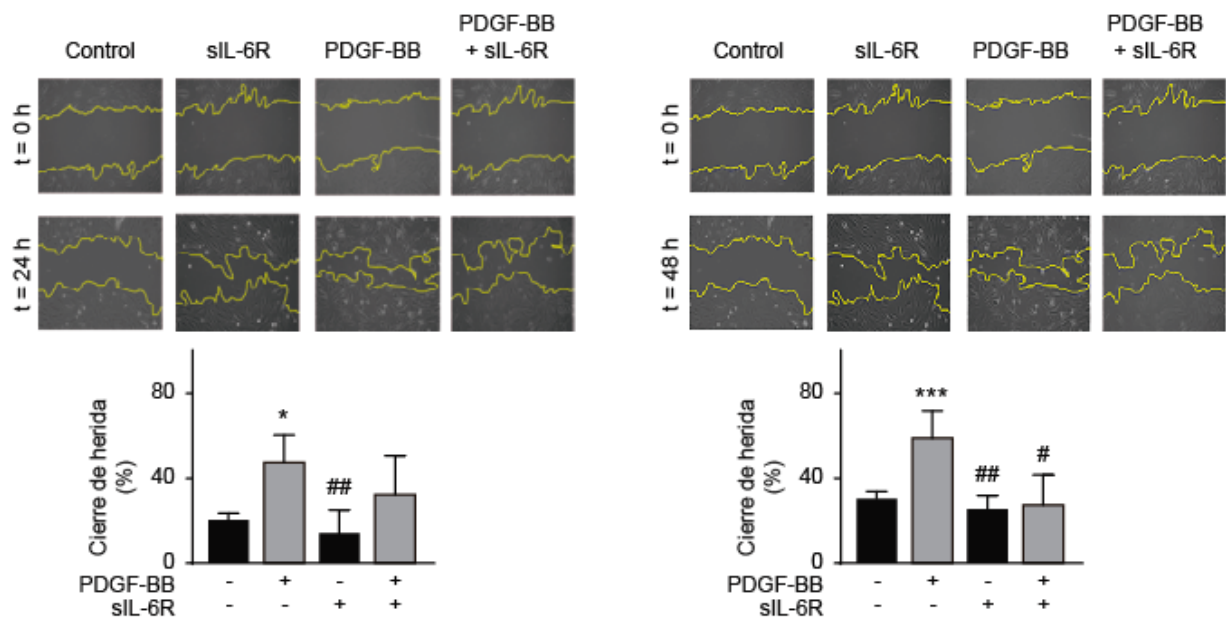


Figura 8. Efecto de PDGF-BB y sIL-6R en la migración de las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB, 200 ng/mL de sIL-6R, o 20 ng/mL de PDGF-BB + 200 ng/mL de sIL-6R, y la migración celular se evaluó mediante ensayo de cierre de herida. El cierre de la herida (%) se determinó después de (A) 24 h y (B) 48 h (n=5). Los paneles superiores muestran imágenes representativas y los paneles inferiores muestran las cuantificaciones. Los datos representan la media \pm SEM, donde previamente se realizó una prueba de normalidad Shapiro Wilk. Posteriormente los datos fueron analizados por un ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples Holm Sidak. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs control; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs IL-6.

Debido a que sIL-6R es capaz de inhibir la migración de las CMLV A7r5 inducida tanto por IL-6 como por PDGF-BB, se puede sugerir que IL-6 y PDGF-BB comparten los mismos mecanismos en la inducción de la migración. Como una forma de explorar esta posibilidad se ensayó los efectos de la coincubación de IL-6 y PDGF-BB sobre la migración de las CMLV A7r5. Los resultados muestran que la coincubación de IL-6 con PDGF-BB no incrementó la migración de las CMLV A7r5 respecto a PDFG-BB (Figura 9). Además, sIL-6R inhibió en la misma magnitud tanto la migración de las CMLV A7r5 inducida por PDGF-BB como aquella inducida por la mezcla IL-6 + PDGF-BB (Figura 9). Estos resultados sugieren que PDGF-BB y IL-6 utilizan mecanismos similares para inducir la migración de las CMLV.

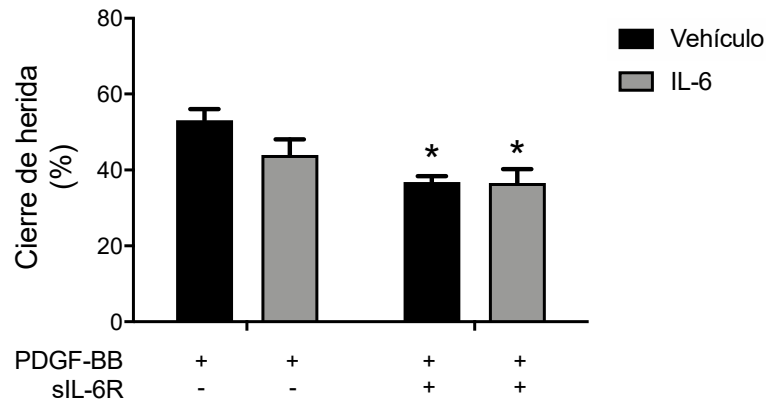


Figura 9. Efecto del cotratamiento de IL-6 con PDGF-BB y sIL-6R en la migración de las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 20 mg/mL de PDGF-BB, 20 mg/mL de PDGF-BB + 200 ng/mL de IL-6, 20 mg/mL de PDGF-BB + 200 ng/mL de sIL-6R, y 20 mg/mL de PDGF-BB + 200 ng/mL de IL-6 + 200 ng/mL de sIL-6R por 48 h. La migración se evaluó por ensayo de cierre de herida (n=6). La imagen muestra el % de cierre de herida, y los datos representan la media \pm SEM, donde previamente se realizó una prueba de normalidad Shapiro Wilk. Posteriormente los datos fueron analizados por un ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples Holm Sidak. * $p < 0,05$ versus PDGF-BB.

Para profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de sIL-6R sobre la migración, se determinaron los niveles de fosforilación de la proteína quinasa de adhesiones focales (FAK) cuya fosforilación en el residuo de tirosina Tyr397 es un conocido indicador de la activación de la migración celular. Su mecanismo de acción consiste generar sitios de reclutamiento para las proteínas que forman el complejo de adhesiones focales. Este evento es un paso inicial y clave para la dirección del movimiento celular, dándole curso al proceso a través de la formación de puntos focales de agrupaciones de proteínas (complejos proteicos). Posteriormente, se produce un movimiento de retracción que permite la migración de las células por propulsión y arrastre.⁶³

Para determinar si sIL-6R tenía un efecto en la formación de adhesiones focales a través de la activación de FAK, se realizó una curva dosis respuesta con diferentes concentraciones de sIL-6R (50, 100, 150 y 200 ng/mL). Luego del tratamiento, se determinaron los niveles de FAK fosforilada en Tyr397 por Western blot. Los resultados mostraron que desde

la concentración más baja de sIL-6R, se observaba una disminución significativa en los niveles de fosforilación de FAK. Esta disminución se mantenía al aumentar la dosis de sIL-6R (Figura 10).

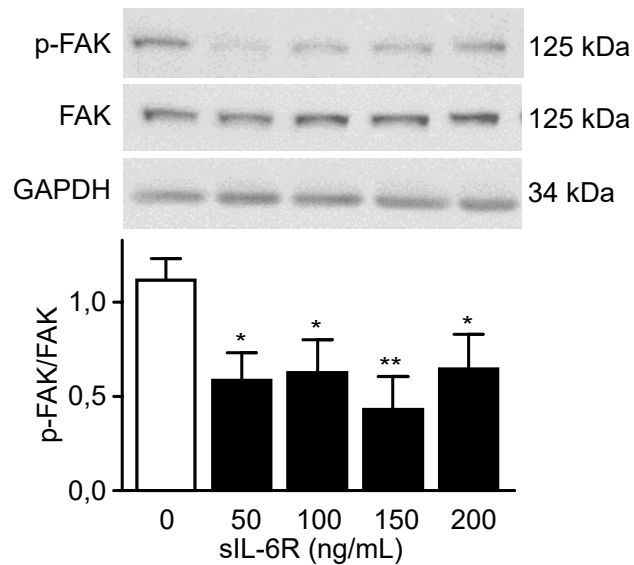


Figura 10. Efecto de sIL-6R sobre la fosforilación de FAK en CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con sIL-6R a 50, 100, 150 y 200 ng/mL por 1 h. La fosforilación de la quinasa de adhesiones focales en Tyr397 (p-FAK) y los niveles de FAK total se evaluaron por Western blot (n=5). Se utilizó GAPDH como control de carga. El panel superior muestra la imagen representativa y el panel inferior muestra la cuantificación de p-FAK normalizados por los niveles de FAK total. Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

A partir de este resultado, nos propusimos averiguar si este efecto en la fosforilación de FAK podía ser el responsable de inhibir la migración de las CMLV A7r5 inducida por PDGF-BB. Para ello, se trataron las células con PDGF-BB por 1 h, y posteriormente se determinó la fosforilación de FAK por western blot. Los resultados mostraron que la adición de sIL-6R en las células desdiferenciadas con PDGF-BB, disminuyó la fosforilación de FAK en comparación con la condición control con PDGF-BB (Figura 11).

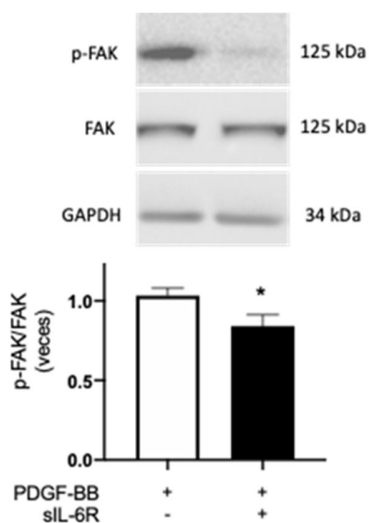


Figura 11. Efecto de sIL-6R sobre la fosforilación de FAK inducida por PDGF-BB.

Las CMLV A7r5 se trataron con 20 ng/mL PDGF-BB y 20 ng/mL PDGF-BB + 200 ng/mL de sIL-6R por 1 h. La fosforilación de la quinasa de adhesiones focales en Tyr397 (p-FAK) y los niveles de FAK total se evaluaron por Western blot (n=4). Se utilizó GAPDH como control de carga. El panel superior muestra la imagen representativa y el panel inferior muestra la cuantificación de p-FAK normalizados por los niveles de FAK total. Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Mann-Whitney. * $p < 0,05$ vs PDGF-BB.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que la acción inhibitoria de sIL-6R sobre la migración de las células A7r5 involucra la disminución de la fosforilación de FAK.

6.2.2. Efecto de IL-6 y sIL-6 sobre las proteínas contráctiles en CMLV A7r5

Otro de los cambios relevantes en la desdiferenciación de las VSMC es la disminución en el contenido de las proteínas contráctiles.¹³ Para evaluar el efecto de IL-6 sobre este parámetro, se trataron las células A7r5 con IL-6 y/o sIL-6R.

El tratamiento de las CMLV A7r5 con IL-6 por 24 h no cambió los niveles de las proteínas contráctiles α -SMA (Figura 12A) y calponina (Figura 12B). Como control positivo de este experimento, se utilizó PDGF-BB, un muy conocido inductor de desdiferenciación de las CMLV.⁷⁵ PDGF-BB indujo una disminución de los niveles proteicos de α -SMA y calponina (Figura 12).

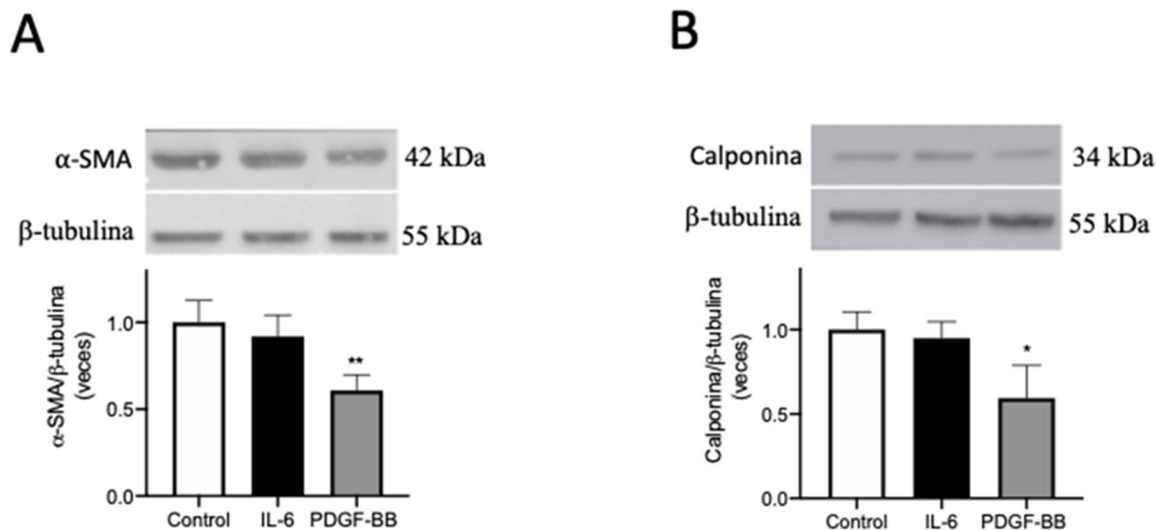


Figura 12. Efecto de IL-6 sobre los niveles de proteínas contráctiles en las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de IL-6 o 20 ng/mL de PDGF-BB durante 24 h. Los niveles de (A) α -actina de músculo liso (α -SMA) y (B) calponina se determinaron mediante Western blot (n=5). Se utilizó β -tubulina como control de carga. Los paneles superiores son imágenes representativas. Los paneles inferiores son las cuantificaciones. Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. *p <0,05; **p<0,01 vs control.

Para evaluar la trans-señalización, se procedió a incubar las células A7r5 con IL-6 + sIL-6R. El cotratamiento con IL-6 + sIL-6R tampoco indujo cambios en los niveles de α -SMA (Figura 13A), SM22 (Figura 13B) y calponina (Figura 13C).

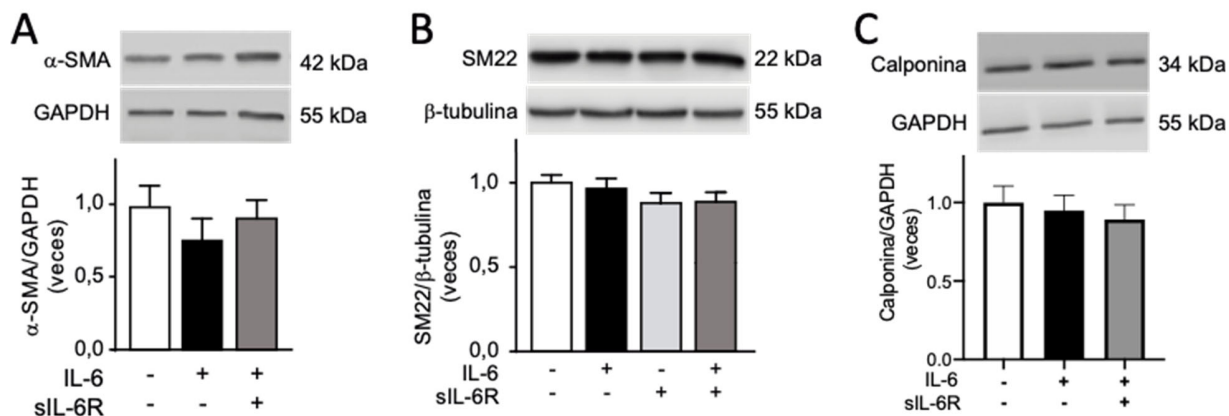


Figura 13. Efecto de IL-6 y sIL-6R sobre los niveles de proteínas contráctiles en las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de IL-6, 200 ng/mL de sIL-6R o 200 ng/mL de IL-6 + 300 ng/mL de sIL-6R durante 24 h. Los niveles de (A) α actina del músculo liso (α -SMA), (B) calponina, y (C) SM22 se determinaron mediante Western blot. Se utilizó GAPDH y β -tubulina como control de carga. Los paneles superiores son imágenes representativas. Los paneles inferiores son las cuantificaciones (n=4). Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. No se observaron diferencias significativas.

Posteriormente, se realizó un ensayo similar, pero exponiendo las células A7r5 a 48 h de tratamiento. En este tiempo el complejo IL-6/sIL-6R tampoco redujo los niveles de α -SMA, como sí lo hizo PDGF-BB (Figura 14A). Además, sIL-6R no tuvo ningún efecto sobre la disminución de α -SMA inducida por PDGF-BB (Figura 14B).

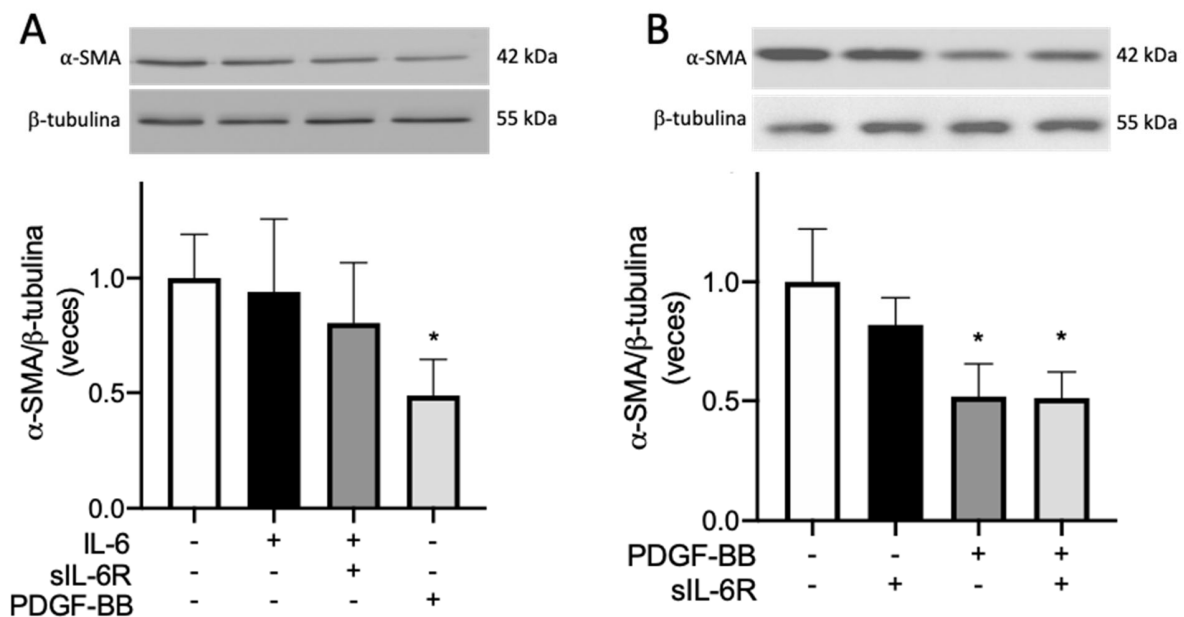


Figura 14. Efecto de IL-6, sIL-6R y PDGF-BB sobre los niveles de α -SMA en las CMLV A7r5 a las 48 h.

(A) Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de IL-6, 200 ng/mL de IL-6 + 200 ng/mL de sIL-6R, o 20 ng/mL de PDGF-BB durante 48 h. (B) Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de sIL-6R, 20 ng/mL de PDGF-BB, o 20 ng/mL de PDGF-BB + 200 ng/mL de sIL-6R durante 48 h. Los niveles de α actina del músculo liso (α -SMA) se determinaron mediante Western blot. Se utilizó β -tubulina como control de carga. Los paneles superiores son imágenes representativas. Los paneles inferiores son las cuantificaciones (n=6). Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. * $p < 0,05$ vs control.

De esta forma, a partir de estos resultados se puede inferir que tanto la señalización clásica, como la trans-señalización de IL-6 no modifican los niveles de las proteínas contráctiles α -SMA, calponina, y SM22 en las CMLV A7r5.

6.2.3. Efecto de IL-6 y sIL-6 sobre los niveles de colágeno I en CMLV A7r5

Otro de los fenotipos presentes en el remodelado vascular es el fenotipo sintético, caracterizado por un incremento del tamaño del aparato de Golgi, que finalmente permite un aumento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y los

proteoglicanos. Como consecuencia, la pared vascular se vuelve más rígida y fibrótica, alterando la capacidad funcional de las CMLV.⁸

Los resultados muestran que el tratamiento con IL-6 y/o sIL-6R por 48 h, no modificó los niveles proteicos de colágeno I (Figura 15).

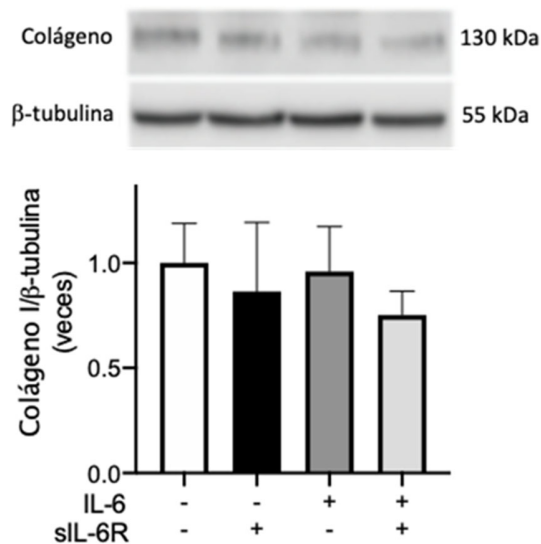


Figura 15. Efecto de IL-6 y sIL-6R en el contenido de colágeno I en las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de IL-6, y 200 ng/mL de IL-6 + 200 ng/mL de sIL-6R durante 48 h. Los niveles de colágeno I se determinaron mediante Western blot. Se utilizó β-tubulina como control de carga (n=4). Los datos son el promedio ± SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. No se observaron diferencias significativas.

Como mencionamos anteriormente, el PDGF-BB es un estímulo desdiferenciador para las CMLV.⁷⁶ En este contexto, probamos si sIL-6R a concentraciones similares a las liberadas durante el ejercicio físico tenía un efecto diferencial sobre las células, y era capaz de revertir la desdiferenciación inducida por PDGF-BB. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 16).

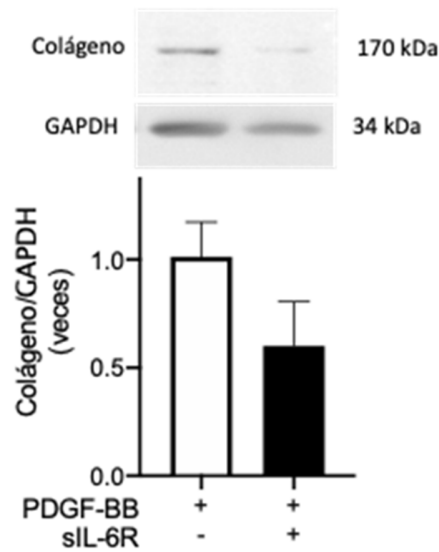


Figura 16. Efecto de PDGF-BB y sIL-6R en el contenido de colágeno I en las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB, y 20 ng/mL de PDGF-BB + 200 ng/mL de sIL-6R durante 48 h. Los niveles de colágeno I se determinaron mediante Western blot. Se utilizó GAPDH como control de carga (n=3). Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Mann-Whitney. No se observaron diferencias significativas.

Estos resultados permiten indicar que IL-6, tanto a través de la señalización clásica como la trans-señalización, no modifica el contenido de colágeno I, sugiriendo que IL-6 no modifica el fenotipo secretor de las CMLV A7r5. Sin embargo, se necesitan más replicas experimentales para estar seguros de esta afirmación.

6.2.4. Efecto de IL-6 y sIL-6 sobre la proliferación de CMLV A7r5

La proliferación de las CMLV también es otro de los fenómenos relevantes en el remodelado vascular asociado con patologías, particularmente en la formación de la placa de ateroma.⁷⁷

Los resultados muestran que el tratamiento con IL-6 no indujo proliferación de las CMLV A7r5, medido a través de la determinación de los niveles de ciclina D1 (Figura 17A), o a través del ensayo de MTT, que da cuenta de la cantidad de células vivas y enzimáticamente activas (Figura

17B). Los mismos resultados se reprodujeron cuando las células A7r5 se trataron con el complejo IL-6/sIL-6R (Figuras 16A-B).

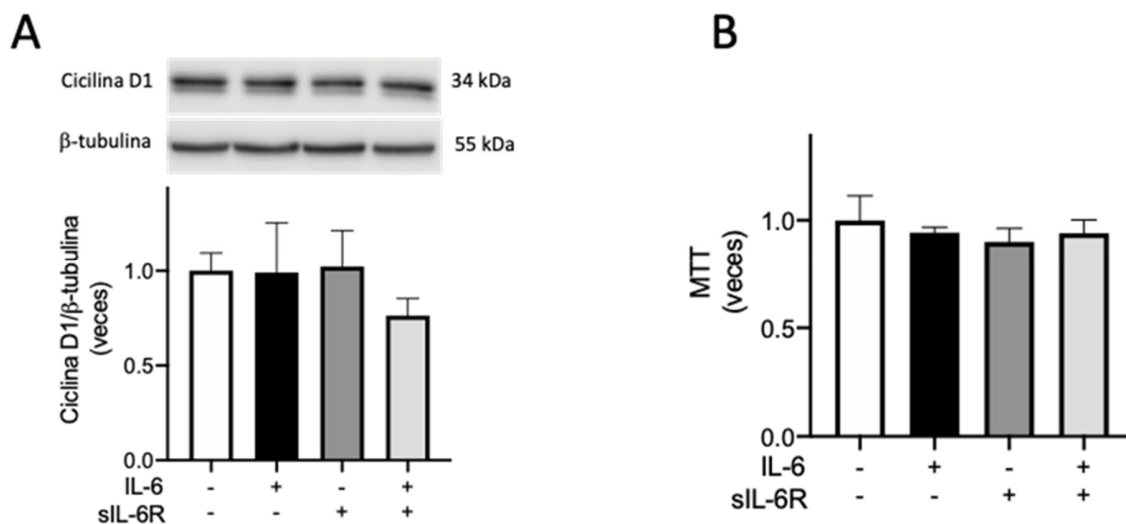


Figura 17. Efecto de IL-6 y sIL-6R en la proliferación de las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de IL-6, 200 ng/mL de sIL-6R o 200 ng/mL de IL-6 + 200 ng/mL de sIL-6R durante 24 h. (A) Los niveles de ciclina D1 se determinaron mediante Western blot. Se utilizó β-tubulina como control de carga. El panel superior es una imagen representativa. El panel inferior es la cuantificación (n=4). (B) Ensayo de MTT para evaluar número de células metabólicamente activas (n=4). Los datos son el promedio ± SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. No se observaron diferencias significativas.

Estos resultados sugieren que IL-6, tanto por la vía señalización clásica como la trans-señalización, no produjo cambios en los niveles de ciclina D1, ni en la actividad enzimática de las CLMV A7r5.

6.3. Estudio del efecto de sL-6R sobre la activación de AMPK en las CMLV A7r5

Uno de los mecanismos conocidos por el cual el ejercicio físico tiene efectos positivos en el metabolismo celular, es a través de la activación de AMPK, cuyas acciones son atribuidas a los efectos de varias mioquinas.⁷⁸ Además, se ha descrito que el ejercicio induce también un

incremento en los niveles plasmáticos de sIL-6R,⁴¹ sugiriendo que este receptor soluble también podría estar actuando como una mioquina, afectando el metabolismo de las CMLV.

6.3.1. Efecto de sIL-6R sobre la fosforilación de AMPK en CMLV A7r5

Con el objetivo de determinar si el sIL-6R tiene efectos en la activación de AMPK en las CMLV, se procedió a evaluar la fosforilación en Thr172, un conocido marcador de activación. Al realizar una curva dosis respuesta se observó que, a 1 h de tratamiento, sIL-6R indujo la fosforilación de AMPK a partir de los 100 mg/mL (Figura 18). Esta fosforilación fue equivalente a la inducida por 2 mM AICAR (Figura 18), un conocido activador de AMPK.⁷⁹

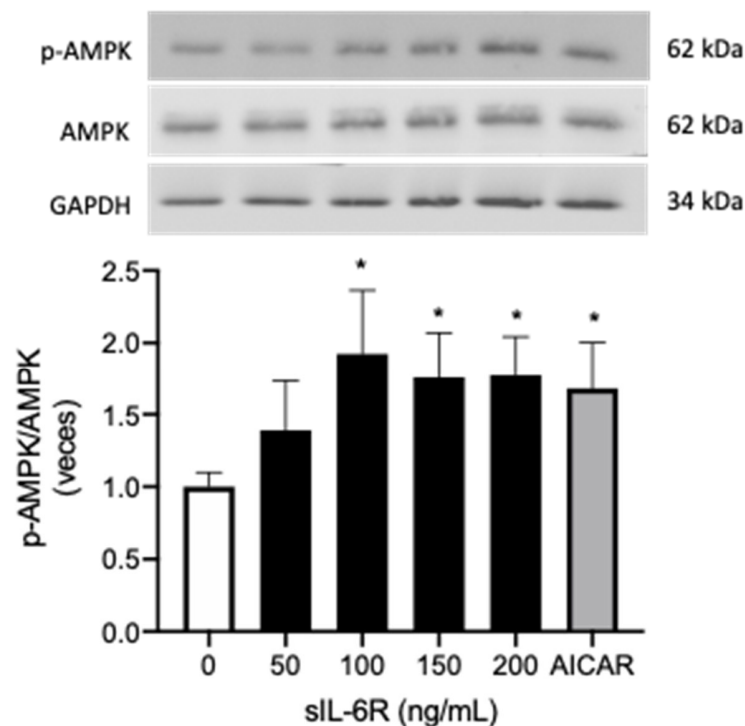


Figura 18. Efecto de sIL-6R en la fosforilación de AMPK en las CMLV.

Las CMLV A7r5 se trataron con sIL-6R a 50, 100, 150 y 200 ng/mL por 1 h. Como control positivo de fosforilación de AMPK se utilizó AICAR 2 mM. Los niveles de AMPK fosforilado en Thr172 y AMPK total se determinaron por Western blot. Se utilizó GAPDH como control de carga (n=5). El panel superior muestra la imagen representativa y el panel inferior muestra la cuantificación de p-AMPK normalizados por los niveles de AMPK total. Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. *p<0,05 vs control.

Además, con el objeto de determinar si la desdiferenciación de las CMLV A7r5 afectaba la activación de AMPK por sIL-6R, se evaluó la fosforilación de AMPK inducida por sIL-6R luego de adicionar PDGF-BB. Los resultados mostraron que la adición de sIL-6R siguió incrementando los niveles de fosforilación de AMPK, incluso en células desdiferenciadas por PDGF-BB (Figura 19).

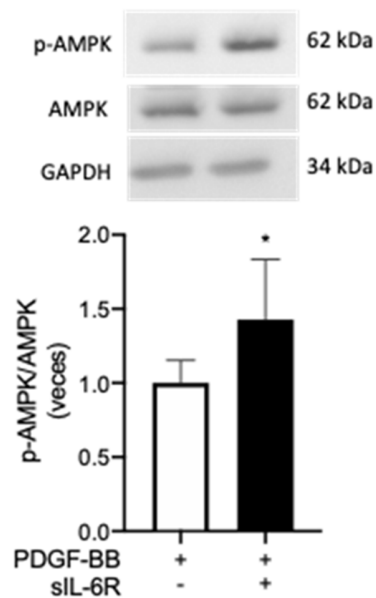


Figura 19. Efecto de sIL-6R en la fosforilación de AMPK en las CMLV desdiferenciadas con PDGF-BB.

Las CMLV A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB y con 20 ng/mL de PDGF-BB + 200 ng/mL de sIL-6R por 1 h. Los niveles de AMPK fosforilado en Thr172 y AMPK total se determinaron por Western blot. Se utilizó GAPDH como control de carga (n=4). El panel superior muestra la imagen representativa y el panel inferior muestra la cuantificación de p-AMPK normalizados por los niveles de AMPK total. Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Mann-Whitney. * $p < 0,05$ vs PDGF-BB.

Para determinar si este efecto sobre la fosforilación de AMPK tenía alguna influencia en la actividad de la enzima, se determinaron los niveles proteicos de un blanco río abajo de AMPK, la proteína PGC-1 α . Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles proteicos de este activador a las 48 h post tratamiento (Figura 20).

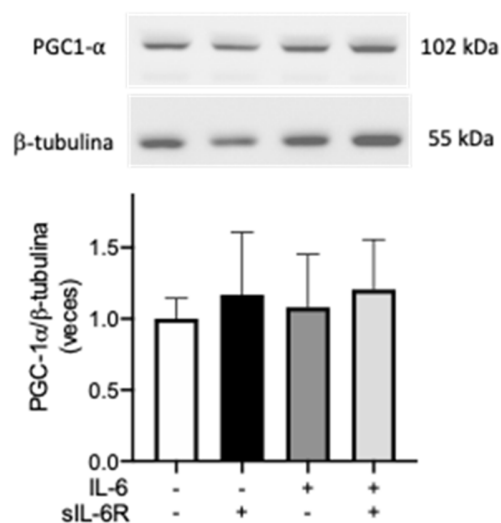


Figura 20. Efecto de sIL-6R en los niveles de PGC-1α en las CMLV A7r5.

Las CMLV A7r5 se trataron con 200 ng/mL de sIL-6R, 200 ng/mL de IL-6, y 200 ng/mL IL-6 + 200 ng/mL de sIL-6R por 48 h. Los niveles de PGC-1α se evaluaron por Western blot (n=4). Como control de carga se midieron los niveles de β-tubulina. El panel superior es una imagen representativa. El panel inferior es la cuantificación. Los datos son el promedio ± SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. No se observaron diferencias significativas.

Estos resultados sugieren que el sIL-6R es capaz de activar AMPK en las CMLV A7r5, independiente de su grado de desdiferenciación. Sin embargo, queda aún por demostrar que la activación de AMPK tiene efectos metabólicos sobre las células CMLV.

6.3.2. Rol de AMPK en la inhibición de la migración de las CMLV A7r5 dependiente de sIL-6R

Por último, se determinó si los efectos del sIL-6R sobre la migración eran dependientes de AMPK. Para esto se evaluó la migración celular en presencia del inhibidor farmacológico de AMPK, el compuesto C (CC), a través del ensayo de herida a las 48 h.

Los resultados mostraron que la adición de CC no afectó la migración de las células. Sin embargo, cuando las células presentaban un fenotipo desdiferenciado por PDGF-BB, y donde

existía un aumento de la migración previo, tanto el sIL-6R como el CC fueron capaces de inhibir la migración inducida por PDGF-BB (Figura 21).

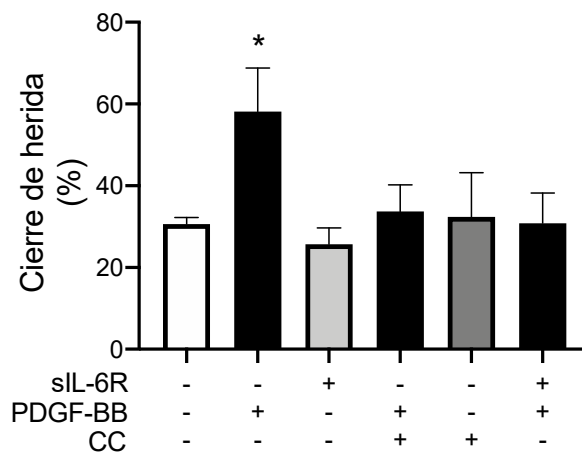


Figura 21. Efecto de la inhibición de AMPK en la migración de las CMLV.

Las CMLV A7r5 se trataron con 20 ng/mL de PDGF-BB, 200 ng/mL de sIL-6R, 20 ng/mL de PDGF-BB + 10 μ M de compuesto C (CC), 20 ng/mL de PDGF-BB + 200 ng/mL de sIL-6R, y 10 μ M de CC por 48 h. La migración se evaluó por ensayo de cierre de herida (n=5). Los datos son el promedio \pm SEM y se analizaron usando una prueba no paramétrica Kruskal Wallis, seguido por un post test de Dunn de múltiples comparaciones. *p<0,05 vs control.

Estos resultados muestran que la inhibición farmacológica de AMPK disminuye la migración de las células A7r5 inducida por PDGF-BB de una manera similar al sIL-6R. Sin embargo, en resultados anteriores mostramos que a la misma concentración de sIL-6R existe un aumento en la fosforilación de AMPK. Esto sugiere que el efecto inhibitor de la migración de sIL-6R podría ocurrir río abajo de AMPK.

7. DISCUSIÓN

IL-6 es una proteína cuyas acciones como citoquina han sido bastante estudiadas, ya que puede activar las respuestas inmunes innatas y adaptativas en el organismo. Sin embargo, en el año 2000 un trabajo publicado por Pedersen B. describió que esta citoquina podía liberarse durante la actividad física.⁸⁰ En un inicio este incremento se asoció a efectos inflamatorios del ejercicio implicados en el desgaste o daño muscular.⁸¹ No obstante, a medida que se fueron probando sus efectos se encontraron diversas funciones sobre el metabolismo, al igual que muchas mioquinas liberadas durante el ejercicio. Entre las acciones, se describió por ejemplo la regulación del metabolismo energético a través de la inducción de la lipólisis y oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético.^{82,83} Además, se ha demostrado que los incrementos de IL-6 durante el ejercicio estimulan la producción de GLP-1 induciendo la secreción de insulina, y reduciendo la ingesta y el peso corporal en modelos de animales.⁸⁴

En este sentido, IL-6 apareció como una proteína con un comportamiento dual, teniendo diferentes respuestas dependiendo del contexto o el ambiente en que se encuentre. Ahora bien, ¿Cómo podemos explicar estas diferencias? Algunas de las explicaciones plantean que los efectos diferenciales entre las acciones de las citoquinas se deben a los cambios en su síntesis y degradación; o a las dosis y concentraciones efectivas interpretadas como constantes de afinidad y unión a sus receptores.

Los fenotipos de las CMLV son muy importantes en la predicción y determinación del estado del remodelado en la arteria. Bajo condiciones patológicas las CMLV pueden pasar del fenotipo contráctil, caracterizado por una expresión específica de proteínas contráctiles, a un fenotipo proliferativo, migratorio y sintético, caracterizado por ser altamente inflamatorio y fibrótico.²⁶ Actualmente existen trabajos que describen que IL-6 induce el mismo cambio fenotípico descrito en patologías como la aterosclerosis, aumentando la proliferación y migración de las CMLV; y aumentando la expresión de marcadores sintéticos como el colágeno.^{65,71,85} En este sentido, y bajo el contexto inflamatorio asociado a la aterosclerosis, IL-6 promovería el remodelado vascular por cambios de fenotipos en las CMLV.

En condiciones fisiológicas como el ejercicio físico también se elevan los niveles de IL-6. Sin embargo, se desconoce si se obtienen los mismos resultados sobre la vasculatura. El ejercicio

físico presenta un remodelado por dilatación vascular asociado al aumento de flujo sanguíneo. Una respuesta diferente con un mismo participante de por medio. Además, se ha demostrado que el remodelado producido durante la practica regular de actividad física es independiente de la generación de inflamación y fibrosis.⁴¹ Entonces, ¿por qué IL-6 liberada durante el ejercicio genera una acción diferente?

Una diferencia primordial es que el contexto no presenta una predisposición inflamatoria previa. El remodelado por aterosclerosis es generado en un ambiente inflamatorio que promueve la fibrosis y estrechamiento del lumen del vaso.⁸⁶ Otra diferencia es la participación de una versión soluble del receptor de IL-6, sIL-6R. Se ha demostrado que el ejercicio físico induce un incremento en IL-6 que es acompañada por aumentos en sIL-6R. Un trabajo recientemente publicado en nuestro laboratorio demuestra que atletas que corren la maratón de Santiago post carrera aumenta la razón IL-6/sIL-6R, versus el control sedentario.⁶⁸ Es decir, uno de los efectos diferenciales de los aumentos de IL-6 en condiciones fisiológicas versus patológicas es el aumento sostenido de sIL-6R. De hecho, se piensa que los aumentos de IL-6 durante el ejercicio son agudos, mientras que los aumentos del sIL-6R son sostenidos en el tiempo y podrían estar implicados en el proceso adaptativo de remodelado vascular en atletas.⁴¹ De esta manera, el ejercicio físico es una condición fisiológica que podría incrementar la acción y respuesta de IL-6 sobre la vasculatura a través de la trans-señalización vía sIL-6R.

La señalización clásica de IL-6 involucra la unión de esta citoquina a dos receptores en la membrana de las células, IL-6R y gp130. La interacción de IL-6 con ambas proteínas permite la ejecución de las respuestas celulares en los diferentes órganos.⁸⁷ Sin embargo, varios trabajos describen que los niveles de IL-6R en algunos tejidos es bastante bajo, en algunos casos indetectables, y que la expresión puede ser inducida por algunos estímulos, en la mayoría de las veces estímulos inflamatorios.³⁶ En este sentido, se encontró que células que expresan el receptor de IL-6 como los monocitos, pueden activar un corte proteolítico del receptor y liberarlo a la circulación en forma de una versión soluble, el sIL-6R.⁸⁸

Este evento es clave para sensibilizar los efectos de IL-6 en células que no expresan el IL-6R en la membrana. De aquí nace la trans-señalización, basada en la unión de IL-6 a la versión soluble de su receptor, formando un complejo de la misma naturaleza hidrofílica. Además, se ha

descrito que este evento logra aumentar la vida media de IL-6 y por ende sus acciones en el organismo.⁴⁷ Posteriormente, el complejo circulante se une por afinidad a gp130 en la membrana de las células y activa la señalización.³⁵ Así, células que antes no podían responder a IL-6 por no presentar el receptor en la membrana, ahora lo pueden hacer.

A partir de esta evidencia, se determinaron los niveles basales de expresión gp130 con el objetivo de verificar que la vía clásica y trans-señalización pudieran activarse. Aquí nosotros mostramos que la línea celular A7r5 utilizada como modelo de estudio *in vitro* expresó niveles de gp130, algo que es bastante congruente con los antecedentes bibliográficos que describen que la expresión de gp130 es ubicua en las células.^{35,89}

Debido a que varios trabajos describen que las CMLV derivadas de rata pueden responder al tratamiento con IL-6^{66,71}, nosotros asumimos que las CMLV A7r5 también expresan IL-6R en su membrana. De hecho, un estudio realizado con cultivos de células endoteliales HUVEC y cultivo primario de CMLV de rata evaluaron los niveles de IL-6R a través de western blot, donde los resultados muestran que ambas líneas celulares expresan IL-6R. Además, la expresión de IL-6R en las CMLV es mucho mayor en comparación con las células endoteliales.⁷³ En este mismo trabajo evaluaron los niveles de p-STAT3 luego del tratamiento con IL-6 y/o sIL-6R, demostrando que ambas vías de señalización: clásica (adición de IL-6) y trans-señalización (IL-6 y sIL-6R), pueden activar la vía JAK/STAT.⁷³

Sin embargo, actualmente los efectos de las señalizaciones de IL-6 no son del todo conocidos, y dependen de las diferencias celulares en los tejidos. En este sentido, nuestro grupo de estudio trabajó en la búsqueda de los efectos de las señalizaciones sobre los fenotipos de las CMLV.

A su vez, las características estructurales y funcionales de las CMLV conocidas como fenotipos son determinantes claves en el correcto funcionamiento de la vasculatura. En condiciones fisiológicas se encuentran en un estado diferenciado, caracterizado por tener una alta expresión de proteínas contráctiles (fenotipo contráctil), baja proliferación/migración, y baja síntesis de componentes de la matriz extracelular (fenotipo no sintético). En respuesta a diferentes estímulos como por ejemplo, frente una lesión en la íntima, las CMLV se desdiferencian disminuyendo los niveles de proteínas contráctiles; aumentando la proliferación

y migración (fenotipo proliferativo/migratorio); y aumentando la síntesis de componentes de la matriz extracelular.¹⁵ Por lo tanto, en la presente investigación, la desdiferenciación de las CMLV se evaluó a través de los parámetros de expresión de proteínas contráctiles, síntesis de colágeno, y proliferación y migración celular.

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de estudio ensayó las concentraciones de IL-6 y sIL-6R a la cual las CMLV generan respuestas celulares (Tesis pregrado Tomás Hernández, 2019). Además, con el objetivo de simular los efectos celulares de los incrementos en los niveles de IL-6 generados durante ejercicio físico, las CMLV se trataron con concentraciones de IL-6 aproximadamente 100 veces más altas que las encontradas a nivel basal.⁴¹

Para el caso del fenotipo contráctil, se ha descrito que la expresión de proteínas que forman parte de la maquinaria contráctil es correlacionado positivamente con la capacidad de las células de participar en la dinámica de distensibilidad en la vasculatura.¹⁵ No obstante, son muy pocos los trabajos en los que se evalúa los efectos de IL-6 en las CMLV. Existe una publicación que describe que IL-6 disminuye los niveles de proteínas contráctiles α -SMA y SM22 en un modelo celular de aorta torácica humana.⁹⁰ Sin embargo, nuestros resultados no evidencian cambios en los niveles de proteínas contráctiles α -SMA y calponina. Como control positivo de disminución de proteínas contráctiles se utilizó PDGF-BB.⁹¹ Cabe destacar que la concentración de IL-6 y el modelo celular utilizados son diferentes. De igual forma, se evaluaron los efectos de sIL-6R en los niveles de proteínas contráctiles sin encontrar cambios significativos.

Por lo tanto, la trans-señalización en las CMLV no altera la expresión de algunos componentes de la maquinaria contráctil, sugiriendo que la capacidad contráctil de las células puede permanecer intacta frente a cambios en los niveles de IL-6 y sIL-6R semejantes a los observados durante el ejercicio físico.

El fenotipo sintético fue el siguiente parámetro evaluado a través de la expresión de colágeno, un componente de la matriz extracelular cuyo incremento en su síntesis se ha descrito como un marcador de fibrosis y daño vascular.¹⁵ Las células cuando secretan colágeno en grandes cantidades promueven la acumulación de esta proteína en la capa intima de la arteria, generando rigidez en la pared vascular y estrechando el lumen del vaso.⁹² De hecho, el fenotipo sintético junto con el proliferativo/migratorio se han descrito como estados predominantes en

enfermedades cardiovasculares como la calcificación vascular y la aterosclerosis a través del remodelado vascular.⁸

Nosotros determinamos los niveles de colágeno I luego de la adición de IL-6 y/o sIL-6R sin encontrar cambios significativos. Un trabajo realizado utilizando un cultivo primario de fibroblastos de aorta humana describe que el tratamiento con IL-6 incrementa los niveles de colágeno I y III en el sobrenadante celular.⁹³ Además, otra publicación indica que IL-6 aumenta la expresión de las metaloproteinasas de matrix MMP-9 y MMP-1 en CMLV.⁸⁵ Así, un punto importante en la metodología hubiese sido determinar los niveles de colágeno en el sobrenadante de las CMLV.

El incremento en la proliferación de las CMLV es otra característica asociada al remodelado vascular patológico.⁹⁴ Para evaluar la proliferación, nosotros determinamos los niveles de ciclina D1, una proteína del ciclo celular relacionada con la capacidad de las células de pasar de la etapa G1 a S.⁹⁵ Paralelamente se utilizó un ensayo colorimétrico MTT como control de viabilidad, y como una medición indirecta del número de células por actividad enzimática mitocondrial. Asumiendo que la actividad metabólica es mantenida durante los tratamientos, la densidad celular puede ser proporcional a la cantidad de producto coloreado formado.⁹⁶ Los resultados muestran que la adición de IL-6 y/o sIL-6R no modifica los niveles de ciclina D1, ni la actividad oxidorreductasa de las CMLV. Sin embargo, se ha demostrado que IL-6 induce la proliferación y migración de las CMLV.^{65,71} Claramente, para lograr discutir acerca de los efectos de los tratamientos en la proliferación, es necesario utilizar otras metodologías como la incorporación de ³H-timidina, marcación de DNA y citometría de flujo.⁹⁶ De igual forma, existe un trabajo que muestra que IL-6 incrementa la migración celular pero no modifica la proliferación de cultivos primarios de aorta de rata.⁶⁵

Además de la síntesis de colágeno y la proliferación, la migración celular se ha descrito como parámetro de desdiferenciación en las CMLV. Un aumento de este fenotipo se asocia a eventos patológicos de hiperplasia y aterosclerosis.⁸⁶ Las células cuando aumentan su capacidad migratoria se mueven desde la capa media a la íntima, acumulándose; promoviendo la liberación de moléculas inflamatorias; proliferando; y como consecuencia, estrechando el lumen del vaso. Por lo tanto, un incremento en la migración de las CMLV se ha descrito como indicativo de un

proceso de remodelado vascular, y un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.⁹⁷ Así, la evidencia muestra que IL-6 incrementa la migración de las CMLV. Es más, una curva dosis respuesta describe que en CMLV derivadas de rata existe un incremento en la migración a las 24 y 48 h dependiente de la dosis de IL-6.⁶⁶

En nuestro trabajo, la migración se determinó a través de ensayos de cierre de herida y ensayo en cámara Boyden. Para evaluar el efecto de la señalización clásica de IL-6 sobre las CMLV, se utilizó la línea celular A7r5 la cual se trató con IL-6 a una concentración previamente ensayada y obtenida a través de una curva de dosis-respuesta (Tesis pregrado Tomás Hernández, 2019). Como control positivo de migración se utilizó el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), un conocido inductor de la migración.^{98,99} Concordante con lo encontrado en la literatura, IL-6 indujo la migración de las CMLV, sugiriendo que la vía clásica de señalización de IL-6 incrementa la migración celular.

Posteriormente, nos propusimos evaluar el efecto de la trans-señalización de IL-6 en la migración, donde las células A7r5 se trataron con IL-6 y sIL-6R por 48 h. Las concentraciones utilizadas describen una proporción 2:1 de IL-6:sIL-6R, lo que implica la adición de un exceso de IL-6, permitiendo la formación del complejo IL-6/sIL-6R y además dejando una cantidad de IL-6 libre capaz de activar la señalización clásica. Por lo tanto, a las concentraciones ensayadas se activan tanto la vía clásica como la trans-señalización. En este sentido, ambas vías necesitan a la proteína gp130 para desencadenar una señalización, lo lógico sería pensar que la activación las dos vías genera el mismo efecto. Sorprendentemente, el tratamiento con sIL-6R inhibió la migración inducida por IL-6.

Con el objetivo de explorar si esta inhibición era específica para IL-6 o bien era un mecanismo de inhibición para cualquier inductor de la migración de las CMLV A7r5, se procedió a evaluar el efecto que tendría sIL-6R sobre la migración inducida por PDGF-BB. Y de la misma manera, el tratamiento con sIL-6R inhibió la migración de las CMLV A7r5 inducida por PDGF-BB a las 24 y 48 h. A partir de estos resultados surge la pregunta ¿cómo sIL-6R tiene efectos en la migración inducida por PDGF-BB? Existen trabajos que describen que las CMLV tratadas con PDGF-BB (20 ng/mL) por 24 h aumentan la síntesis de IL-6 hasta 15 veces respecto al control, en algunos casos hasta una concentración de 400 pg/mL.^{100,101} Además, un dato interesante descrito

por nuestro grupo de trabajo en una publicación en el año 2018 describe que bajos ciertos estímulos como el TNF- α las CMLV pueden producir y liberar IL-6 de forma autocrina.⁶⁷ Otro resultado no publicado determinó que el estímulo desdiferenciador de PDGF-BB también es capaz de inducir la secreción de IL-6 por las CMLV (Tesis de doctorado Marina García, 2018). Basados en estos antecedentes, nosotros proponemos que la estimulación con PDGF-BB incrementa la liberación de IL-6 y la formación del complejo que activa la trans-señalización (Figura 22).

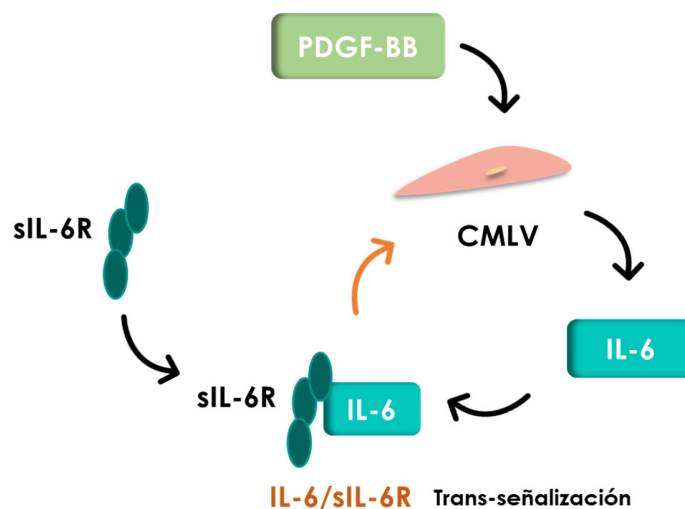


Figura 22. Liberación de IL-6 por PDGF-BB y trans-señalización.

El PDGF-BB es un estímulo que induce la liberación de IL-6 en las CMLV. La IL-6 liberada se une a sIL-6R en el medio, formando el complejo IL-6/sIL-6R. Finalmente, este complejo puede activar la trans-señalización en las CMLV.

Del mismo modo se evaluó el efecto que tiene la liberación autocrina de IL-6 luego del tratamiento con PDGF-BB y/o sIL-6R por 48 h, en la proteína contráctil α -SMA y en la expresión de colágeno I, sin encontrar diferencias significativas. De esta manera, la trans-señalización autocrina solo modificaría el fenotipo migratorio de las CMLV.

A la fecha no existen trabajos que describan un efecto anti-migratorio de sIL-6R sobre las CMLV. Al buscar en PubMed.gov solo aparecen 28 artículos de los cuales la mayoría describe al complejo IL-6/sIL-6R como inductor de la migración y proliferación en diferentes modelos celulares.^{103–105} Sin embargo, un estudio realizado en una línea celular de colangiocarcinoma, Mz-ChA-1, muestra que el tratamiento con un inhibidor específico de la trans-señalización,

sgp130, incrementa la migración celular a las 72h.¹⁰⁶ Este último dato apoyaría el efecto anti-migratorio de sIL-6R.

Debido a que sIL-6R es capaz de inhibir tanto la migración inducida por IL-6 como aquella inducida por PDGF-BB, es probable que ambas vías presenten mecanismos en común. La señalización por PDGF-BB puede activar a varias vías de señalización como PI3K/Akt, JAK/STAT y MAPKs, promoviendo la viabilidad, la expresión de genes y proliferación celular.¹⁰⁷ Además, PDGFR puede interactuar con integrinas y el complejo de adhesiones focales asociado a los filamentos de actina.¹⁰⁸ Por otra parte, la señalización de IL-6 puede activar prácticamente las mismas vías, principalmente JAK/STAT y MAPKs.¹⁰⁹

Además, la señalización asociada a la migración celular incluye la activación de paxilina, una proteína adaptadora encargada de reclutar y formar el complejo proteico de adhesión focal, formado por la proteína quinasa de adhesiones focales (FAK), vinculina, talina, entre otras. La activación de la vía de MAPKs conduce a la activación de paxilina y posterior fosforilación y activación de FAK.¹¹⁰

Así, uno de los participantes en el inicio de la migración es FAK, donde la fosforilación en Tyr397 es utilizada como sitio de unión para otras quinasas que pueden fosforilar a FAK en el dominio catalítico y en su carboxilo terminal, para finalmente activarla. La activación de FAK genera la formación de puntos focales (complejos proteicos) que dirigen la migración celular.¹¹¹ Siguiendo esta lógica, puede que el mecanismo en común entre las vías involucre la activación de FAK.

En este trabajo, nos propusimos averiguar si la administración de sIL-6R ejerce algún efecto sobre la fosforilación de FAK. Resultados obtenidos en la curva dosis-respuesta de sIL-6R muestran una disminución de la fosforilación de FAK en todas las dosis ensayadas. Algo muy interesante, ya que aparecen efectos en las células solo con la adición del sIL-6R ahora en ausencia de PDGF-BB.

Este resultado es sorprendente, y nos hace cuestionar ¿Cómo sIL-6R logra tener este efecto? Recopilando los antecedentes y datos experimentales, una posible explicación es que los suplementos de suero adicionados para que las células crezcan podrían contener trazas de IL-6, de manera que se forme el complejo y se active la trans-señalización. Sin embargo, previo a los

experimentos se utilizaba un medio de cultivo sin suero, con el fin de sincronizar las células, y evitar estos inconvenientes de señalizaciones cruzadas. Además, otra de las razones por las que se privaron las células antes del tratamiento fue para disminuir los niveles de glicógeno, un evento necesario para que algunas quinasas como AMPK puedan activarse.¹¹² Entonces, la privación de suero permite que AMPK puede ser susceptible a la activación.

Efectivamente, nuestros datos también demuestran que a la misma temporalidad que disminuye la fosforilación de FAK, incrementa la fosforilación de AMPK. A su vez, se ha demostrado que la disminución de las reservas de glicógeno además de activar a AMPK, inducen la expresión de IL-6. Del mismo modo, el estrés producido por la falta de glicógeno aumenta la actividad de AMPK y puede inducir la expresión de IL-6 en el músculo esquelético.^{113,114} En este sentido, y en respuesta a esta falta de factores de crecimiento, las CMLV podrían liberar IL-6, incrementando la unión a sIL-6R y formación del complejo proteico que induce la trans-señalización (Figura 23).

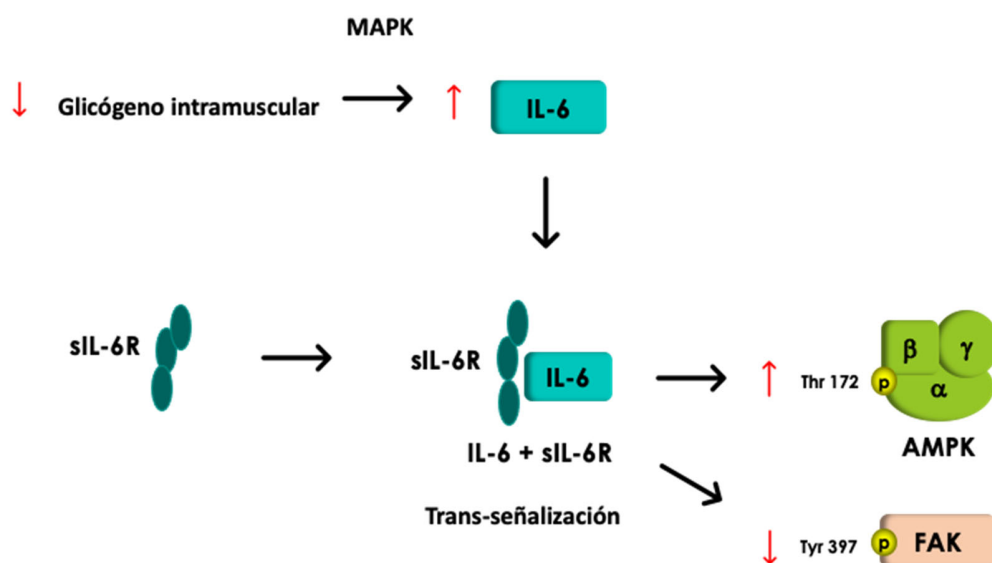


Figura 23. Esquema del mecanismo de acción de la trans-señalización de IL-6.

Estímulos como la privación de suero incrementan la producción y liberación de IL-6 en las CMLV vía activación de las MAPK. El incremento en IL-6 permite su unión a sIL-6R, activando la trans-señalización. Los efectos podrían traducirse como un incremento en la fosforilación de AMPK y una disminución de la fosforilación de FAK.

Sin embargo, es necesario demostrar que la trans-señalización de IL-6 tiene un efecto en la fosforilación en AMPK y FAK, donde el tratamiento con la combinación de IL-6+sIL-6R debería recapitular los efectos obtenidos en la trans-señalización autocrina de IL-6. Lamentablemente, en el transcurso de este trabajo no se pudo demostrar este punto.

Por otra parte, si se demostró que la trans-señalización autocrina inducida por PDGF-BB tiene un efecto en los niveles fosforilados de AMPK y FAK. Como describimos anteriormente, el estímulo de PDGF-BB es capaz de inducir la expresión y liberación de IL-6, por lo que la adición de PDGF-BB + sIL-6R tendría que reproducir los efectos en la fosforilación de FAK. Efectivamente, en la condición de trans-señalización autocrina existe una disminución de los niveles de FAK con respecto al PDGF-BB.

Del mismo modo, la migración de las células evaluadas por la disminución del porcentaje de cierre de herida determinó que a las 24 y 48 h de tratamiento con PDGF-BB se induce la migración de las CMLV, lo que se correlaciona con lo establecido por otras publicaciones.⁹⁸ Además, al adicionar la combinación de PDGF-BB + sIL-6R por 48 h, la migración se restablece a niveles basales, atenuando la migración inducida por PDGF-BB. Este dato es concordante con la disminución obtenida en la fosforilación de FAK cuando se adiciona la combinación de PDGF-BB y sIL-6R. Así mismo, y evidenciando nuestro planteamiento de los efectos de la trans-señalización, la combinación de IL-6 + sIL-6R + PDGF-BB presentan la misma disminución y el mismo comportamiento generado por el tratamiento con PDGF-BB + sIL-6R en la reducción de la migración. Demostrando que nuestra hipótesis de la liberación de IL-6 y la formación del complejo activante, son completamente factibles.

Existe una publicación que describe que IL-6 aumenta la migración celular a través de la activación de src/FAK en células endoteliales linfáticas.¹¹⁵ En contraste, otro artículo nos muestra que la señalización de IL-6/STAT-3 parece bloquear la actividad de FAK en células de hepatocarcinoma SNU761 a través de la interacción cruzada con el receptor de tetrasparina TM4SF5.¹¹⁶ En este último trabajo, los autores describen que la sobreactivación de STAT-3 regula negativamente la actividad de FAK en células cancerígenas Hub7, SNU761 y HCC827.¹¹⁶ De la misma forma, se ha demostrado que los reguladores negativos de la señalización de citoquinas SOCS-1 y SOCS-3, interactúan con FAK disminuyendo su fosforilación en células COS-7 y

NIH 3T3.¹¹⁷ Por lo tanto, es posible que una sobreactivación de la señalización de STAT-3 también pueda regular la actividad de FAK en nuestro modelo celular.

Finalmente, muchos de los efectos de las mioquinas en nuestro organismo son mediados por las acciones de AMPK.¹¹⁸ Además, se ha demostrado que IL-6 es un potente activador de AMPK en el músculo esquelético y tejido adiposo, aumentando la sensibilidad a insulina y la captación de glucosa periférica.¹¹⁹

Trabajos previos han descrito que IL-6 en el contexto del ejercicio físico, incrementa la captación de glucosa periférica a través de la activación de AMPK en el musculo esquelético.¹²⁰ Siguiendo la misma línea el análisis de la curva de dosis respuesta del sIL-6R sobre la fosforilación de AMPK muestra que desde 100 ng/mL, el receptor logra incrementar los niveles fosforilados de AMPK, donde se ha descrito que es un símil de su estado activo. Además, células desdiferenciadas con PDGF-BB al adicionar sIL-6R aumentan la fosforilación de AMPK, indicando que la trans-señalización aumenta los niveles fosforilados de la quinasa.

A pesar de que existe un aumento en la fosforilación de AMPK luego de la estimulación de la trans-señalización, no se evidenciaron cambios en los niveles proteicos del blanco río abajo PGC-1 α a las 48 h. Esto podría implicar que los efectos en la activación de AMPK sobre PGC-1 α no alteran sus niveles de expresión, pero podrían incrementar su fosforilación y translocación al núcleo, o promover la biogénesis mitocondrial (experimentos no evaluados).

Por último, queda demostrar cuál es el papel de AMPK en todo este mecanismo migratorio. Algunos trabajos describen que la activación de AMPK por incremento en la fosforilación del residuo Thr172 se ha correlacionado con la disminución de la migración y proliferación de las CMLV.¹²¹ De la misma forma el uso del agonista de AMPK, AICAR, aumenta la actividad de AMPK e inhibe la migración de las CMLV obtenidas de cultivo primario de arterias de ratas.¹²²

Para comprobar si los efectos en la migración celular implican la acción de AMPK, se determinó la migración por cierre de herida en presencia del inhibidor farmacológico de AMPK, Compuesto C (CC). Los resultados muestran que la adición del CC a la condición con PDGF-BB disminuyó la migración de las CMLV, prácticamente de forma idéntica a como lo hace sIL-6R. Este resultado es correlacionado con un trabajo publicado en el año 2013, donde se describe que la

migración celular inducida por PDGF-BB es mediada por la activación de AMPK vía GTP-Rad/cdc42-Rac1, a través de la fosforilación de AMPK en Thr172.¹²³ Además, al igual que en nuestros resultados, el tratamiento con el CC suprime la migración inducida por PDGF-BB; y un siRNA para AMPK- α presenta efectos anti migratorios en las CMLV. Así, nuestros resultados nos indican que la adición de CC inhiben la migración celular inducida por PDGF-BB, lo que tiene sentido con lo descrito en la bibliografía acerca del uso del CC.¹²⁴

Hasta aquí, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el sIL-6R disminuye la fosforilación de FAK, y por ende también la migración celular. Sin embargo, los efectos de sIL-6R sobre AMPK parecer ser controversiales, ya que por una parte la trans-señalización incrementa la fosforilación de AMPK, y por otro lado la inhibición farmacológica de AMPK reproduce los efectos anti-migratorios de sIL-6R, mostrando que la trans-señalización podría incluir la inhibición de AMPK (Figura 21). Entonces, ¿cómo sIL-6R puede tener estos efectos duales sobre AMPK?

Para responder esta interrogante, hay que tener en cuenta la temporalidad y el contexto del proceso, ya que los niveles fosforilados de AMPK se midieron luego de 1 h de tratamiento, y la migración celular se evaluó a las 24 y 48 h. El hecho de que AMPK incrementara su fosforilación a la hora de tratamiento no implica que esté activa durante las 24 y 48 h. Es más, los efectos en las activaciones de las enzimas y sobre todo en las modificaciones como las fosforilaciones son cíclicos, e implican mecanismos de regulación a través de las fosfatasa y proteasas que regulan los niveles; las modificaciones post-traduccionales; y finalmente las acciones de muchas quinasas. De manera que hubiese sido relevante para la investigación medir los niveles fosforilados y la activación de AMPK a las temporalidades en que se ensayó la migración.

Por otra parte, el uso de CC tiene efectos anti-proliferativos en células de gliomas, a través de mecanismos que no dependen de AMPK, siendo bastante inespecífico ya que puede inhibir a varias otras quinasas.¹²⁵ Por lo tanto, para demostrar que el mecanismo de acción de sIL-6R implica la inhibición de AMPK, es necesario utilizar un siRNA o un inhibidor específico para AMPK que recapitule los efectos anti-migratorios obtenidos por sIL-6R.

Al investigar una posible relación entre AMPK y FAK nos encontramos con trabajos que describen que la activación de AMPK inhibe la migración y proliferación en CMLV estimulada por

PDGF-BB, a través de la disminución de la fosforilación de FAK.¹²⁶ De la misma forma, en cultivos primarios de músculo esquelético humano, la activación de AMPK reduce la fosforilación de FAK (Y397) y paxilina (Y118).¹²⁷ Sin embargo, existe una publicación que describe que tanto AMPK como FAK pueden ser activados por fuerzas mecánicas como el “shear stress” en células de cáncer de mama, MDA-MB-231. Los autores muestran que la activación de AMPK reduce la actividad basal de FAK. Sin embargo, la activación de FAK fue independiente de la activación de AMPK inducida por “shear stress”.¹²⁸ Basados en este último artículo, puede que el efecto anti-migratorio de sIL-6R ocurra de forma independiente a la regulación de AMPK.

Por lo tanto, nosotros planteamos que el mecanismo de acción de sIL-6R implica la inhibición de la migración por disminución de la fosforilación de FAK (Figura 24). Un efecto que podría ser directo sobre FAK independiente del estado de fosforilación de AMPK, ya que a pesar de que esta se encuentre activa y pueda mantener la migración generada por PDGF-BB, de igual forma existe una disminución en la migración en la condición PDGF-BB + sIL-6R.

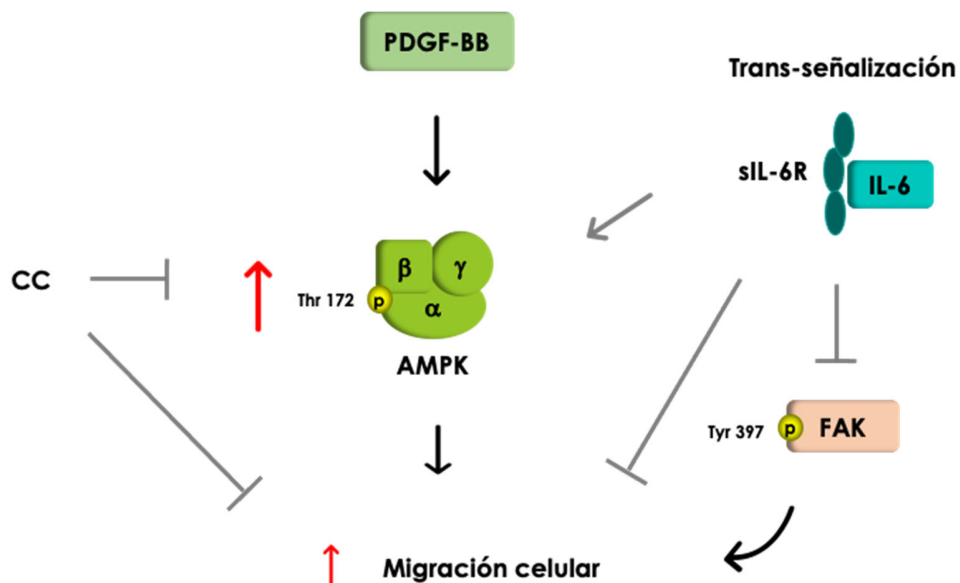


Figura 24. Modelo del mecanismo de señalización involucrado en la migración de las células.

Trabajos previos han demostrado que el PDGF-BB induce la migración de las CMLV por activación de la fosforilación de AMPK y FAK. El compuesto CC inhibe la migración celular por disminución de la fosforilación de AMPK. La trans-señalización disminuye los niveles de FAK fosforilados y la migración de las células. También pueden incrementar los niveles de AMPK fosforilada, pero este efecto no influencia la disminución de la migración celular, pues FAK ya está inhibida por acción de la trans-señalización.

Finalmente, un trabajo publicado recientemente por nuestro laboratorio describe que atletas de alto rendimiento que participaron en la maratón de Santiago de Chile, y cuyo estímulo fue correr durante 42 km; liberan grandes concentraciones de IL-6 y sIL-6R. A nivel estructural se determinó el grado de remodelado vascular en la arteria aorta evaluando el diámetro de la arteria aorta ascendente.⁶⁸ Aquí, los atletas independiente de la frecuencia de entrenamiento presentan un remodelado arterial por incremento del diámetro de la aorta en comparación con el grupo control de individuos sedentarios. Además, se demostró una correlación positiva entre los niveles de IL-6 y el grado de remodelado por los años de entrenamiento, es decir, entre más años de entrenamiento tienen los atletas, se observa una mayor dilatación de la aorta.⁶⁸

Por lo tanto, aquí planteamos que la liberación y aumento de los niveles circulantes de IL-6 y sIL-6R semejantes a los inducidos por el ejercicio físico, podrían tener efectos benéficos en el fenotipo migratorio de las CMLV, y por ende en el remodelado vascular generado por este cambio en las características funcionales y estructurales de las CMLV; y además presentar efectos positivos en el metabolismo energético, potenciando las acciones de IL-6 como mioquina a través de la activación de AMPK.

8. CONCLUSIONES

Como conclusiones de esta tesis podemos plantear:

1. IL-6 incrementa la migración celular sin alterar los niveles de proteínas contráctiles (calponina, SM22 y α -SMA), síntesis de colágeno I y proliferación en las CMLV.
2. sIL-6R disminuye la migración celular inducida por IL-6 y PDGF-BB, sin modificar los niveles de proteínas contráctiles (calponina, SM22 y α -SMA), síntesis de colágeno I y proliferación en las CMLV.
3. sIL-6R incrementa los niveles de p-AMPK basalmente y en presencia de PDGF-BB.
4. sIL-6R disminuye los niveles de p-FAK basalmente y en presencia de PDGF-BB.
5. La inhibición farmacológica de AMPK a través del compuesto C, disminuye la migración inducida por PDGF-BB, reproduciendo el efecto anti-migratorio obtenido con sIL-6R.

Así, el receptor soluble de interleuquina-6 disminuye la migración inducida por IL-6 y PDGF-BB, sin alterar los niveles de proteínas contráctiles (calponina, SM22 y α -SMA), síntesis de colágeno I y proliferación celular. Sin embargo, nuestros datos no son suficientes para concluir si este mecanismo es dependiente de AMPK.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. D, T. & J, M. Exercise for Prevention and Relief of Cardiovascular Disease: Prognoses, Mechanisms, and Approaches. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, (2019).
2. Fernando, L., Pamela, S. & Alejandra, L. Cardiovascular Disease in Latin America: The Growing Epidemic. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **57**, 262–267 (2014).
3. OMS | Enfermedades cardiovasculares. *WHO* (2015).
4. Rafael Rondanelli, D. I. & Luis Alberto Lindermeier, Q. B. EPIDEMIOLOGÍA DE LA CARDIOPATÍA CORONARIA EN CHILE.
5. Uthman, O. A. *et al.* Multiple risk factor interventions for primary prevention of cardiovascular disease in low- and middle-income countries. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD011163 (2015) doi:10.1002/14651858.CD011163.pub2.
6. De Hert, S. Physiology of hemodynamic homeostasis. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology* vol. 26 409–419 (2012).
7. Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D. & Mehta, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* vol. 19 (2017).
8. Durham, A. L., Speer, M. Y., Scatena, M., Giachelli, C. M. & Shanahan, C. M. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovascular Research* vol. 114 590–600 (2018).
9. Kiyon, Y. *et al.* oxLDL induces inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via urokinase receptor association with CD36 and TLR4. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **66**, 72–82 (2014).
10. McGrath, J. C. *et al.* New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp. Physiol.* **90**, 469–475 (2005).
11. Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol. Rev.* **84**, 767–801 (2004).
12. Brozovich, F. V. *et al.* Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. *Pharmacological Reviews* vol. 68 476–532 (2016).
13. Rzucidlo, E. M., Martin, K. A. & Powell, R. J. Regulation of vascular smooth muscle cell

- differentiation. *J. Vasc. Surg.* **45**, A25–A32 (2007).
14. Miano, J. M. Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Adaptation. in *Muscle* 1269–1278 (Elsevier, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-381510-1.00095-8.
 15. Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P. & Resink, T. J. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cellular Signalling* vol. 52 48–64 (2018).
 16. Chiong, M. *et al.* Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 2 72 (2014).
 17. Chiong, M. *et al.* Influence of glucose metabolism on vascular smooth muscle cell proliferation. *Vasa* **42**, 8–16 (2013).
 18. Johnson, J. L. Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **103**, 452–460 (2014).
 19. Jaminon, A., Reesink, K., Kroon, A. & Schurgers, L. The role of vascular smooth muscle cells in arterial remodeling: Focus on calcification-related processes. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).
 20. Renna, N. F., de Las Heras, N. & Miatello, R. M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int. J. Hypertens.* **2013**, 808353 (2013).
 21. Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz-Rixen, T. & Schaper, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: Similarities and differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 10 45–55 (2006).
 22. Gabrielli, L. *et al.* Potential adverse cardiac remodelling in highly trained athletes: still unknown clinical significance. *European Journal of Sport Science* vol. 18 1288–1297 (2018).
 23. Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J. & Zierath, J. R. Integrative biology of exercise. *Cell* vol. 159 738–749 (2014).
 24. Booth, F. W., Roberts, C. K. & Laye, M. J. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr. Physiol.* **2**, 1143–1211 (2012).
 25. Hanson, B. E., Proffit, M. & Gifford, J. R. Vascular function is related to blood flow during high-intensity, but not lowintensity, knee extension exercise. *J. Appl. Physiol.* **128**, 698–708 (2020).

26. Green, D. J. & Smith, K. J. Effects of exercise on vascular function, structure, and health in humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, (2018).
27. Hellsten, Y. & Nyberg, M. Cardiovascular adaptations to exercise training. *Compr. Physiol.* **6**, 1–32 (2016).
28. Prior, B. M., Lloyd, P. G., Yang, H. T. & Terjung, R. L. Exercise-induced vascular remodeling. *Exercise and Sport Sciences Reviews* vol. 31 26–33 (2003).
29. Giudice, J. & Taylor, J. M. Muscle as a paracrine and endocrine organ. *Curr. Opin. Pharmacol.* **34**, 49–55 (2017).
30. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological Reviews* vol. 88 1379–1406 (2008).
31. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, 16295–16296 (2014).
32. Choy, E. & Rose-John, S. Interleukin-6 as a Multifunctional Regulator: Inflammation, Immune Response, and Fibrosis. *J. Scleroderma Relat. Disord.* **2**, S1–S5 (2017).
33. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1813 878–888 (2011).
34. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology* vol. 8 457–465 (2012).
35. Wolf, J., Rose-John, S. & Garbers, C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine* vol. 70 11–20 (2014).
36. Rose-John, S. Il-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences* vol. 8 1237–1247 (2012).
37. Schroers, A. Dynamics of the gp130 cytokine complex: A model for assembly on the cellular membrane. *Protein Sci.* **14**, 783–790 (2005).
38. Babon, J. J., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Nicola, N. A. & Varghese, L. N. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochemical Journal* vol. 462 1–13 (2014).
39. Liao, N. P. D. *et al.* The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat. Commun.* **9**,

- 1–14 (2018).
40. Wolf, J. *et al.* Different soluble forms of the interleukin-6 family signal transducer gp130 fine-tune the blockade of interleukin-6 trans-signaling. *J. Biol. Chem.* **291**, 16186–16196 (2016).
 41. Villar-Fincheira, P. *et al.* Role of Interleukin-6 in Vascular Health and Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences* vol. 8 (2021).
 42. Plomgaard, P., Penkowa, M. & Pedersen, B. K. Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles. *Exerc. Immunol. Rev.* **11**, 53–63 (2005).
 43. Croisier, J. L. *et al.* Effects of training on exercise-induced muscle damage and interleukin 6 production. *Muscle and Nerve* **22**, 208–212 (1999).
 44. Sabaratnam, R. *et al.* Intact regulation of muscle expression and circulating levels of myokines in response to exercise in patients with type 2 diabetes. *Physiol. Rep.* **6**, (2018).
 45. Fischer, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: What is the biological relevance? *Exercise Immunology Review* vol. 12 6–33 (2006).
 46. Montero-Julian, F. A. The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **47**, 583–97 (2001).
 47. Baran, P. *et al.* The balance of Interleukin (IL)-6, IL-6:soluble IL-6 receptor (IL-6R) and IL-6:sIL-6R:sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J. Biol. Chem.* jbc.RA117.001163 (2018) doi:10.1074/jbc.RA117.001163.
 48. Robson-Ansley, P. *et al.* The effect of repeated endurance exercise on IL-6 and sIL-6R and their relationship with sensations of fatigue at rest. *Cytokine* **45**, 111–6 (2009).
 49. Gray, S. R., Ratkevicius, A., Wackerhage, H., Coats, P. & Nimmo, M. A. The effect of interleukin-6 and the interleukin-6 receptor on glucose transport in mouse skeletal muscle. *Exp. Physiol.* **94**, 899–905 (2009).
 50. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25 (2005).
 51. Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase--an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **25**, 1895–1908 (2011).

52. Carling, D., Mayer, F. V., Sanders, M. J. & Gamblin, S. J. AMP-activated protein kinase: Nature's energy sensor. *Nature Chemical Biology* vol. 7 512–518 (2011).
53. Wu, S. & Zou, M.-H. Molecular Sciences AMPK, Mitochondrial Function, and Cardiovascular Disease. doi:10.3390/ijms21144987.
54. Koh, H.-J. Regulation of exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **21**, 61 (2016).
55. Hawley, J. A., Lundby, C., Cotter, J. D. & Burke, L. M. Maximizing Cellular Adaptation to Endurance Exercise in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **27**, 962–976 (2018).
56. Kjøbsted, R., Wojtaszewski, J. F. P. & Treebak, J. T. Role of AMP-Activated Protein Kinase for Regulating Post-exercise Insulin Sensitivity. in *EXS* vol. 107 81–126 (2016).
57. Kelly, M., Gauthier, M.-S., Saha, A. K. & Ruderman, N. B. Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Interleukin-6 in Rat Skeletal Muscle: Association With Changes in cAMP, Energy State, and Endogenous Fuel Mobilization. *Diabetes* **58**, 1953–1960 (2009).
58. Carey, A. L. *et al.* Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* **55**, 2688–2697 (2006).
59. Kelly, M. *et al.* AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: The effect of exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 449–454 (2004).
60. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol.* **214**, 33–50 (2015).
61. Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R. & Mallat, Z. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology* vol. 16 727–744 (2019).
62. Papadopoulos, N. & Lennartsson, J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Molecular Aspects of Medicine* vol. 62 75–88 (2018).
63. Tapial Martínez, P., Navajas, P. L. & Lietha, D. biomolecules FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. doi:10.3390/biom10020179.
64. Lee, G.-L. *et al.* TLR4-Activated MAPK-IL-6 Axis Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Function. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1394 (2016).
65. Wang, Z. & Newman, W. H. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is

- associated with cytoskeletal reorganization. *J. Surg. Res.* **111**, 261–6 (2003).
66. Wang, D. *et al.* An essential role for gp130 in neointima formation following arterial injury. *Circ. Res.* **100**, 807–16 (2007).
 67. Norambuena-Soto, I. *et al.* Angiotensin-(1-9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1-dependent mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **180**, (2020).
 68. P, V.-F. *et al.* Soluble Interleukin-6 Receptor Regulates Interleukin-6-Dependent Vascular Remodeling in Long-Distance Runners. *Front. Physiol.* **12**, (2021).
 69. Fix, D. K. *et al.* The Role of gp130 in Basal and Exercise Trained Skeletal Muscle Mitochondrial Quality Control. *J. Appl. Physiol.* jappphysiol.01063.2017 (2018) doi:10.1152/jappphysiol.01063.2017.
 70. 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.* **163**, 4583–9 (1999).
 71. Morimoto, S. *et al.* Interleukin-6 stimulates proliferation of cultured vascular smooth muscle cells independently of interleukin-1 beta. *J Cardiovasc Pharmacol* **17 Suppl 2**, S117-8 (1991).
 72. Z, W. & WH, N. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J. Surg. Res.* **111**, 261–266 (2003).
 73. Luo, P. *et al.* Bazedoxifene exhibits anti-inflammation and anti-atherosclerotic effects via inhibition of IL-6/IL-6R/STAT3 signaling. *Eur. J. Pharmacol.* **893**, (2021).
 74. J, Z. *et al.* Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation. *Theranostics* **9**, 6901–6919 (2019).
 75. JK, S. & BG, H. Implications of autophagy for vascular smooth muscle cell function and plasticity. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 693–703 (2013).
 76. Lu, Q.-B. *et al.* Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFκB/mTOR/P70S6K signaling cascade. *Redox Biol.* **14**, 656–668 (2018).

77. GL, B., HF, J., MCH, C., MR, B. & Z, M. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 727–744 (2019).
78. Hardie, D. G. The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* **117**, 5479–5487 (2004).
79. Tsogbadrakh, B. *et al.* AICAR, an AMPK activator, protects against cisplatin-induced acute kidney injury through the JAK/STAT/SOCS pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **509**, 680–686 (2019).
80. Pedersen, B. K., Steensberg, A. & Schjerling, P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J. Physiol.* **536**, 329–337 (2001).
81. Forcina, L. *et al.* Increased Circulating Levels of Interleukin-6 Affect the Redox Balance in Skeletal Muscle. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, (2019).
82. van Hall, G. *et al.* Interleukin-6 Stimulates Lipolysis and Fat Oxidation in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 3005–3010 (2003).
83. Coles, C. A. Adipokines in healthy skeletal muscle and metabolic disease. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 900 133–160 (Springer New York LLC, 2016).
84. Ellingsgaard, H. *et al.* GLP-1 secretion is regulated by IL-6 signalling: a randomised, placebo-controlled study. *Diabetologia* **63**, 362–373 (2020).
85. Zhu, Y., Hojo, Y., Ikeda, U., Takahashi, M. & Shimada, K. Interaction between monocytes and vascular smooth muscle cells enhances matrix metalloproteinase-1 production. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**, 152–61 (2000).
86. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiologica* vol. 219 382–408 (2017).
87. Keller, E. T., Wanagat, J. & Ershler, W. B. Molecular and cellular biology of interleukin-6 and its receptor. *Front. Biosci.* **1**, d340–d357 (1996).
88. Rose-John, S. The soluble interleukin-6 receptor and related proteins. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**, 787–797 (2015).
89. Kishimoto, T., Akira, S. & Taga, T. IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 431–8 (1992).
90. An, Z. *et al.* Interleukin-6 downregulated vascular smooth muscle cell contractile proteins

- via ATG4B-mediated autophagy in thoracic aortic dissection. *Heart Vessels* **32**, 1523–1535 (2017).
91. Kaplan-Albuquerque, N., Garat, C., Van Putten, V. & Nemenoff, R. A. Regulation of SM22 alpha expression by arginine vasopressin and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, (2003).
 92. Green, D. J. & Smith, K. J. Effects of exercise on vascular function, structure, and health in humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, (2018).
 93. Chen, R. *et al.* Autophagy promotes aortic adventitial fibrosis via the IL-6/Jak1 signaling pathway in Takayasu's arteritis. *J. Autoimmun.* **99**, 39–47 (2019).
 94. Wang, G., Jacquet, L., Karamariti, E. & Xu, Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J. Physiol.* **593**, 3013–3030 (2015).
 95. Stacey, D. W. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 158–163 (2003).
 96. Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S. & Hübner, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol. Biol.* **1601**, 1–17 (2017).
 97. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. & Bobryshev, Y. V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol.* **214**, 33–50 (2015).
 98. Lu, Q. B. *et al.* Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFκB/mTOR/P70S6K signaling cascade. *Redox Biol.* **14**, 656–668 (2018).
 99. Dong, X., Hu, H., Fang, Z., Cui, J. & Liu, F. CTRP6 inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biomed. Pharmacother.* **103**, 844–850 (2018).
 100. Liu, Z., Dronadula, N. & Rao, G. N. A novel role for nuclear factor of activated T cells in receptor tyrosine kinase and G protein-coupled receptor agonist-induced vascular smooth muscle cell motility. *J. Biol. Chem.* **279**, 41218–41226 (2004).
 101. Liu, Q. *et al.* Sparstolonin B suppresses rat vascular smooth muscle cell proliferation, migration, inflammatory response and lipid accumulation. *Vascul. Pharmacol.* **67–69**, 59–66 (2015).
 102. García-Miguel, M. *et al.* Autophagy mediates tumor necrosis factor-α-induced phenotype

- switching in vascular smooth muscle A7r5 cell line. *PLoS One* **13**, (2018).
103. Ebihara, N., Matsuda, A., Nakamura, S., Matsuda, H. & Murakami, A. Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 8549–8557 (2011).
 104. Santer, F. R., Malinowska, K., Culig, Z. & Cavarretta, I. T. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* **17**, 241–253 (2010).
 105. Thibault, V., Terlain, B. & Gauldie, J. Characterization and biologic activities of recombinant rat soluble interleukin-6 receptor. *J. Interferon Cytokine Res.* **16**, 973–981 (1996).
 106. Kleinegger, F. *et al.* Pharmacologic IL-6R α inhibition in cholangiocarcinoma promotes cancer cell growth and survival. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. basis Dis.* **1865**, 308–321 (2019).
 107. Evrova, O. & Buschmann, J. IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF PDGF-BB DELIVERY STRATEGIES ON TENDON HEALING: A REVIEW. *Eur. Cells Mater.* **34**, 15–39.
 108. Veevers-Lowe, J., Ball, S. G., Shuttleworth, A. & Kielty, C. M. Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated activation of PDGFR- β and potentiation of growth factor signals. *J. Cell Sci.* **124**, 1288–1300 (2011).
 109. Kang, S. & Kishimoto, T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. *Exp. Mol. Med.* **2021 537** **53**, 1116–1123 (2021).
 110. López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R. & López, E. Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J. Hematol. Oncol.* **10**, (2017).
 111. Calalb, M. B., Polte, T. R. & Hanks, S. K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 954–63 (1995).
 112. Wu, W. *et al.* Sodium Tanshinone IIA Silate Inhibits High Glucose-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration through Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *PLoS One* **9**, e94957 (2014).
 113. Steensberg, A. *et al.* Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J. Physiol.* **537**, 633–639 (2001).

114. MacDonald, C., Wojtaszewski, J. F. P., Pedersen, B. K., Kiens, B. & Richter, E. A. Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: Relation to AMPK activity. *J. Appl. Physiol.* **95**, 2273–2277 (2003).
115. Huang, Y. H. *et al.* Interleukin-6 Induces Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression via Src-FAK-STAT3 Signaling in Lymphatic Endothelial Cells. *PLoS One* **11**, (2016).
116. Ryu, J. *et al.* Cross talk between the TM4SF5/focal adhesion kinase and the interleukin-6/STAT3 pathways promotes immune escape of human liver cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2946–2960 (2014).
117. Liu, E., Côté, J. F. & Vuori, K. Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *EMBO J.* **22**, 5036–5046 (2003).
118. Richter, E. A. & Ruderman, N. B. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem. J.* **418**, 261–75 (2009).
119. Ruderman, N. B. *et al.* Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase: Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes* vol. 55 (2006).
120. Carey, A. L. *et al.* Interleukin-6 Increases Insulin-Stimulated Glucose Disposal in Humans and Glucose Uptake and Fatty Acid Oxidation In Vitro via AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes* **55**, 2688–2697 (2006).
121. Kim, S. G., Kim, J.-R. & Choi, H. C. Quercetin-Induced AMP-Activated Protein Kinase Activation Attenuates Vasoconstriction Through LKB1-AMPK Signaling Pathway. *J. Med. Food* **21**, 146–153 (2018).
122. Wu, Y., Liu, G., Chen, W., Yang, M. & Zhu, C. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside reduces intimal hyperplasia of tissue engineering blood vessel by inhibiting phenotype switch of vascular smooth muscle cell. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **105**, 744–752 (2017).
123. Iida, M., Tanabe, K., Matsushima-Nishiwaki, R., Kozawa, O. & Iida, H. Adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell migration. *Arch. Biochem. Biophys.* **530**, 83–92 (2013).

124. Peyton, K. J. *et al.* Compound C Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration in an AMP-Activated Protein Kinase-Independent Fashion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **338**, 476–484 (2011).
125. Liu, X., Chhipa, R. R., Nakano, I. & Dasgupta, B. The AMPK Inhibitor Compound C Is a Potent AMPK-Independent Antiglioma Agent. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 596–605 (2014).
126. Stone, J. D. *et al.* AMP-activated protein kinase inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration and vascular remodeling following injury. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **304**, H369–H381 (2013).
127. Lassiter, D. G. *et al.* FAK tyrosine phosphorylation is regulated by AMPK and controls metabolism in human skeletal muscle. *Diabetologia* **61**, 424–432 (2018).
128. Guo, Y., Steele, H. E., Li, B. Y. & Na, S. Fluid flow-induced activation of subcellular AMPK and its interaction with FAK and Src. *Arch. Biochem. Biophys.* **679**, (2020).

Y así pasa la vida, descrita como ondulaciones, expresada a nivel celular como fosforilaciones, un simple movimiento temporal que define el comportamiento celular; y que puede tener efectos increíbles en la estructura y función de un tejido.

¿En qué momento de la red transduccional te posicionaste? En algún punto en el que la curva dosis respuesta me permitió ser observadora por un instante.

¿Te percataste de como brillan las células cuando mueren? Yo me di cuenta de ese hermoso destello, como una estrella cuya existencia ya paso, y cuya energía vuelve a ser parte del gran universo.

¿De qué depende la activación? Depende de lo que tenga la célula dentro para encender.

Las deducciones y la manera que me hizo pensar y reaccionar el crear una idea; explicando un nuevo mecanismo molecular de mi elección de movimiento diaria.

Sumergida en lo profundo, ahora salgo hacia la orilla. Me propongo respirar y disfrutar un poco más mi existencia.

“Look inside of universe is the most difficult mission but is the most interesting and beautiful experience”.