

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Expresión de las mioquinas IL-6 y Miostatina en
aorta de ratón C57BL/6J durante el ejercicio
físico agudo tipo endurance***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica, área de Especialización en Toxicología y
Diagnóstico Molecular, y Memoria para optar al Título de Bioquímico
por:

NICOLE ESTER CANCINO ARENAS

Directores de Tesis: Dr. Mario Chiong Lay
Dr. Rodrigo Troncoso

Santiago-Chile
Octubre 2021

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

NICOLE ESTER CANCINO ARENAS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día 4 de noviembre del año 2021.

Directores de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay

Dr. Rodrigo Troncoso

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes

Dr. Mario Rivera

Dra. Sonja Buvinic

Dedicatoria

Primeramente, a Dios, sin Él no sería nada. A mis padres, hermanas, a mis abuelos y familia en general, son mi pilar fundamental. A mis amigos y a aquellas personas que estuvieron dándome ánimo y reconfortándome en este largo proceso. A todos ellos está dedicado este trabajo.

Agradecimientos

Primeramente, quiero dar gracias a Dios por ayudarme a terminar esta etapa universitaria y comenzar mi vida profesional, sin Él no hubiese sido posible. Luego, a mi familia que estuvo apoyándome desde un inicio y alegrándose conmigo desde que supe que había quedado seleccionada en la carrera de bioquímica. Ellos me dieron ánimo cuando ya no podía con la frustración y siempre me alentaron, son únicos. Quiero agradecer a la universidad de Chile por los conocimientos entregados en cada curso que tuve que tomar. Al profesor Mario Chiong, que desde un inicio me recibió muy bien en su laboratorio y me apoyo en todo, analizando datos conmigo y teniendo siempre disposición para agendar reuniones y resolver mis dudas. Así también, al profesor Rodrigo Troncoso que me ayudó a interiorizarme en el tema del trabajo con animales, siempre tuvo la disposición para realizar reuniones y me ayudó mucho a preparar mi anteproyecto junto a su laboratorio. También, quiero agradecer a mi equipo de trabajo en el INTA, en especial a Francisco Díaz que estuvo apoyándome desde el primer día en todo lo que tuve que hacer y aprender respecto al trabajo con animales; y así a cada integrante del laboratorio que, aunque no me conocieran, me ayudaron a resolver dudas de la parte fisiológica de mi tesis. Quiero Agradecer también enormemente a mi laboratorio LTSM, porque desde llegué, me integraron muy bien y siempre me ayudaron en todo. Pude conocer gente muy linda a los que hoy en día puedo llamar, *amigos*; porque no solo se preocupan de la parte académica, sino por temas de la vida en general. Gracias al carácter de cada integrante se ha podido lograr formar un equipo de trabajo especial. Todos siempre han estado dispuestos a ayudarme y contestar preguntas. El mundo realmente sería un lugar mejor si cada laboratorio tuviese el ambiente laboral que se logra en este. Quiero agradecer también a Don Fidel, a la Sra. Gindra y a Apu por tener siempre la mejor disposición para responder cualquier duda que tuviera en cuanto a metodologías o para ayudarme a encontrar reactivos dentro del laboratorio. A mis amigos que estuvieron alentándome, incluso a aquellas personas que hoy ya no están en mi vida, pero que en su momento me apoyaron, a todos, muchas, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| TABLA DE CONTENIDOS..... | 1 |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 3 |
| INDICE DE TABLAS..... | 5 |
| ABREVIATURAS..... | 6 |
| RESUMEN | 8 |
| SUMMARY | 9 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 1.1. Células musculares lisas vasculares | 10 |
| 1.2. Enfermedades cardiovasculares y el ejercicio | 10 |
| 1.3. Mioquinas..... | 12 |
| 1.3.1. IL-6..... | 13 |
| 1.3.1.1. IL-6 en ejercicio | 14 |
| 1.3.1.2. Señalización de IL-6 | 14 |
| 1.3.1.3. IL-6 y VSMC | 15 |
| 1.3.2. Miostatina..... | 16 |
| 1.3.2.1. Señalización de Miostatina | 16 |
| 1.3.2.2. Miostatina en VSMC | 17 |
| 1.3.2.3. Miostatina y el ejercicio..... | 17 |
| 2. HIPÓTESIS | 19 |
| 3. OBJETIVO GENERAL..... | 19 |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 19 |
| 5. METODOLOGÍA..... | 20 |
| 5.1. Trabajo con animales de experimentación | 20 |
| 5.2. RT-qPCR | 20 |

| | |
|---|----|
| 5.3. Cuantificación de proteínas | 22 |
| 5.4. ELISA..... | 23 |
| 5.5. Histología | 23 |
| 5.5.1. Procesamiento de tejidos..... | 23 |
| 5.5.2. Inmunohistoquímica para SM22 α , IL-6 y Miostatina..... | 23 |
| 5.6. Análisis estadístico..... | 24 |
| 5.6.1. Cálculo tamaño muestral | 24 |
| 5.6.2. Análisis de datos:..... | 25 |
| 6. RESULTADOS | 26 |
| 6.1. Estandarización trabajo con animales | 26 |
| 6.2. Estandarización de la técnica de RT-qPCR..... | 28 |
| 6.3. Cinética de expresión de mRNA de IL-6 y Miostatina por acción del ejercicio agudo tipo <i>endurance</i> | 31 |
| 6.4. Cinética de expresión proteica de IL-6 y Miostatina en aorta de ratón por acción del ejercicio agudo tipo <i>endurance</i> | 36 |
| 6.4.1. IL-6 | 36 |
| 6.4.2. Miostatina | 41 |
| 6.5. Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de SM22 α , IL-6 y Miostatina. .. | 44 |
| 6.6. Detección de IL-6 y Miostatina en VSMC de aorta de ratón a diferentes tiempos de ejercicio <i>endurance</i> | 47 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 49 |
| 8. PROYECCIONES..... | 57 |
| 9. CONCLUSIONES | 58 |
| 10. REFERENCIAS | 59 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|-----------|
| Figura 1. | Respuestas agudas del organismo al ejercicio. | 11 |
| Figura 2. | Vías de señalización de IL-6..... | 15 |
| Figura 3. | Vías de señalización de Miostatina..... | 17 |
| Figura 4. | Protocolo de extracción de RNA a partir de aorta de ratón C57BL/6J..... | 29 |
| Figura 5. | Estandarización de partidores para RT-qPCR. | 30 |
| Figura 6. | <i>Cinética de expresión aguda de mRNA de IL-6 y Miostatina en diferentes músculos, primer protocolo.....</i> | <i>32</i> |
| Figura 7. | Cinética de expresión aguda de mRNA de IL-6 en diferentes músculos y normalizada por diferentes genes housekeeping (protocolo nuevo). | 34 |
| Figura 8. | Cinética de expresión aguda de mRNA de Miostatina en diferentes músculos y normalizada por diferentes genes housekeeping (Protocolo nuevo). | 35 |
| Figura 9. | Curva de calibración para kit ELISA IL-6 ab222503..... | 37 |
| Figura 10. | Gráficos descriptivos de los datos obtenidos por el kit ELISA de IL-6 ab222503. | 38 |
| Figura 11. | Curva de calibración para kit ELISA IL-6 ab100713..... | 39 |
| Figura 12. | Gráficos descriptivos de los datos obtenidos por el kit ELISA de IL-6 ab100713. | 40 |
| Figura 13. | Expresión proteica de IL-6 a diferentes tiempos de ejercicio (protocolo nuevo). | 41 |
| Figura 14. | Curva de calibración para kit ELISA Miostatina (protocolo nuevo)..... | 42 |
| Figura 15. | Gráficos descriptivos de los datos obtenidos por el kit ELISA de Miostatina (protocolo nuevo)..... | 43 |

| | |
|--|----|
| <i>Figura 16. Expresión proteica de Miostatina a diferentes tiempos de ejercicio</i> <i>(protocolo nuevo)</i> | 44 |
| Figura 17. Detección de SM22 α en aorta mediante inmunohistoquímica (protocolo nuevo). | 45 |
| Figura 18. Detección de IL-6 en aorta mediante inmunohistoquímica (protocolo nuevo). | 46 |
| Figura 19. Detección de Miostatina en aorta mediante inmunohistoquímica (protocolo nuevo)..... | 47 |
| Figura 20. Semicuantificación de los niveles proteicos de IL-6 y Miostatina en aorta de ratón (protocolo nuevo)..... | 48 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 1. | Cálculo de datos para RT-qPCR mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ | 22 |
| Tabla 2. | Datos de ratones cepa C57BL/6J utilizados en la cinética de expresión aguda de mioquinas. | 26 |
| Tabla 3 | Datos de ratones cepa C57BL/6J utilizados en el protocolo optimizado de cinética de expresión aguda de mioquinas. | 27 |
| Tabla 4. | Tiempo de corrida de cada ratón C57BL/6J <i>All-Out</i> (AO). | 28 |
| Tabla 5. | Comparación entre protocolos de ejercicio tipo endurance realizados con ratones C57BL/6J para expresar IL-6... .. | 50 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| 4pl | : Regresión logística de 4 parámetros |
| α -SMA | : α -actina de músculo liso |
| ActRIIB | : Receptor de membrana activin IIB |
| Alk | : Receptor de activin tipo quinasa |
| AO | : <i>All-out</i> , hasta la fatiga |
| BSA | : Albúmina de suero de bovino |
| cDNA | : DNA complementario |
| CVD | : Enfermedades cardiovasculares |
| DAB | : 3,3-diaminobenzidina |
| DNA | : Ácido desoxirribonucleico |
| EDTA | : Etilén diamino tetra acetato |
| ELISA | : Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| FGF21 | : Factor de crecimiento de fibroblasto 21 |
| Fw | : <i>Forward</i> |
| GDF8 | : Factor de diferenciación de crecimiento 8 o miostatina |
| GDF-15 | : Factor de diferenciación de crecimiento 15 |
| gp130 | : Glicoproteína 130 |
| h | : Hora |
| IL-6R | : Receptor de IL-6 |
| INTA | : Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos |
| IL | : Interleuquina |
| IL-1ra | : Agonista del receptor IL-1 |
| kDa | : Kilodalton |
| LIF | : Factor inhibidor de leucemia |
| LPS | : Lipopolisacárido |
| min | : Minutos |
| mRNA | : RNA mensajero |
| PCR | : Proteína C reactiva |
| PDGF-BB | : Factor de crecimiento derivado de plaquetas isoforma BB |
| RNA | : Ácido ribonucleico |

| | |
|---------|---|
| sIL-6R | : Receptor soluble de IL-6 |
| m | : Metro |
| M | : Molar |
| mg | : Miligramo |
| min | : Minuto |
| mL | : Mililitro |
| µg | : Microgramo |
| µL | : Microlitro |
| µm | : Micrómetro |
| n | : Nano |
| nM | : Nanomolar |
| p/v | : Peso/volumen |
| PBS | : Amortiguador fosfato salino |
| qPCR | : Reacción de polimerización en cadena en tiempo real |
| rpm | : Revoluciones por minuto |
| RT-qPCR | : qPCR acoplado a transcripción reversa. |
| Rv | : <i>Reverse</i> |
| seg | : Segundo |
| SM22α | : Músculo liso 22α |
| SM-MHC | : Cadena pesada de la miosina de músculo liso |
| TBS | : Amortiguador Tris salino |
| TGF-β | : Factor transformante de fibroblasto- β |
| VAM | : Velocidad aeróbica máxima |
| VEGF | : Factor de crecimiento endotelial vascular |
| VSMC | : Células musculares lisas vasculares |

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares, son la principal causa de mortalidad en el mundo y la actividad física es clave en su prevención. Durante el ejercicio, el músculo esquelético secreta mioquinas que están encargadas de coordinar su actividad con otros sistemas biológicos, satisfaciendo el requerimiento energético del organismo. Entre estas mioquinas encontramos a interleuquina-6 (IL-6) que aumenta sus niveles de mRNA y proteína luego de realizar actividad física y a Miostatina que los disminuye. Se han reportado adaptaciones de la vasculatura a la actividad física y es conocido que IL-6 y Miostatina son expresadas por las células musculares lisas vasculares (VSMC), principal componente de la capa media de la aorta. No obstante, se desconoce si el ejercicio regula su expresión en VSMC. Por lo tanto, la hipótesis de este trabajo es: “El ejercicio agudo tipo *endurance* induce un aumento de mRNA y proteína de IL-6 y disminuye los de Miostatina en aorta de ratón C57BL/6J”. Los objetivos específicos son: 1) Estandarizar el modelo experimental y las condiciones de trabajo de cada técnica asociada. 2) Determinar el efecto del ejercicio agudo sobre la expresión de IL-6 y Miostatina en aorta de ratón C57BL/6J. Para comprobar esta hipótesis, se optimizó un protocolo de ejercicio agudo, en el que ratones C57BL/6J se dividieron en grupos y se sometieron a diferentes tiempos de ejercicio (0, 30, 60, 90 min y grupo *all-out*, AO) al 60% de su velocidad aeróbica máxima (VAM). En aorta se determinaron los niveles de mRNA de IL-6 y Miostatina mediante RT-qPCR y sus niveles proteicos mediante ELISA e inmunohistoquímica (IHQ). Se mostró que ambas mioquinas son expresadas en VSMC de aorta de ratón. Se observó una tendencia al aumento de mRNA a partir de los 90 min de ejercicio para ambas mioquinas. La expresión de Miostatina aumenta sin ser estadísticamente significativa, a los 90 min (ELISA) y por IHQ desde los 30 min se observa una tendencia a aumentar. En el caso de IL-6, mediante ELISA, se observa una leve disminución a los 30 min y una tendencia a su aumento desde los 60 min siendo cercano a la significancia en el grupo AO y mediante IHQ, esta disminuye a los 60 min y luego aumenta significativamente en el grupo AO. Se concluye que las VSMC expresan ambas mioquinas por acción del ejercicio agudo tipo *endurance*. Sin embargo, aún faltan experimentos para determinar cuál es el efecto de este tipo de ejercicio sobre la expresión de cada una.

SUMMARY

Expression of myokines IL-6 and Myostatin in C57BL/6J mouse aorta during endurance-like acute exercise

Cardiovascular diseases are the main cause of mortality worldwide and physical activity is a key factor in the prevention of these diseases. Myokines are secreted during exercise from skeletal muscle, and they are responsible for coordinating muscle activity with other biological systems to satisfy body's energy requirement. Among these myokines, interleukin-6 (IL-6) and Myostatin are described. After physical activity, IL-6 mRNA and protein increase their levels, while those of Myostatin decrease. In the literature, exercise-induced vasculature adaptation has been reported. IL-6 and Myostatin are expressed by vascular smooth muscle cells (VSMC), the main component of the middle layer of arteries such as aorta. Therefore, the hypothesis of this work is: "Acute endurance-like exercise induces IL-6 mRNA and protein increase and decreases those of Myostatin in C57BL/6J mouse aorta". The specific objectives are: 1) To standardize the experimental model and working conditions of each associated technique. 2) To determine the effect of acute exercise on IL-6 and Myostatin expression in C57BL/6J mouse aorta. To test this hypothesis, an acute exercise protocol was optimized. C57BL/6J mice were divided into groups and submitted to exercise by different times (0, 30, 60, 90 min and all-out (AO) group) at 60% of their maximum aerobic speed (MAS). Subsequently, IL-6 and Myostatin mRNA levels were determined in aorta by RT-qPCR and their protein levels by ELISA and immunohistochemistry (IHC). Both myokines are expressed in mouse aortic VSMC. Trends of increase in mRNA are observed after 90 min of both myokines. Myostatin expression increases without being statistically significant, at 90 min (ELISA) and by IHC there is a tendency to increase from 30 min. In the case of IL-6, when analyzing its expression by ELISA, a slight decrease is observed at 30 min and a tendency to increase from 60 min, being close to significance in the AO group. When we analyze its expression by immunohistochemistry, a decrease at 60 min and then a significant increase in the AO group were observed. In conclusion, VSMC express both myokines by action of acute endurance exercise. However, more experiments are necessary to determine the effect of this type of exercise on the expression of each one.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Células musculares lisas vasculares

Las células musculares lisas vasculares (VSMC) son el principal componente de la capa media de las arterias. Estas células en animales adultos son altamente especializadas y su función principal es regular el tono vascular y, por consiguiente, regular la presión y el flujo sanguíneo.¹ Las VSMC, a diferencia de otras células como las del músculo esquelético o cardíaco, una vez diferenciadas pueden sufrir cambios profundos y reversibles que inducen su desdiferenciación. Este proceso se conoce como cambio fenotípico.¹

El estado diferenciado, se caracteriza por presentar una baja tasa de proliferación, baja actividad de sintetizar componentes de la matriz extracelular y por la expresión de un repertorio único de proteínas contráctiles.¹ Entre ellas encontramos a α -actina de músculo liso (α -SMA), músculo liso 22 α (SM22 α), cadena pesada de la miosina de músculo liso (SM-MHC) y calponina.¹ Por otra parte, el estado desdiferenciado se caracteriza por presentar una alta tasa de proliferación, migración y producción de componentes de la matriz extracelular, como por ejemplo colágeno, proteoglicanos y elastina.¹ Este cambio fenotípico ocurre en el remodelado vascular, en la vasculogénesis y también en respuesta a daño vascular.¹ Existe una gran cantidad de inductores de esta diferenciación, entre ellos encontramos al factor de crecimiento derivado de plaquetas isoforma BB (PDGF-BB), angiotensina II, factor de crecimiento de fibroblasto- β 1 (TGF- β 1) y el ejercicio.^{1,2}

1.2. Enfermedades cardiovasculares y el ejercicio

Las enfermedades cardiovasculares (CVD), son desórdenes provocados principalmente por fallas vasculares que impiden el flujo sanguíneo al corazón o al cerebro. Son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo.^{3,4} En 2019, se estima que un total de 17,9 millones de defunciones mundiales fueron a causa de las CVD, esto quiere decir un 32% del total de muertes. Entre estas enfermedades

encontramos, por ejemplo, la cardiopatía coronaria, la enfermedad cerebrovascular y la arteriopatía periférica.⁴

Hoy en día se sabe que la actividad física es clave en la prevención de las CVD, ya que mejora la condición física y combate enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, mejorando así, su calidad de vida.^{5, 6} Estos efectos se logran mediante mecanismos que involucran un aumento de la capacidad cardiorrespiratoria, reducción de lípidos circulantes, mantención de la masa muscular y disminución de la inflamación.^{6,7} En la figura 1, se resumen las respuestas agudas del organismo al ejercicio.

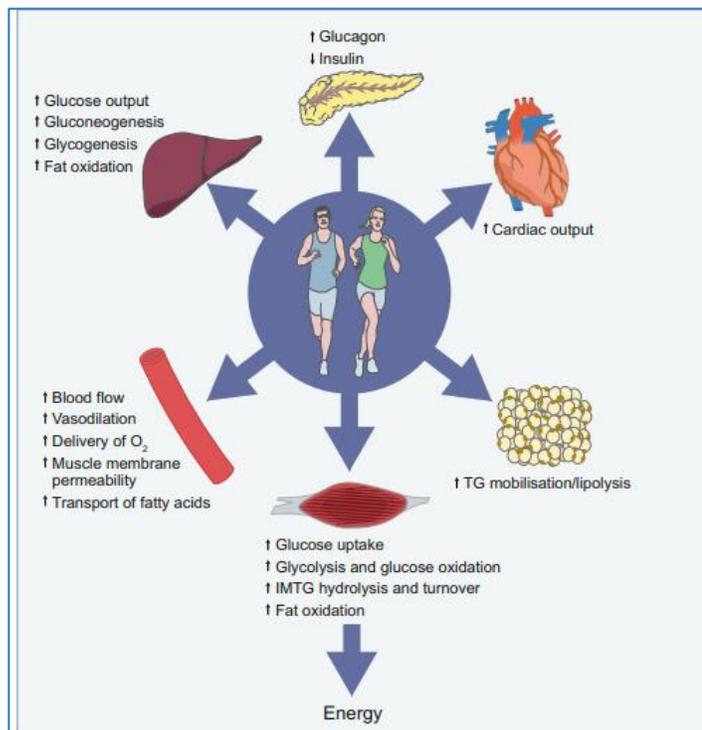


Figura 1. Respuestas agudas del organismo al ejercicio.

En la imagen se resumen las adaptaciones de órganos periféricos al ejercicio agudo. Imagen adaptada de Thyfault J, 2020.⁸

El ejercicio físico puede dividirse en dos categorías. Por un lado, se encuentra el de tipo aeróbico (resistencia cardiovascular, *endurance*) que aumenta la capacidad respiratoria y el contenido mitocondrial. Por otra parte, está el tipo anaeróbico (fuerza, *resistance*), que induce hipertrofia muscular aumentando la fuerza contráctil.⁹ Sus

efectos pueden variar dependiendo de la regularidad con la que se practica y de la intensidad de este. En el caso de una sola sesión de ejercicio extenuante, se induce en el cuerpo una respuesta similar a aquella provocada por sepsis o una infección, ya que aumentan los marcadores de inflamación.¹⁰ En caso de ejercitarse regularmente de forma moderada, aumenta la oxigenación del cerebro al acrecentar el flujo sanguíneo; aumenta la lipólisis del tejido adiposo, y permite una mejor disipación del calor al aumentar la velocidad de sudoración; disminuye la acumulación de grasa en el hígado; y aumenta el consumo de glucosa en el músculo esquelético.¹⁰ Interesantemente, en atletas de alto rendimiento se ha observado que el ejercicio induce un remodelado fisiológico vascular, estimulando la formación de nuevos capilares por angiogénesis y aumentando el tamaño de arterias por arteriogénesis.¹¹ Esto favorece el consumo energético y de oxígeno durante el ejercicio.

1.3. Mioquinas

El músculo esquelético es considerado como el principal blanco y efector de la actividad física, ya que es el único órgano capaz de aumentar 1000 veces su gasto energético.¹² Además, es el encargado de secretar los llamados “factores del ejercicio” que lo comunican con otros sistemas biológicos como el cardiovascular, satisfaciendo así el requerimiento energético del organismo durante la actividad física.^{6,12} Estos factores se denominan mioquinas, y se asume que ellas son en parte responsables de promover los efectos benéficos del ejercicio.¹³ El término fue acuñado por primera vez hace diez años por el grupo de Pedersen, al descubrir la secreción de IL-6 desde el músculo esquelético durante el ejercicio.¹⁴ Debido a esto, el músculo esquelético es considerado como un órgano endocrino^{15,16} y su secretoma es denominado mioquinoma.¹⁷

Las mioquinas son “citoquinas o péptidos producidos por células del músculo esquelético y que posteriormente son liberados a la circulación para ejercer efectos paracrinos o autocrinos en otras células, tejidos u órganos”.¹⁵ Sin embargo, hoy se sabe que estas citoquinas no son liberadas únicamente por el músculo esquelético. El tejido adiposo también secreta una importante cantidad de ellas (adipoquinas).¹⁸ Aquellas que

son secretadas por ambos, reciben el nombre de adipomioquinas.^{18,19} Además, el hígado y corazón liberan mioquinas conocidas como hepatoquinas y cardioquinas respectivamente.²⁰ Dado que el ejercicio induce adaptaciones a nivel vascular, proponemos que el músculo liso también es capaz de secretar estas mioquinas.

La producción de mioquinas es inducida por estrés metabólico y por el ejercicio. En el primer caso encontramos mioquinas como el GDF-15 (del inglés *growth differentiation factor-15*) que es un marcador general de enfermedades y está siendo estudiado como un biomarcador de cáncer, daño cardíaco y mal funcionamiento renal^{21,22} y el FGF21 (*fibroblast growth factor*) que actúa como regulador del metabolismo de glucosa y lípidos.^{23,24} En el segundo caso, se encuentran las mioquinas inducidas por el ejercicio.²⁵ Entre ellas está la interleuquina 7 (IL-7), el factor inhibidor de leucemia (LIF), y mionectina.⁹ Algunas como interleuquina-6 (IL-6) aumentan su expresión y otras como Miostatina (GDF-8) la disminuyen.⁹ El trabajo se enfocará en estas dos últimas mioquinas.

1.3.1. IL-6

IL-6 es la citoquina representativa de la superfamilia de IL-6, presentando homología con otras citoquinas como IL-27, IL-11 e IL-3.²⁶ Es una proteína de 22 a 27 kDa que es sintetizada a partir de un propéptido de 212 aminoácidos.²⁶ IL-6 es secretada por una gran variedad de tipos celulares entre los que encontramos macrófagos, linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales.¹⁸ Existen autores que indican que cualquier tipo celular podría liberar IL-6 si se estimula correctamente.²⁷ Debido a que es ampliamente expresada, se han descrito diversos roles para esta proteína. Se ha reportado que IL-6 induce la proliferación de células satélite, ya que regula los genes *cyclin D* y *c-myc* asociados a ciclo celular.²⁸ Además, en la línea celular C2C12 y en cultivo primario de mioblastos humanos, IL-6 a bajas concentraciones induce proliferación, pero a concentraciones elevadas induce la diferenciación de mioblastos.²⁹ Sin embargo, la función a la cual se le relaciona predominantemente es participar en procesos inflamatorios agudos.³⁰ En este caso, IL-6, puede inducirse en macrófagos por acción de TNF- α , NF- κ B o por lipopolisacárido (LPS).²⁷ IL-6, en su acción proinflamatoria

estimula la síntesis de la proteína C reactiva (PCR), proteínas del sistema del complemento y de la cascada de la coagulación.³⁰ Se ha descrito también su participación en la diferenciación y maduración de linfocitos T y B. Además, induce el desarrollo de linfocitos T ayudadores 17 (Th17), lo que provoca un aumento de la citoquina proinflamatoria IL-17 la cual se encarga de reclutar células del sistema inmune en tejidos periféricos.³¹

1.3.1.1. IL-6 en ejercicio

IL-6 fue la primera mioquina que se descubrió, y por ende es también la más estudiada, y es liberada luego de la contracción del músculo esquelético.¹⁴ Posterior a la actividad física los niveles de IL-6 pueden elevarse hasta 100 veces en plasma y esto se correlaciona con la duración e intensidad del ejercicio.^{15,18,32} Se ha observado una relación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y los niveles de mRNA en músculo esquelético.²⁵ Como mioquina, IL-6 ejerce una acción autoparacrina en músculo esquelético y endocrina al actuar similar a una hormona para mediar efectos metabólicos. Además, posee propiedades antiinflamatorias y cardioprotectoras.^{14,33} De hecho, por acción del ejercicio inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias clásicas como TNF- α e IL-1 β y, además, promueve la expresión de factores antiinflamatorios como IL-10 e IL-1ra (IL-1 *receptor agonist*) en respuesta a ejercicio.^{14,15,34} Por lo tanto, IL-6 tiene un rol dual, ya que no solo tiene un efecto pro-inflamatorio como citoquina, sino que también tiene efectos antiinflamatorios como mioquina.

1.3.1.2. Señalización de IL-6

Su vía de señalización es mediante gp130 (*glycoprotein 130*).^{18,35} Lo primero que ocurre es la unión de IL-6 a su receptor de membrana, IL-6R, una glicoproteína de 80 kDa que posee un dominio transmembrana de 82 aminoácidos.³⁶ Posee un pequeño extremo carboxilo terminal citoplasmático, lo que impide que pueda generar una respuesta celular por sí mismo.³⁶ Posteriormente, el complejo IL-6/IL-6R se asocia con el co-receptor gp130, una glicoproteína de membrana que se expresa de forma ubicua en todas las células. De este modo, se induce su homodimerización y se inicia la

señalización activando la vía JAK/STAT.²⁶ Ese mecanismo se conoce como la vía de señalización clásica o canónica.³⁷

Se ha descrito la existencia de una forma soluble para el IL-6 (sIL-6R) en fluidos como sangre.³⁷ Este receptor soluble es producido preferencialmente por un corte proteolítico del receptor unido a membrana llevado a cabo por las metaloproteinasas ADAM17 y ADAM10³⁸ o por *splicing* alternativo.^{39,40} IL-6 tiene una expresión limitada a ciertos tipos celulares como hepatocitos y leucocitos. De esta manera, la unión de IL-6 a su receptor soluble permite formar el complejo sIL-6R/IL-6. Este complejo puede estimular células que sólo expresan gp130 y no el IL-6R de membrana. La unión de sIL-6R/IL-6 a la glicoproteína gp130 es capaz de activar la vía de señalización JAK/STAT. Este último mecanismo se conoce como trans-señalización o vía no canónica.²⁶ Estas vías se encuentran diagramadas en la Figura 2.

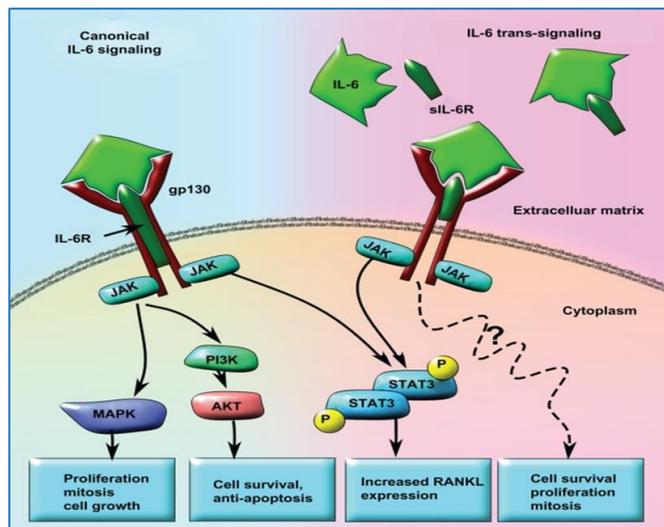


Figura 2. Vías de señalización de IL-6.

En la imagen se muestran las vías canónica (clásica) y no canónica (trans-señalización) de IL-6. Imagen adaptada de Tawara K, 2011.⁴¹

1.3.1.3. IL-6 y VSMC

IL-6 es sintetizada también por las VSMC.⁴²⁻⁴⁴ En este tipo celular su expresión es inducida tanto por estímulos inflamatorios, por ejemplo TNF- α como por estímulos no inflamatorios como PDGF-BB y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).⁴⁵⁻⁴⁷

El VEGF, un factor de crecimiento inductor de angiogénesis, induce la expresión de IL-6⁴⁸ y se ha reportado en literatura que esta mioquina induce la migración de VSMC de cultivos primarios de aorta de rata ⁴⁷y, se mostró que induce la proliferación de células lisas musculares cerebrales⁴⁹.

Como se señaló más arriba, la fuente principal de IL-6 durante el ejercicio es el músculo esquelético. Sin embargo, no es la única.²⁷ Se ha descrito que durante el ejercicio agudo también aumentan los niveles de mRNA de IL-6 en tejido adiposo y tendón.^{25,50} Sin embargo, aún no se sabe si el ejercicio induce la expresión de IL-6 en VSMC, por lo que en este trabajo trataremos de resolver esta interrogante.

1.3.2. Miostatina

Miostatina, también conocida como GDF 8, es una proteína de 26 kDa producida principalmente por el músculo esquelético y corazón.^{51,52} Circula en la sangre como un dímero inactivo que ejerce funciones en tejido muscular.⁵³ GDF 8, pertenece a la familia del TGF- β . Es un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético, actúa de forma auto y paracrina, e inhibe la proliferación y diferenciación de células satélite durante la regeneración del músculo.^{52,54} Su función es conservada en diferentes especies.⁵⁵ En animales que poseen una mutación en este gen, se ha observado un aumento de la masa muscular. El caso más emblemático es el del toro belga azul, pero también se ha visto este efecto en ovejas y en humanos.⁵⁶⁻⁵⁸

1.3.2.1. Señalización de Miostatina

La Miostatina se sintetiza como un precursor proteico compuesto en el extremo amino terminal por el propéptido y el en el extremo carboxilo terminal por el péptido maduro.⁵⁵ El precursor es proteolizado y luego se forma un dímero activo del extremo carboxilo terminal de 26 kDa.⁵⁵ Para llevar a cabo la regulación negativa de la miogénesis, el dímero activo de Miostatina debe unirse a su receptor de membrana activin IIB (ActRIIB). Este receptor recluta y fosforila al receptor de activin tipo quinasa (Alk) 4 y 5, activándolo.⁵⁵ Los receptores Alk 4 y Alk 5 fosforilan y activan las proteínas Smad2 y Smad3 las que forman un heterodímero con Smad4. El complejo heterodimérico se trasloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción

reprimiendo la transcripción de genes como Pax3, MyoD y Myf5.^{52,54,55} De esta forma se inhibe la proliferación de los mioblastos y su diferenciación a miotubos.⁵⁶ En la Figura 3, se encuentra diagramada su vía de señalización.

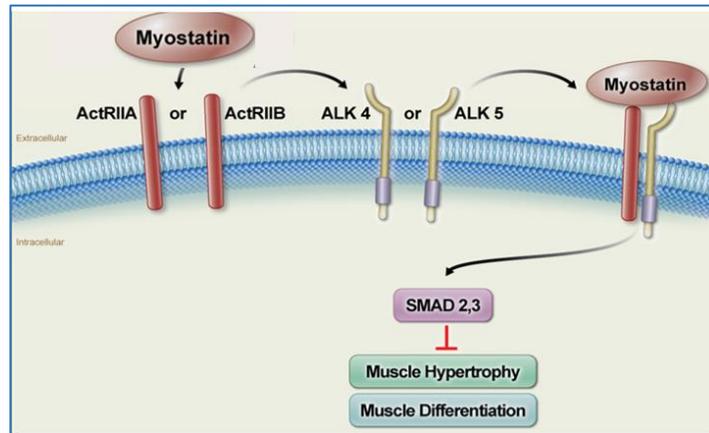


Figura 3. Vías de señalización de Miostatina.

En la figura se muestra la vía de transducción de Miostatina. Imagen adaptada de Lee S *et al.*, 2011.⁶⁰

1.3.2.2. Miostatina en VSMC

Miostatina ha sido identificada en cultivo de VSMC.⁶¹ Se ha descrito que inhibe el crecimiento de células miometriales de útero de rata y también disminuye su número de manera dosis dependiente. Además, se describió que estas células de músculo liso expresaban Miostatina.⁶² Esta mioquina también se expresa en VSMC en lesiones ateroscleróticas y en la pared vascular del pene de rata.⁶³

1.3.2.3. Miostatina y el ejercicio

Miostatina es una mioquina que es conocida por disminuir su expresión posterior al ejercicio.^{9,54} En ratas Wistar que han sido sometidas a un experimento de ejercicio agudo (corren solo una vez) o que son entrenados durante días, los niveles de mRNA de Miostatina en los músculos gastrocnemio y *vastus lateralis* disminuyen y esta disminución es significativa hasta 7 h después de terminado el protocolo de ejercicio.⁶⁴ También se ha descrito una disminución a nivel plasmático en hombres que se sometieron a un protocolo de ejercicio de fuerza durante 8 semanas.⁶⁵ Sin embargo, al

igual que con IL-6, no existen trabajos que evidencien la disminución en la expresión de Miostatina en músculo liso a causa del ejercicio.

Resumiendo, las CVD son un problema de gran importancia en salud pública de Chile, ya que es la principal causa de muerte a nivel nacional. Por esta razón, son necesarios los estudios enfocados en el proceso de desarrollo de estas patologías. El ejercicio, es clave en la prevención de estas enfermedades, ya que reduce los lípidos circulantes y además mejora la aptitud cardiorrespiratoria. Se ha observado que el ejercicio de resistencia produce adaptaciones vasculares, lo que favorece el consumo energético y de oxígeno durante el ejercicio. El músculo esquelético, durante el ejercicio secreta un conjunto de hormonas llamadas mioquinas que comunican este músculo con otros sistemas satisfaciendo el gasto energético. Se asume que en parte son ellas las responsables de los efectos benéficos del ejercicio. Entre estas mioquinas encontramos a IL-6 y Miostatina. Se han publicado estudios en los que se demuestra la expresión de ambas mioquinas en VSMC. Sin embargo, no se sabe si su expresión es regulada por la actividad física. Por lo tanto, la hipótesis que se buscará comprobar es que:

2. HIPÓTESIS

El ejercicio agudo tipo *endurance* induce un aumento de mRNA y proteína de IL-6 y disminuye los de Miostatina en aorta de ratón C57BL/6J.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el ejercicio agudo tipo *endurance* induce la expresión de IL-6 y disminuye la de Miostatina en aorta de ratones C57BL/6J.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1) Estandarizar el modelo experimental y las condiciones de trabajo de cada técnica asociada.

2) Determinar el efecto del ejercicio agudo sobre la expresión de IL-6 y Miostatina en aorta de ratón C57BL/6J.

5. METODOLOGÍA

5.1. Trabajo con animales de experimentación

En este trabajo se utilizó aortas de ratones de 8 semanas de la cepa C57BL/6J obtenidos desde el bioterio del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Estos ratones, se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura (ciclos de 12 h luz / 12 h oscuridad a 22°C), con agua y alimento *ad libitum*. Los ratones se entrenaron en una corredora adaptada para su uso. Primero, se realizó un proceso de aclimatación a la corredora durante una semana. En este proceso corrieron tres días a la semana considerando al menos un día de descanso previo al día de la evaluación de la velocidad aeróbica máxima (VAM). El primer día de aclimatación corrieron con una pendiente de 5% a 5 m/min por 10 min. El segundo día, con un 5% de inclinación corrieron 10 min a 5 m/min. En el tercer día, corrieron con una pendiente de 5% a 5 m/min, 10 m/min, 13,3 m/min. Cada velocidad se mantuvo por 5 min. Después, se evaluó la VAM de cada ratón utilizado. En este proceso, los ratones corrieron a 5 m/min por 5 min. Después la velocidad aumentó 1,6 m/min cada 3 min hasta que el ratón no pudo seguir o tocó más de 5 veces la parte posterior de la caja. Además, el ratón debía correr por al menos 2 min a cada velocidad, de lo contrario la velocidad que completó es la anterior. La cinética de ejercicio agudo correspondió a ratones en ayunas de 6 h que comenzaron a correr a las 16:00 cada día al 60% de su VAM individual por 0, 30, 60, 90 min y hasta la fatiga (grupo *all-out*, AO) e inmediatamente se anestesiaron con isoflorano 100% y se eutanasiaron. Luego, las aortas y cuádriceps se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La sangre se extrajo desde la vena cava inferior y se depositó en tubos con EDTA (etilén diamino tetra acetato), se centrifugó a 1500 rpm por 10 min y el plasma obtenido se guardó en alícuotas de 40 µL a -80°C. La aorta ascendente destinada a análisis histológico se guardó en tubos con formalina tamponada a temperatura ambiente durante 24 h.

5.2. RT-qPCR

La mitad superior de la aorta y 15-20 mg de cuádriceps se descongelaron en hielo para extraer RNA con Trizol™ (Invitrogen, 15596018) y GlycoBlue™ (15 mg/mL,

AM9515). Brevemente, el trozo de aorta se dejó en 200 μ L de Trizol™ y se homogenizó dos veces por 20 seg a 5000 rpm en el equipo Minilys (Bertin technologies), luego se guardó a -80°C durante toda la noche. Posteriormente, los 200 μ L de Trizol™ se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron así 5 min más. Luego, se agregó 40 μ L de cloroformo (Merck, 102445) y se agitó en vortex durante 20 seg hasta formar la emulsión. Cuando se separaron las fases se centrifugó a 12000 \times g, durante 15 min a 4°C (Microcentrifuga Heraeus™ Fresco™ 17-75002420). Se extrajo 80 μ L de la fase acuosa y se agregó a 80 μ L de isopropanol (J.T Baker 9084-03), se homogenizó suavemente y se agregó 1 μ L de GlycoBlue™. Se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 12000 \times g, durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces con 200 μ L de etanol 75% frío (J.T Baker, 9000-03). Después de centrifugar a 7500 \times g, durante 8 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 5 min a temperatura ambiente. La pella se resuspendió en 20 μ L de agua destilada UltraPure™ DNase/RNase-Free (Invitrogen, 10977035).

La cuantificación se realizó en el equipo Nano Drop 2000 (ThermoFisher, ND-2000) asegurando la pureza del RNA mediante la relación 260/280. Luego, se realizó la retrotranscripción en el termociclador Biometra Tone (Analytik Jena, 846-2-070-301) utilizando el Supermix de transcripción reversa iScript (Bio-Rad, BR-1708841) trabajando con una concentración de RNA de 1 μ g. Después, para cada condición se preparó un tubo de 0,2 mL con 20 μ L totales (5 μ L de dilución de la muestra, 4 μ L de iScript, 11 μ L de agua destilada UltraPure™ DNase/RNase-Free). En el termociclador se escogió el programa de temperatura iScript LTSM (Priming: 5 min a 25°C, transcripción reversa: 20 min a 46°C, inactivación de la retrotranscriptasa: 1 min a 95°C). Una vez terminada la retrotranscripción, el cDNA se guardó a -20°C.

Para la estandarización de *primers* se realizó 5 diluciones seriadas de la muestra con un factor de dilución 1:5. Se probó diferentes concentraciones de cada par de partidores a un volumen final de 10 μ L. Las mediciones se hicieron en triplicado y para analizar los datos se escogió la opción “Quantitation- Standar Curve” en el equipo *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystem, 2720010032).

Luego, la qPCR se realizó utilizando 5 µL de *master mix PowerUp™ SYBR™ Green* (Applied Biosystem, A25742) por reacción. Los partidores utilizados, su secuencia y concentración (en un volumen final de 10 µL) fueron las siguientes: Miostatina (1 µM) Fw: 5'-GAG CCC AGG CAC TGG TAT TT-3' y Rv: 5'-AGG GAT TCA GCC CAT CTT CTC-3'; IL-6 (700 nM) Fw: 5'-CTC TGC AAG AGA CTT CCA TCC A-3' y Rv: 5'-GAC AGG TCT GTT GGG AGT GG-3'; β-actina (1 µM) Rv: 5'-TGT GCA CTT TTA TTG GTC TC-3' y Fw: 5'-GAT GTA TGA AGG CTT TGG TC-3'; 18S (250 nM) Fw: 5'-CCC TGC CCT TTG TAC ACA CC-3' y Rv: 5'-CGA TCC GAG GGC CTC ACT A-3'. Los dos últimos pares de partidores se utilizaron como genes *housekeeping*, cada par de partidores se adquirieron de IDT. La reacción se llevó a cabo en el equipo *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystem, 2720010032). Todas las mediciones se hicieron en triplicado. Los datos están expresados como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En la tabla 1 se muestra un ejemplo de este cálculo.

Tabla 1. Cálculo de datos para RT-qPCR mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Se muestra un ejemplo del cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En este caso se tomó como ejemplo la expresión de Miostatina (MSTN) normalizada por el gen housekeeping 18S. Tener en cuenta que $\Delta Ct = \text{promedio Ct MSTN} - \text{promedio Ct 18S}$
 $\Delta\Delta Ct = \text{promedio controles} - \Delta Ct$

| MSTN n1 | Ct1 | Ct2 | Ct3 | Promedio Ct MSTN | 18S n1 | Ct12 | Ct23 | Ct34 | Promedio Ct 18S | ΔCt | Promedio controles | ΔΔCt | 2-ΔΔCt |
|---------|--------|--------|--------|------------------|---------|--------|--------|--------|-----------------|--------|--------------------|----------|----------|
| control | 27,805 | 28,077 | 28,143 | 28,00823148 | control | 17,139 | 18,208 | 16,84 | 16,989419 | 11,019 | 10,69 | -0,32881 | 0,796192 |
| 30 | 28,327 | 28,306 | 28,115 | 28,24928347 | 30 | 16,959 | 16,855 | 16,985 | 16,93309 | 11,316 | | -0,62619 | 0,647883 |
| 60 | 26,985 | 27,128 | 26,922 | 27,01179949 | 60 | 17,426 | 16,949 | 17,178 | 17,184447 | 9,8274 | | 0,862647 | 1,818372 |
| 90 | 26,663 | 26,41 | 26,557 | 26,54325422 | 90 | 15,991 | 16,446 | 16,183 | 16,206465 | 10,337 | | 0,353211 | 1,277401 |
| AO | 27,211 | 27,02 | 27,057 | 27,09606361 | AO | 18,218 | 17,539 | 17,356 | 17,447514 | 9,6486 | | 1,04145 | 2,058295 |

5.3. Cuantificación de proteínas

Para la medición de niveles proteicos de mioquinas en aorta se utilizó la mitad inferior de la misma. Primero se homogenizó con 120 µL del amortiguador RIPA en el equipo Minilys de Bertin technologies, 3 veces por 30 seg a 5.000 rpm y luego 1 min a 5.000 rpm con un spin entre cada homogenizado. Luego se dejó en agitación por 30 min a 4°C y luego se centrifugó a 12.000 × g, durante 12 min a 4°C. Se realizaron alícuotas

de 40 µL y se guardaron a -80°C. La cuantificación de proteínas se hizo mediante el método del BCA según las instrucciones del fabricante (ThermoFisher, 23225).

5.4. ELISA

Para medir los niveles de mioquinas en plasma y aorta, se utilizó el kit de ELISA de ratón para IL-6 Abcam (ab222503 y ab100713). Para medir los niveles proteicos de Miostatina se utilizó el kit de ELISA de ratón R&D System (DGDF80). Todos los kits se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mediciones se hicieron en duplicado y los resultados se graficaron mediante la regresión logística de 4 parámetros (4pl).

5.5. Histología

5.5.1. Procesamiento de tejidos

Una vez extraídas, las aortas ascendentes de ratones C57BL/6J se fijaron inmediatamente en formalina 4% p/v en amortiguador fosfato (0,1 M; pH 7,4) por 24 h a temperatura ambiente. Luego, se lavaron por 1 h en agua corriente, para después continuar con la deshidratación en una escala ascendente de etanoles (70°, 80°, 95°, 95°, 100°, 100°, 100°) por 25 min en cada etanol, seguido por tres pasos por xilol por 25 min cada uno. La impregnación se realizó a 60°C en tres cambios de parafina por 25 min cada uno, incluyendo el tejido finalmente en bloques de parafina destinados para histología e inmunohistoquímica.

5.5.2. Inmunohistoquímica para SM22α, IL-6 y Miostatina

La inmunohistoquímica para ambas mioquinas y el marcador de VSMC se realizó utilizando cortes en las muestras de aortas a un grosor de 5 µm, los cuales una vez secados se desparafinaron con tres cambios de xilol por 5 min cada uno. Luego, los cortes se sometieron a rehidratación gradual en escala de etanoles (100°, 100°, 100°, 95°, 70° por 3 min cada uno) hasta llegar a agua destilada. Para la recuperación antigénica se utilizó amortiguador citrato a pH 6,0 (10 mM citrato de sodio, 0,05% Tween-20) por

20 min a 120°C en olla a presión. La actividad de peroxidasa endógena se bloqueó con solución de peróxido de hidrógeno al 3%, seguido de bloqueo de uniones inespecíficas utilizando *protein block* del kit Leica Novolink. Como anticuerpo primario se utilizó los anticuerpos anti-Miostatina (ab71808, dilución 1:50), anti-IL-6 (ab208113, dilución 1:50), y anti-SM22α (ab14106, dilución 1:2000). Todas las diluciones se realizaron en PBS-BSA 1%. La incubación con anticuerpo primario se realizó por 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante 1 h a temperatura ambiente. Para el revelado de la unión de los anticuerpos se utilizó la solución de revelado del kit basado en 3,3-diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Posteriormente, se realizó contraste nuclear con hematoxilina de Harris por 1 min y se deshidrataron para ser montadas con Entellán. Como control negativo se procesaron en forma paralela cortes de las muestras correspondientes sin incubar con anticuerpo primario (en su lugar se usó PBS) siguiendo el protocolo señalado. Como control positivo externo se procesaron muestras de riñón de ratón. Imágenes de las láminas histológicas se tomaron en microscopio óptico de luz Leica DM500 equipado con una cámara digital Leica ICC50W a un aumento de 40x.

5.6. Análisis estadístico

5.6.1. Cálculo tamaño muestral

El cálculo del tamaño muestral se determinó en base a la fórmula 1.⁶⁶

$$n = \frac{2DS^2 (Z^0 + Z^\theta)^2}{d^2}$$

donde Z^0 es el error alfa, Z^θ es el poder del experimento, “d” corresponde al efecto tamaño.

Para calcular el número de ratones que se utilizaron en la cinética aguda de entrenamiento, se tomó un Z^0 de 1,96 para dos colas; con 90% de poder del experimento lo que corresponde a 1,2816 (ambos valores tabulados). Para RT-qPCR, el efecto tamaño y la desviación estándar fue de -2,4 y 0,92, respectivamente, entregando un $n=4$ al corregirlo por el 20% de posible pérdida de animales⁶⁷

En el caso de ELISA, el efecto tamaño y la desviación estándar fue de -27,2 y 9,7, lo que resulta en un $n=3$, corregido por el 20% de pérdida de animales.⁶⁸ Al tener 5 grupos experimentales, el n total fue de 20 animales.

5.6.2. Análisis de datos:

Todos los datos experimentales se expresaron como promedio \pm desviación estándar. La comparación entre los promedios de los grupos se realizó utilizando un análisis de datos no paramétricos, Kruskal-Wallis con test post hoc de Dunn's. Se consideró $p<0.05$ como significativo.

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización trabajo con animales

Al ser este un tema novedoso, no existe aún un protocolo descrito para el análisis de la expresión de mioquinas en musculatura lisa por efecto del ejercicio. Así que, antes de analizar sus efectos a largo plazo es necesario comprobar que este estímulo modifica la producción de IL-6 y Miostatina en VSMC en función del tiempo y la intensidad de este. Por lo que se comenzó con un protocolo de ejercicio agudo que después se tuvo que optimizar para analizar la expresión de estas mioquinas en aorta de ratón. Por lo tanto, se utilizaron dos protocolos de ejercicio agudo. Los datos de los ratones utilizados en el primer protocolo se encuentran resumidos en la tabla 2. Para la cinética de expresión aguda de mioquinas, los ratones primero se aclimataron a la trotadora durante tres días con tiempos y velocidades crecientes de corrida por día y luego se sometieron a una prueba de velocidad incremental donde se obtuvo la VAM de cada ratón. Posteriormente, se calculó el 60% de la VAM grupal y los ratones se dividieron en grupos experimentales según el tiempo que deberían correr (0, 30, 60, 90 min). Los ratones se eutanasiaron con isoflurano inmediatamente terminada la sesión de ejercicio.

Tabla 2. Datos de ratones cepa C57BL/6J utilizados en la cinética de expresión aguda de mioquinas.

Los datos de ratones C57BL/6J están ordenados por grupo de trabajo, y se expresan como promedio \pm DS, * $p < 0,05$ respecto a 0 min. Análisis mediante test de datos no paramétricos de Kruskal-Wallis, post test de Dunn's. Distancia (m) se refiere a los metros que corrió cada ratón el día de la prueba incremental y no el día en que fueron eutanasiados.

| Grupos experimentales | 0 min | 30 min | 60 min | 90 min |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Tamaño muestral | 7 | 7 | 7 | 5 |
| Peso (g) | 24,30 \pm 2,00 | 25,12 \pm 2,9 | 22,26 \pm 2,58 | 23,29 \pm 1,66 |
| Velocidad aeróbica máxima (m/min) | 17,57 \pm 2,70 | 19,74 \pm 3,79 | 19,97 \pm 3,98 | 25,66 \pm 5,21 |
| 60% VAM | 10,46 \pm 1,57 | 12,1 \pm 2,32 | 11,86 \pm 2,22 | 15,3 \pm 3,40 (*) |
| Distancia (m) | 212,14 \pm 65,65 | 265,57 \pm 97,86 | 272,29 \pm 111,93 | 438 \pm 160,72 |

En la Tabla 2, se observa una diferencia significativa en el 60% de VAM entre el grupo control y el grupo de ratones que corrieron durante 90 min. Esto podría explicarse debido a que la VAM calculada es grupal por lo que no todos los ratones corrieron

efectivamente al 60% de su VAM, sino que lo hicieron a una velocidad superior o inferior. Además, no todas las camadas de ratones tuvieron la misma VAM grupal por lo que esto podría explicar la gran dispersión observada en la distancia recorrida por cada grupo de animales. Por otra parte, se dejaron aquellos ratones con menor VAM como controles, por lo que su selección no fue arbitraria. Esto nos indicó que era necesaria una modificación en el protocolo.

Se ha reportado en literatura, que la inducción de IL-6 en músculo esquelético durante ejercicio es dependiente de la intensidad y duración del mismo, además de las reservas de glicógeno que presente el músculo.^{15,69,70} Por lo que mientras más exhaustivo sea el ejercicio, mayor será la expresión de IL-6. Por esta razón, se confeccionó un protocolo nuevo (segundo protocolo), considerando estos antecedentes y también los datos obtenidos en el protocolo anterior. En el nuevo protocolo, al igual que en el anterior, los ratones se aclimataron durante una semana a la trotadora adaptada (metodología), luego se realizó la prueba de velocidad incremental y se calculó la VAM de cada ratón. Estos se dividieron arbitrariamente en diferentes grupos de trabajo según el tiempo que correrían. En este protocolo se agregó un nuevo grupo de trabajo correspondiente a los ratones AO, los cuales corrieron hasta la fatiga. De esta manera, los nuevos grupos experimentales fueron 5: grupo control (0 min), 30, 60, 90 min y grupo AO. Además, se debe mencionar que cada ratón tuvo 6 h de ayuno previo a la sesión de ejercicio. En la tabla 3, se resumen los datos obtenidos de los ratones que participaron en el segundo protocolo de ejercicio agudo.

Tabla 3 Datos de ratones cepa C57BL/6J utilizados en el protocolo optimizado de cinética de expresión aguda de mioquinas.

Los datos de ratones C57BL/6J están ordenados por grupo experimental, y se expresan como promedio \pm DS. Distancia (m) se refiere a los metros recorridos por los ratones el día del test incremental y no de la eutanasia.

| Grupos experimentales | 0 min | 30 min | 60 min | 90 min | All- out (AO) |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Tamaño muestral | 7 | 7 | 6 | 7 | 7 |
| Peso VAM (g) | 25,82 \pm 1,44 | 25,04 \pm 1,07 | 25,40 \pm 1,30 | 25,28 \pm 1,48 | 24,55 \pm 1,56 |
| Peso eutanasia (g) | 25,35 \pm 1,83 | 24,74 \pm 1,20 | 24,62 \pm 1,51 | 24,64 \pm 1,80 | 24,81 \pm 1,64 |
| Velocidad aeróbica máxima (m/min) | 20,91 \pm 3,95 | 22,59 \pm 4,06 | 19,97 \pm 2,10 | 22,84 \pm 3,69 | 22,60 \pm 2,71 |
| 60% VAM | 12,57 \pm 2,11 | 13,51 \pm 2,24 | 12,17 \pm 0,88 | 13,53 \pm 2,46 | 13,54 \pm 1,53 |
| Distancia (m) | 432,53 \pm 166,58 | 501,01 \pm 181,05 | 385,35 \pm 81,34 | 508,90 \pm 169,78 | 493,90 \pm 110,66 |

En este protocolo, a diferencia del anterior, no se observaron diferencias significativas entre las VAM de los grupos experimentales, ni tampoco en el peso de los ratones el día de la VAM (peso VAM) o el día de la eutanasia (peso eutanasia). Tampoco existe diferencia significativa entre la distancia recorrida por cada grupo de trabajo. En la tabla 4, se muestra el tiempo que corrió cada ratón en el grupo AO al 60% de su velocidad. En esta ocasión cada ratón corrió por al menos 100 min. En el caso del n7, este ratón corrió durante 180 min a 13,3 m/min (60% VAM), luego se aumentó la velocidad a 15 m/min durante 5 min y después se aumentó a 16,6 m/min durante 3 minutos con 10 seg (fatiga).

Tabla 4. Tiempo de corrida de cada ratón C57BL/6J All-Out (AO).
Se presenta el tiempo que corrió cada ratón AO al 60% de su VAM.

| Grupo AO | Tiempo de corrida (min) |
|----------|-----------------------------------|
| n1 | 122 |
| n2 | 126 |
| n3 | 173 |
| n4 | 153 |
| n5 | 126 (+ 23 seg) |
| n6 | 107 (+ 43 seg) |
| n7 | 180 (+ 5 min, + 3 min con 10 seg) |

6.2. Estandarización de la técnica de RT-qPCR

Al ser esta una nueva línea de trabajo se comenzó por definir el protocolo de obtención de la muestra, esto es, lograr extraer la mayor cantidad de tejido aórtico y limpiarlo de forma correcta. Para lograrlo, se extrajo la aorta desde el corazón hasta los riñones y luego se limpió cuidando de no cortarla. Primero, la aorta ascendente se limpió hasta que fue posible observar la curvatura típica de esta zona, se cortó y se dejó en formalina. Luego, la mitad superior de la aorta se dejó para RT-qPCR y la mitad inferior se utilizó para medición de las proteínas.

Posteriormente, se estandarizó el protocolo de extracción de RNA de aorta con el método de TRizol® haciendo algunas modificaciones al protocolo original como, por ejemplo, se agregó Glycoblue un co-precipitador de RNA para aumentar el rendimiento de la extracción; se cambió tiempos de centrifugación y la cantidad de reactivos. Todas estas modificaciones se encuentran descritas en la figura 4 y en la metodología.

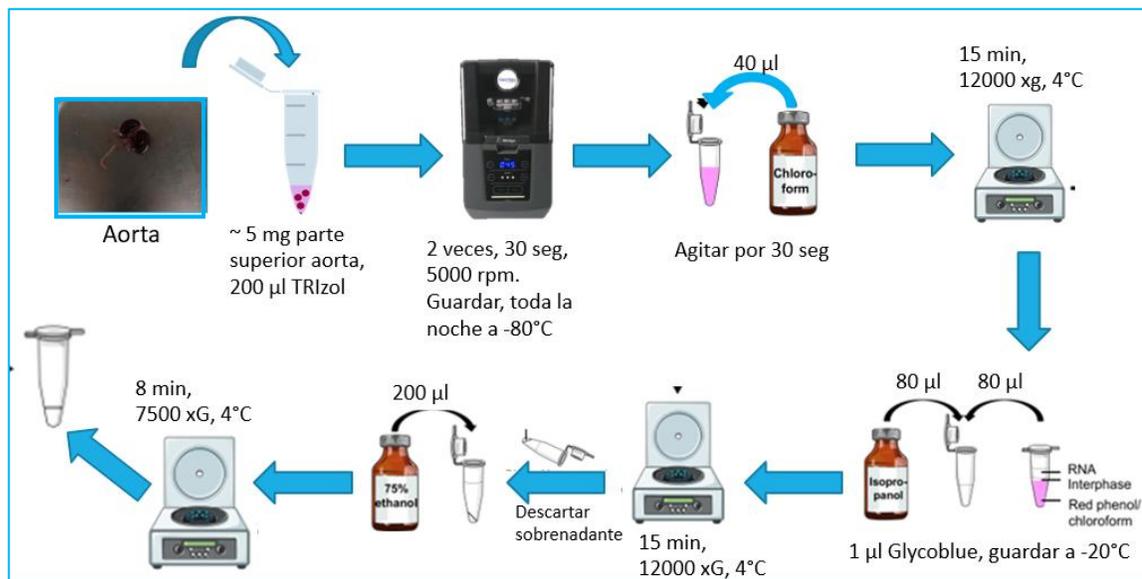


Figura 4. Protocolo de extracción de RNA a partir de aorta de ratón C57BL/6J.

Se muestra el protocolo estandarizado de extracción de mRNA a partir de aorta de ratón C57BL/6J cambiando tiempos y velocidades de centrifugación del protocolo original. Además, se agregó Glicoblue para mejorar el rendimiento de extracción.

También se tuvo que trabajar en la confección y estandarización de los partidores de RT-qPCR para ratón. Como es posible observar en la figura 5, el partidor de IL-6 se utilizó a una concentración de 700 nM y se obtuvo una eficiencia de 122,88% y un R^2 de 0,937 (5A). En el caso de Miostatina, se utilizó una concentración de 1 µM y se obtuvo una eficiencia de 103,42% con un R^2 de 0,944 (5B). Para los genes *housekeeping*, se utilizó β-actina 1 µM con un R^2 de 0,997 y una eficiencia de 110,25% (5C). Por último, 18S se utilizó con una concentración 250 nM y se obtuvo una eficiencia de 91,2% y un R^2 de 0,999 (5D). Para realizar la estandarización de partidores, se probó con concentraciones diferentes de cada partidor y, además, pares con secuencias *forward* (*Fw*) y *reverse* (*Rv*) diferentes.

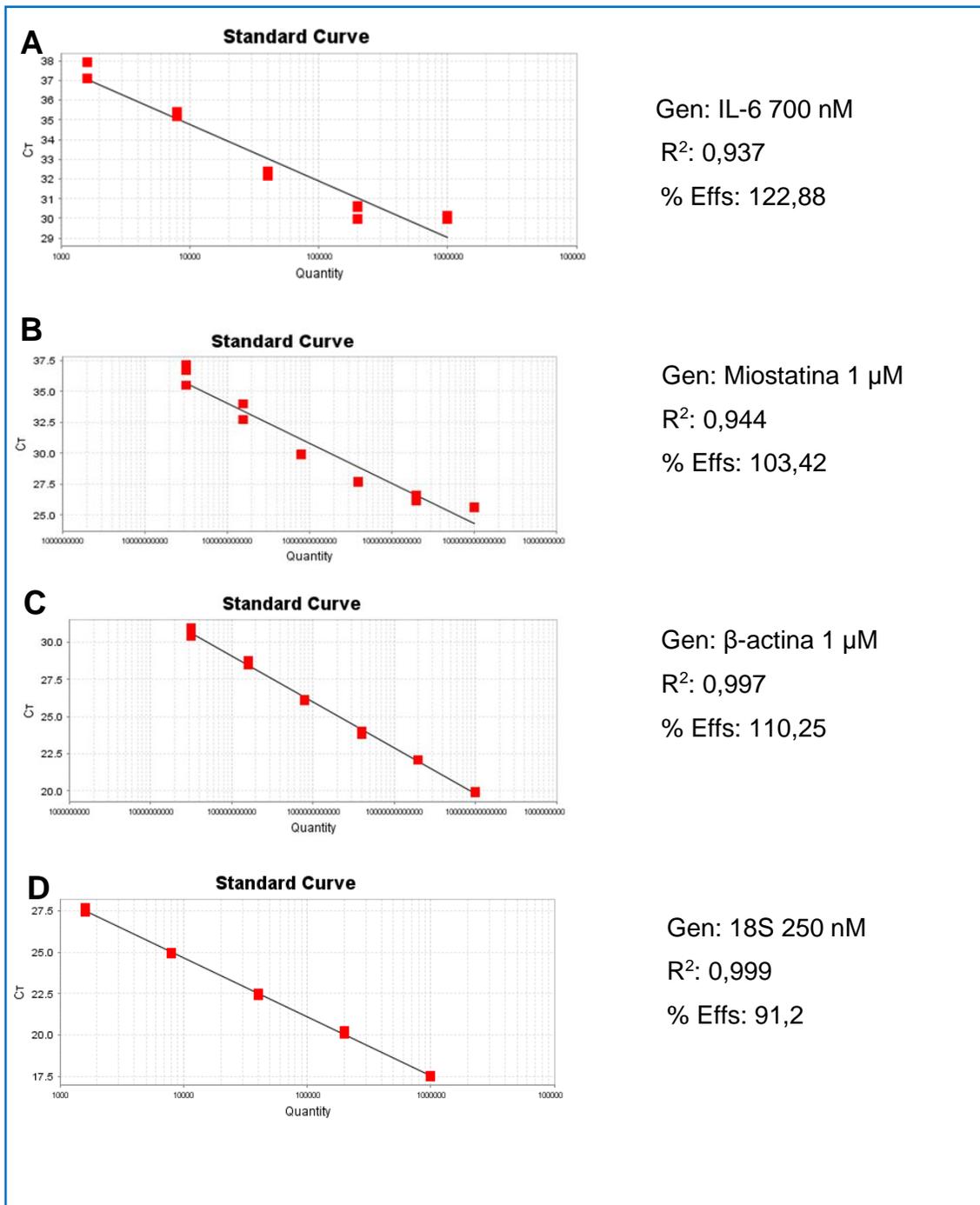


Figura 5. Estandarización de partidores para RT-qPCR.

Se presentan las eficiencias y R^2 de los diferentes pares de partidores utilizados en esta tesis. En A) IL-6 700 nM, B) Miostatina 1 μ M, C) β -actina 1 μ M, D) 18S 250 nM. Se utilizó muestra de cuádriceps de ratón C57BL/6J, a una concentración inicial de 1 μ g de cDNA.

6.3. Cinética de expresión de mRNA de IL-6 y Miostatina por acción del ejercicio agudo tipo *endurance*

En el primer protocolo usado, se analizó la expresión del mRNA de ambas mioquinas en aorta y cuádriceps (control positivo del protocolo de ejercicio). En el caso de IL-6, a pesar de que no existe diferencia significativa entre ninguno de los grupos de estudio, se pudo observar una tendencia al aumento en la expresión de mRNA a los 90 min en aorta de ratón (Figura 6A). En cuádriceps, aunque las variaciones en la expresión de mRNA tampoco fueron significativas, fue posible notar una tendencia al aumento desde los 30 min ($p=0,1$ respecto al control) y un posterior descenso, lo que se condice con lo reportado en literatura (Figura 6B).⁶⁷ Aunque los datos son muy preliminares, los resultados presentados en la figura 3 son muy auspiciosos para seguir explorando la posibilidad de que el ejercicio induzca la expresión de IL-6 en aorta. En el caso de Miostatina, al igual que con IL-6 no se observaron diferencias significativas en su expresión en ambos músculos (Figuras 6C y 6D). Es sabido que la expresión de miostatina disminuye en ejercicio tipo *endurance*.⁶⁴ Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, en aorta se observó una tendencia a aumentar a los 90 min de ejercicio (Figura 6C) con un $p=0,22$ respecto a los 60 min. En cuádriceps, se observó una tendencia al aumento a los 30 min ($p=0,3$) y luego la expresión de su mRNA volvió a los niveles basales (Figura 6D).

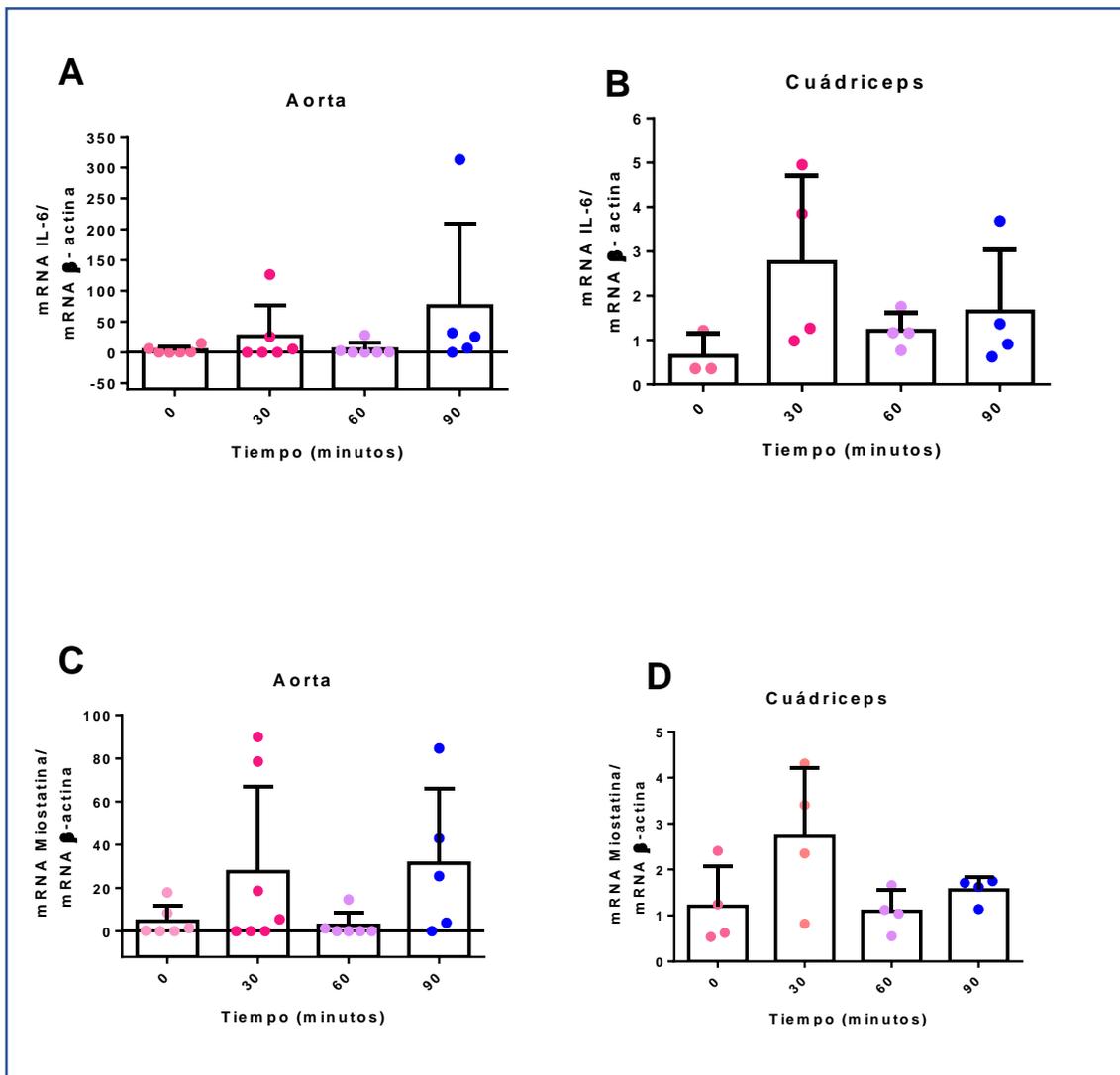


Figura 6. Cinética de expresión aguda de mRNA de IL-6 y Miostatina en diferentes músculos, primer protocolo.

Se presentan las veces de cambio en la expresión del mRNA de IL-6 y Miostatina en el primer protocolo utilizado. Niveles de IL-6 en A) aorta y en B) cuádriceps, respecto al gen de β -actina. Niveles de Miostatina en C) aorta y en D) cuádriceps respecto a β -actina. En ambos músculos, no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos de estudio. En A) $n=4-7$ para cada condición B) $n=3-4$ para cada condición C) $n=5-7$ D) $n=4$. Análisis mediante test de datos no paramétricos de Kruskal-Wallis, post test de Dunn's.

Es probable que debido a la gran variación entre las muestras, estos resultados aún no muestren diferencias significativas, aspecto que se buscó mejorar en el protocolo nuevo. En la figura 7 se muestra la expresión del mRNA de IL-6 a diferentes tiempos de ejercicio, en músculos diferentes y normalizados por distintos genes *housekeeping* (protocolo optimizado). En aorta no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, se observaron tendencias al aumento en los niveles de mRNA. Al normalizar IL-6 con β -actina, el aumento en la expresión de mRNA del grupo AO estuvo cercano a ser significativamente diferente respecto al control, con un $p=0,167$ (Figura 7A). Sin embargo, al normalizar por 18S no se observaron cambios significativos (Figura 7B). No obstante, entre el grupo de 30 min y el grupo AO el valor de “ p ” fue menor siendo 0,88. En cuádriceps, se observó una tendencia de aumento en la expresión de mRNA de IL-6 que se hizo mas notoria a los 60 min. Al ser normalizada su expresión con β -actina, el aumento en la expresión de mRNA del grupo AO estuvo muy cercano a ser significativo respecto al control con $p=0,0657$. En el caso del grupo de 60 min obtuvimos un $p=0,135$ respecto al control (Figura 7C). Al normalizar la expresión de IL-6 con 18S en cuádriceps también se observaron aumentos en los niveles de mRNA cercanos a la significancia en el grupo AO ($p=0,081$) y a los 60 min ($p=0,092$) respecto al grupo control (Figura 7D). También en esta normalización se obtuvieron medias de cambio más elevadas que con el gen β -actina.

En la figura 8, se observa la variación en la expresión del mRNA de Miostatina a diferentes tiempos de ejercicio, en músculos diferentes y normalizados con diferentes genes *housekeeping* (protocolo optimizado). En aorta no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, existió una tendencia al aumento en el grupo AO donde se observó un valor “ p ” menor que en los otros grupos al normalizar con β -actina (0,36 respecto al control) (Figura 8A). Al normalizar respecto al gen 18S, las diferencias en la media de cambio en la expresión del mRNA fueron menores. Sin embargo, el grupo AO presentó el valor de “ p ” menor (0,71) (Figura 8B). En cuádriceps, al normalizar la expresión de Miostatina con β -actina, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de su mRNA (Figura 8C). Sin embargo, al normalizar su expresión con el gen 18S, se observó un aumento significativo a los 60 min de ejercicio ($p=0,013$). A los 30 y 90 min los cambios estuvieron cerca de la significancia ($p=0,3$) (Figura 8D).

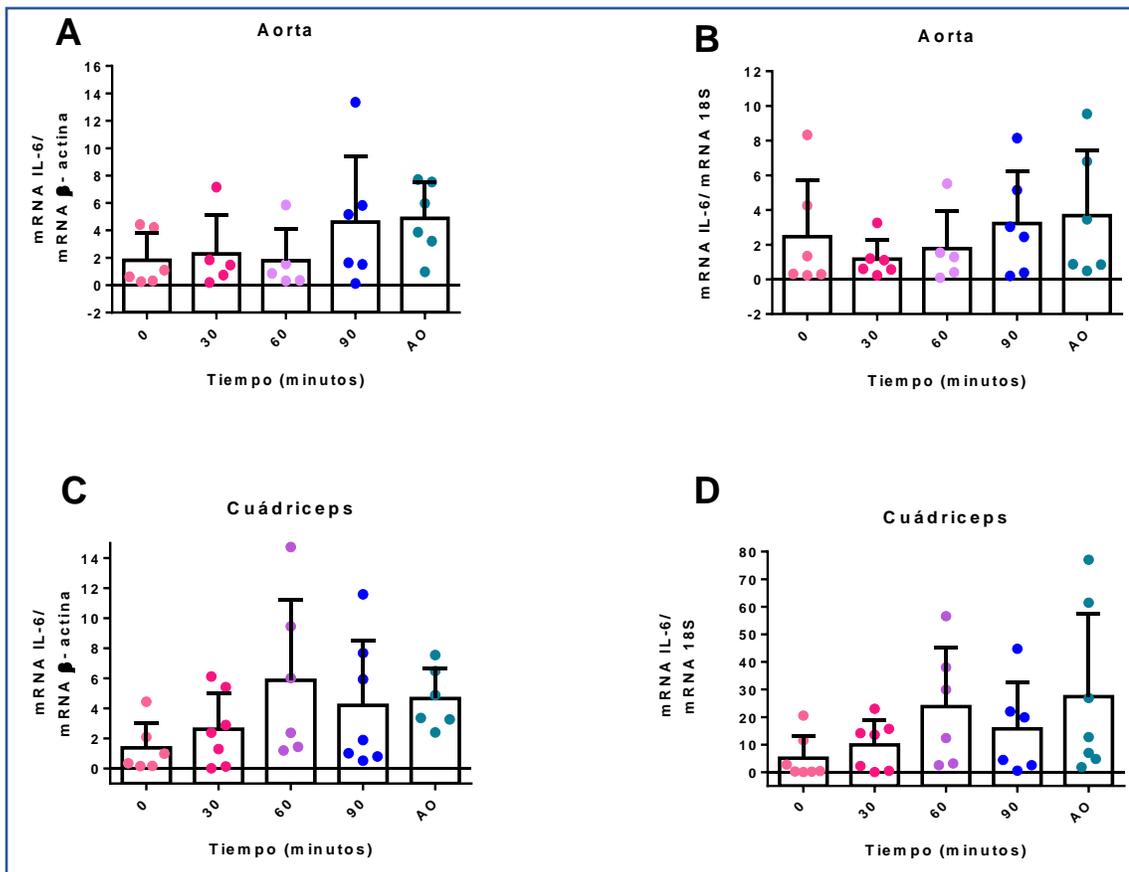


Figura 7. Cinética de expresión aguda de mRNA de IL-6 en diferentes músculos y normalizada por diferentes genes housekeeping (protocolo nuevo).
 Se presentan las veces de cambio en la expresión del mRNA de IL-6 de ratones que corrieron a diferentes tiempos al 60% de su VAM, en aorta (A, B) y en cuádriceps (C, D), respecto al gen de β -actina (A, C) y 18S (B, D). En ambos músculos, no se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos de estudio. En A-C) n=5-6 para cada condición, D) n=6-7 para cada condición. Análisis mediante test de datos no paramétricos de Kruskal-Wallis, post test de Dunn's,

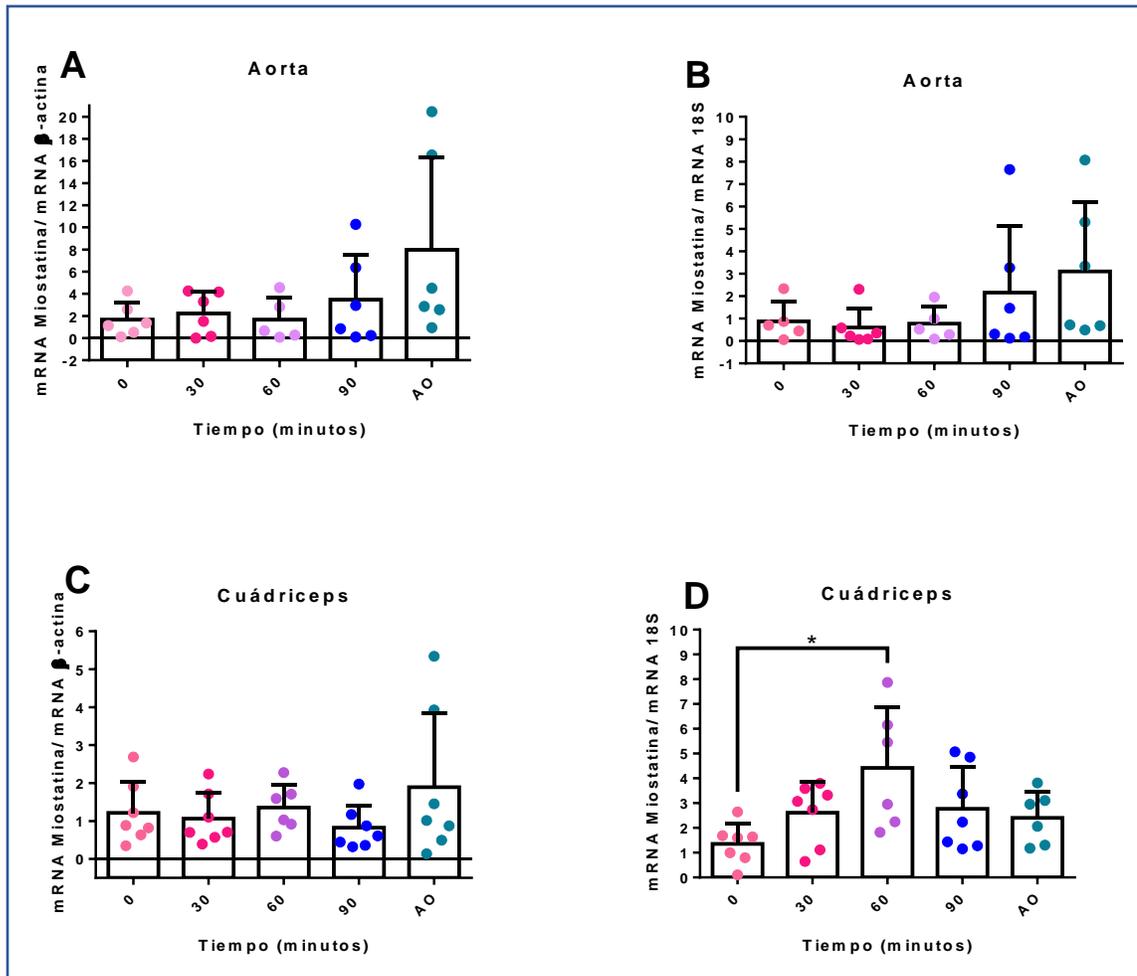


Figura 8. Cinética de expresión aguda de mRNA de Miostatina en diferentes músculos y normalizada por diferentes genes housekeeping (Protocolo nuevo).

Se presentan las veces de cambio en la expresión del mRNA de Miostatina de ratones que corrieron al 60% de su VAM en aorta (A, B) y en cuádriceps (C, D) respecto al gen de β -actina (A, C) y 18S (B, D). Se observa una diferencia significativa en la expresión de Miostatina normalizada por 18S en cuádriceps ($p < 0.05$). Se usó un $n = 5-7$ animales por grupo. Análisis de datos no paramétricos, Kruskal-Wallis, post test Dunn's, $*p < 0.05$ relativo al control

6.4. Cinética de expresión proteica de IL-6 y Miostatina en aorta de ratón por acción del ejercicio agudo tipo *endurance*

Para analizar la expresión de mioquinas en aorta de ratón C57BL/6J a diferentes tiempos en el protocolo nuevo de ejercicio, se utilizó la técnica de Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Para graficar los resultados, se utilizó el método de regresión de cuatro parámetros (4pl). Se ingresó los datos de la curva estándar para cada mioquina en la página *MyCurveFit* (<https://www.mycurvefit.com>). De esta página se obtuvo la ecuación de la recta para cada curva de calibración.

6.4.1. IL-6

En la figura 9, se muestra la curva estándar del kit ELISA de IL-6 ab222503, la ecuación de la recta obtenida y su respectivo R^2 . Los datos se graficaron por el método de regresión de cuatro parámetros como se dijo anteriormente. Este método es el ajuste más adecuado para muestras biológicas.⁷¹ En la figura 10, se presentan gráficos descriptivos de los resultados obtenidos. En un inicio para graficar se utilizó el método de regresión lineal, pero con este método de un total de 40 muestras, cinco se ajustaban a este análisis. Al realizar el ajuste por el método 4pl obtuvimos 10 muestras con una concentración mayor al límite de linealidad inferior del kit (15,6 pg/mL) (Figura 10A). De estas 10 muestras que fueron detectadas, una corresponde al grupo control, 3 pertenecen al grupo 30 min y encontramos 2 muestras en el grupo 60, 90 y AO (Figura 10B). Además, de estas 10 muestras, 8 correspondieron a tejido y 2 a plasma (Figura 10C). Sin embargo, aún nos faltaban muchas muestras por cuantificar por lo que se probó un kit de ELISA diferente (ab100713). En la figura 11 se observa la curva de calibración, la ecuación de la recta y también el R^2 obtenido. En la figura 12, se muestran gráficos descriptivos de los datos obtenidos. De las 48 muestras analizadas 26 fueron detectadas por este kit (Figura 12A) y de estas 26 muestras, 25 correspondieron a tejido y una a plasma (Figura 12B). En la figura 13, se muestra la representación gráfica de los datos tabulados y se observó que en los ratones que corrieron 30 min, los niveles de IL-6 presentaron una leve disminución en la media de expresión en comparación al control. Además, se observó una tendencia al aumento cercana a ser significativa en los niveles proteicos de IL-6 entre los 30 min y el grupo AO ($p=0,12$). Sin embargo, al

analizar estos dos grupos (30 min vs AO) usando una prueba t de Student, se observó una diferencia estadísticamente diferente ($p < 0,05$).

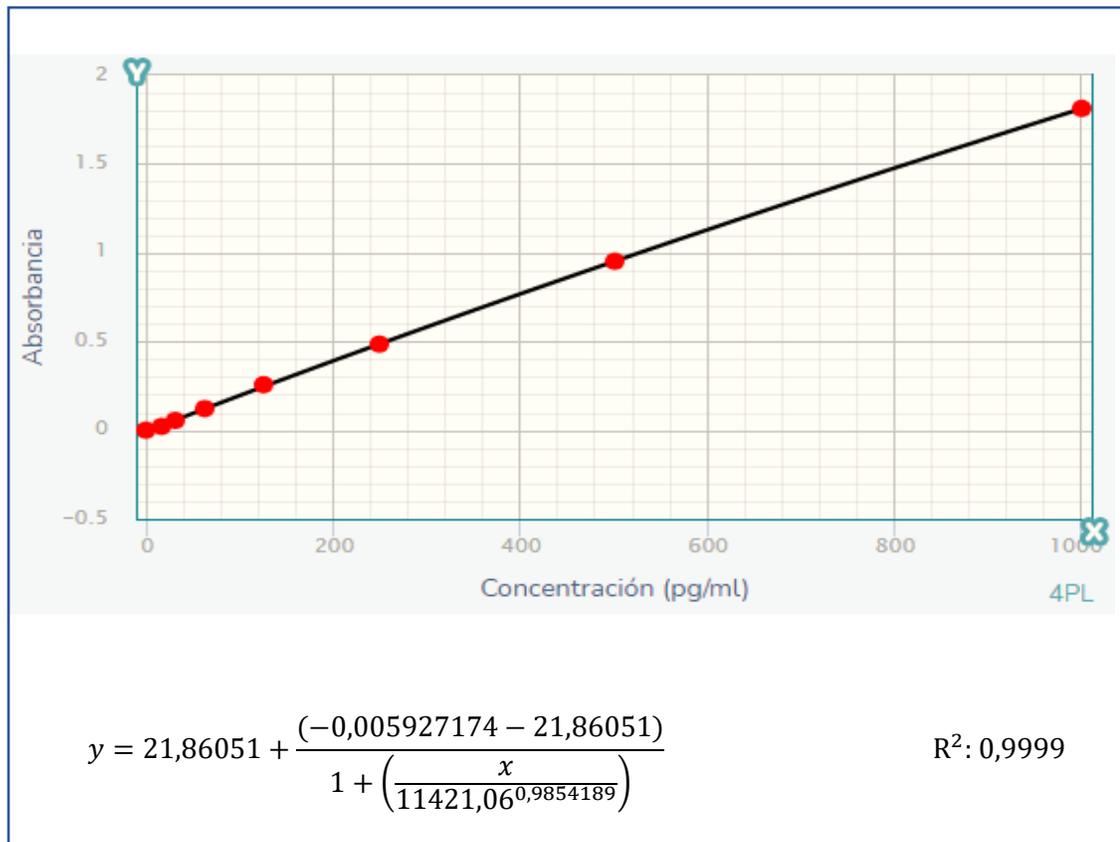


Figura 9. Curva de calibración para kit ELISA IL-6 ab222503.

Se muestra la curva de calibración para el kit de ELISA de IL-6 para ratón ab222503. Se obtuvo un $R^2: 0,9999$. Los datos se ajustaron a la regresión logística de cuatro parámetros (4pl).

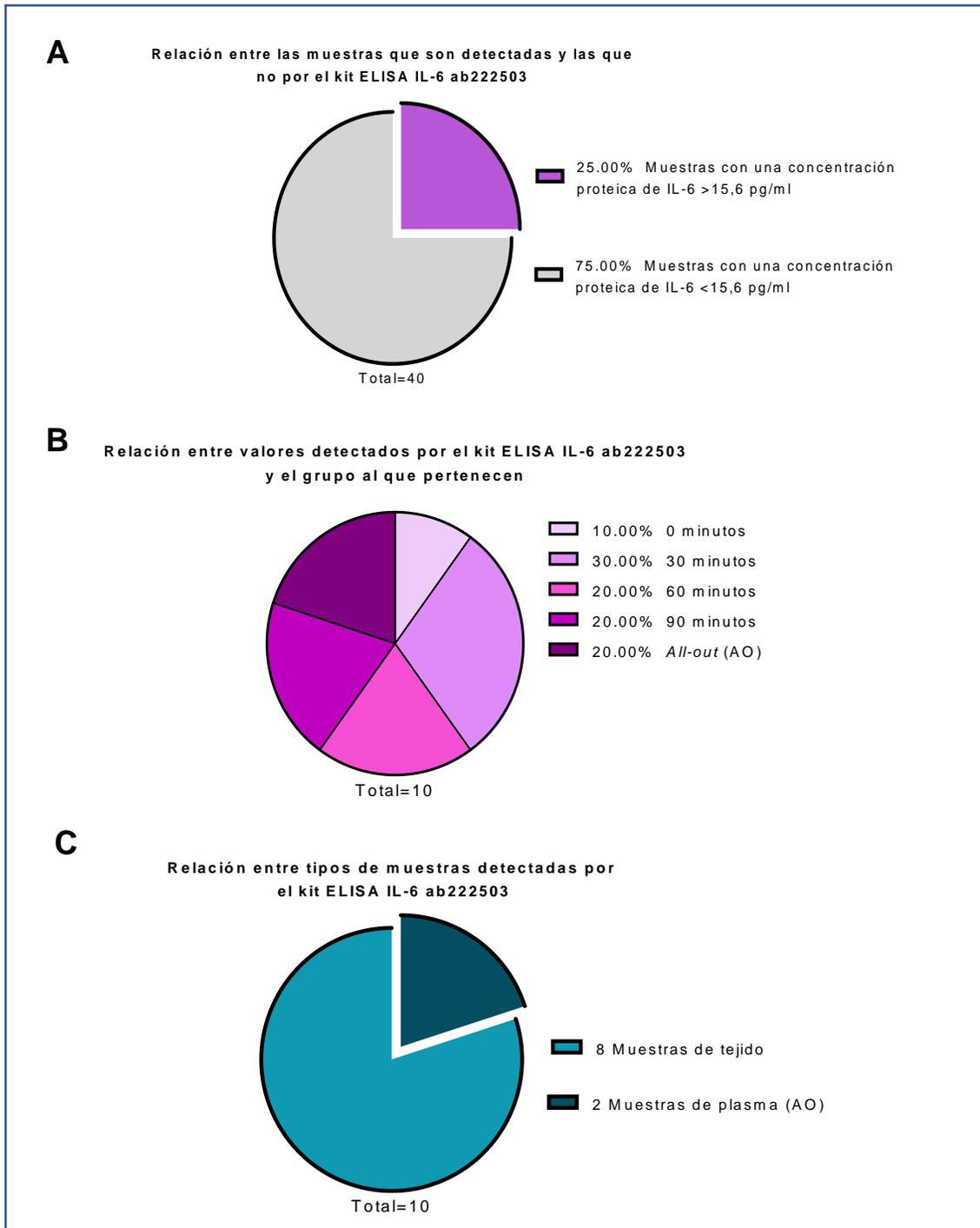


Figura 10. Gráficos descriptivos de los datos obtenidos por el kit ELISA de IL-6 ab222503. Se observa el porcentaje de muestras que se detectaron por este kit (A), a que grupos de estudio pertenecen estas muestras (B) y si corresponden a tejido o plasma (C)

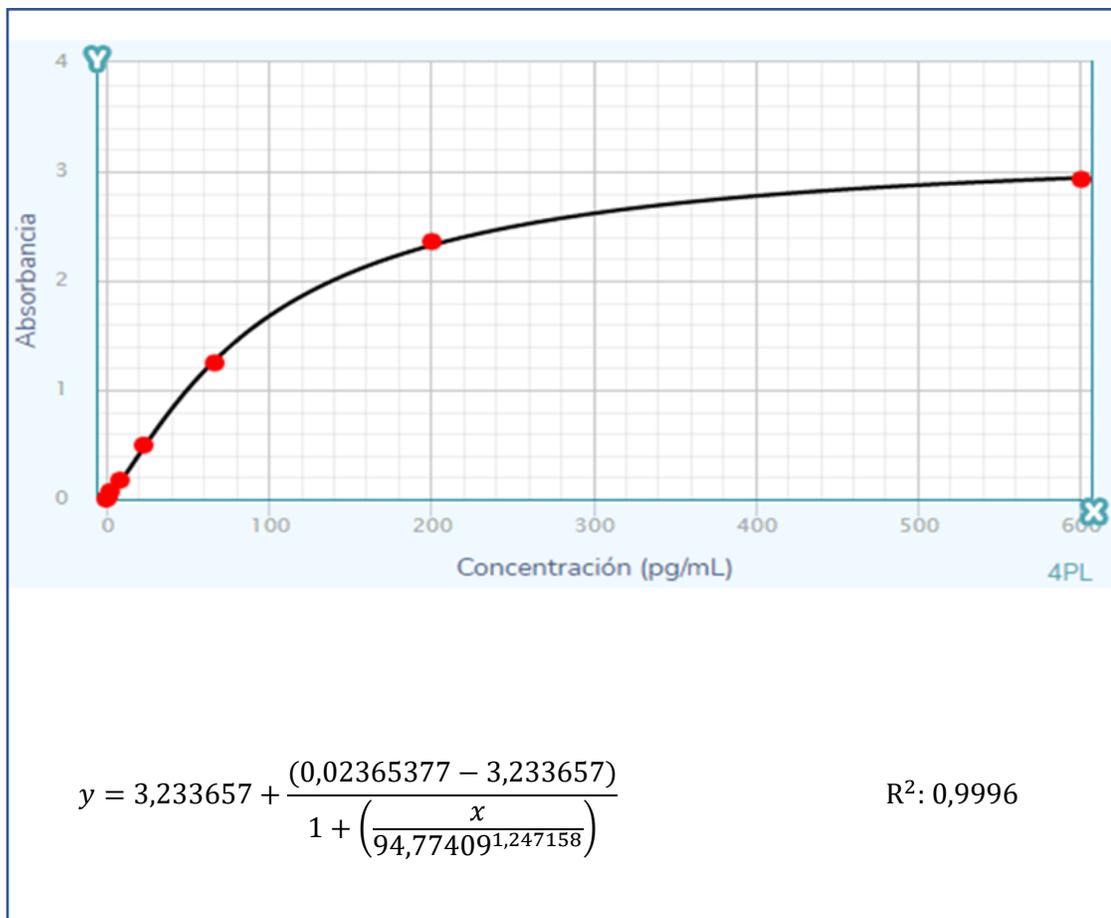


Figura 11. Curva de calibración para kit ELISA IL-6 ab100713.

Se muestra la curva de calibración para el kit de ELISA de IL-6 para ratón ab100713, donde se obtuvo un R^2 : 0,9996. Los datos se ajustaron a la regresión logística de cuatro parámetros (4pl).

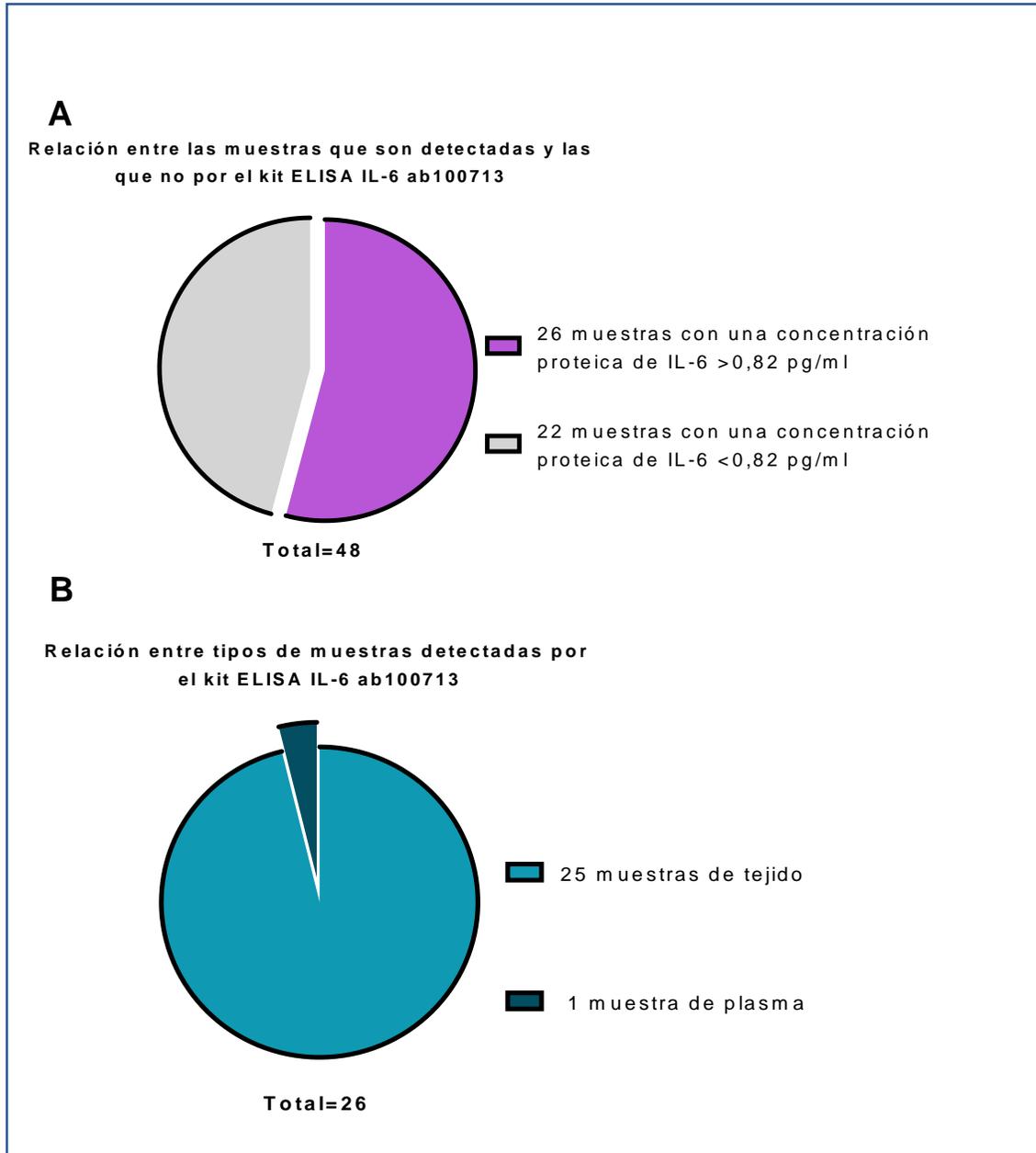


Figura 12. Gráficos descriptivos de los datos obtenidos por el kit ELISA de IL-6 ab100713. En la figura es posible observar el número de muestras que se detectaron por este kit (A) y si corresponden a tejido o plasma (B).

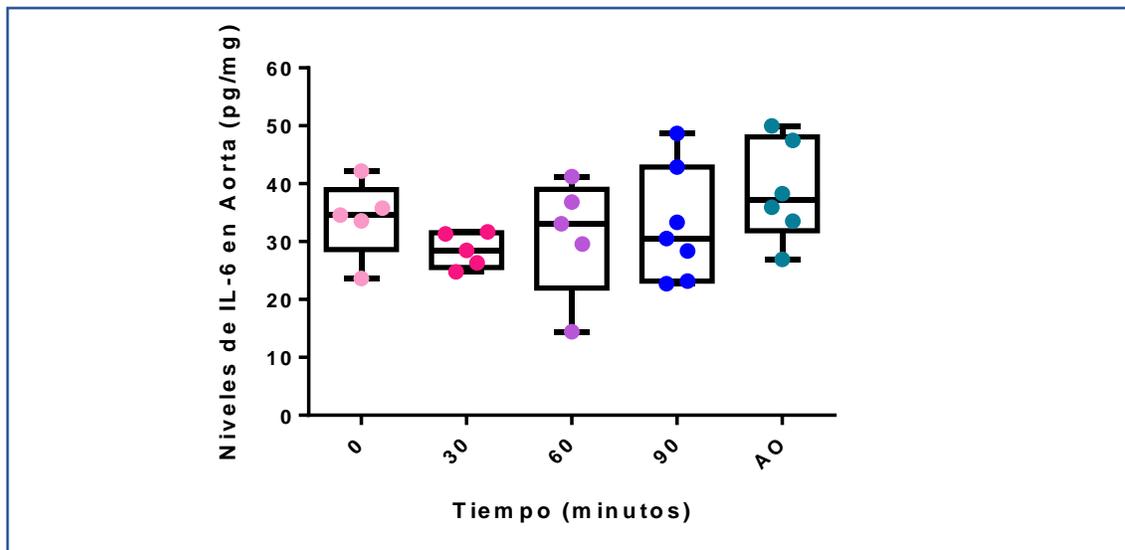


Figura 13. Expresión proteica de IL-6 a diferentes tiempos de ejercicio (protocolo nuevo). Se muestra la cinética de expresión proteica de IL-6 en aorta de ratón al correr al 60% de su VAM por diferentes tiempos. Las mediciones fueron en duplicado y se ajustaron a la regresión logística de cuatro parámetros (4pl). Tamaño muestral, n=6-7. Análisis de datos no paramétricos, Kruskal-Wallis, post test Dunn's.

6.4.2. Miostatina

En el caso de Miostatina, en la figura 14 se presenta la curva estándar del kit ELISA ajustada por el método 4pl, la ecuación de la recta y su R^2 . Como se dijo anteriormente este es un método más adecuado para el trabajo con muestras biológicas.⁷¹ En la figura 15 se muestran gráficos descriptivos de los datos obtenidos. En este caso, de las 40 muestras analizadas, 33 estuvieron dentro del rango de detección lineal del kit ELISA y 7 estuvieron fuera del rango (31,3-2000 pg/mL) (Figura 15A). De las 7 muestras que estaban fuera del rango de detección del kit obtuvimos una muestra bajo el límite inferior de detección y 6 por sobre el límite superior de detección (Figura 15B). Además, de las muestras que estaban por sobre el límite superior de detección una muestra correspondió a control, 2 muestras correspondieron al grupo de 30 min, una al grupo de 60 min y 2 al grupo OA (Figura 15C). Además, todas las muestras que estaban por sobre el límite superior del kit correspondieron a muestras plasmáticas. En la figura 16 se

presenta la cinética de expresión proteica de Miostatina en aorta y en plasma, utilizado también como control positivo del protocolo de ejercicio usado. En la figura 16A, se muestra la concentración de Miostatina con relación a la concentración de proteína del homogenizado de aorta y se observó una leve tendencia a disminuir el nivel proteico a los 30 y 60 min de ejercicio. Sin embargo, existió un aumento aparente a los 90 min ($p=0,7$). Es posible que al aumentar el tamaño muestral este resultado alcance valores estadísticamente diferentes. En plasma, al tener grupos experimentales con solo una muestra, no fue posible realizar análisis estadísticos. El tener solo una o dos muestras en ciertos grupos se debió a que su concentración excedió los 2000 pg/mL por lo que se debería probar una dilución mayor para poder graficarlos y establecer una tendencia (Figura 16B).

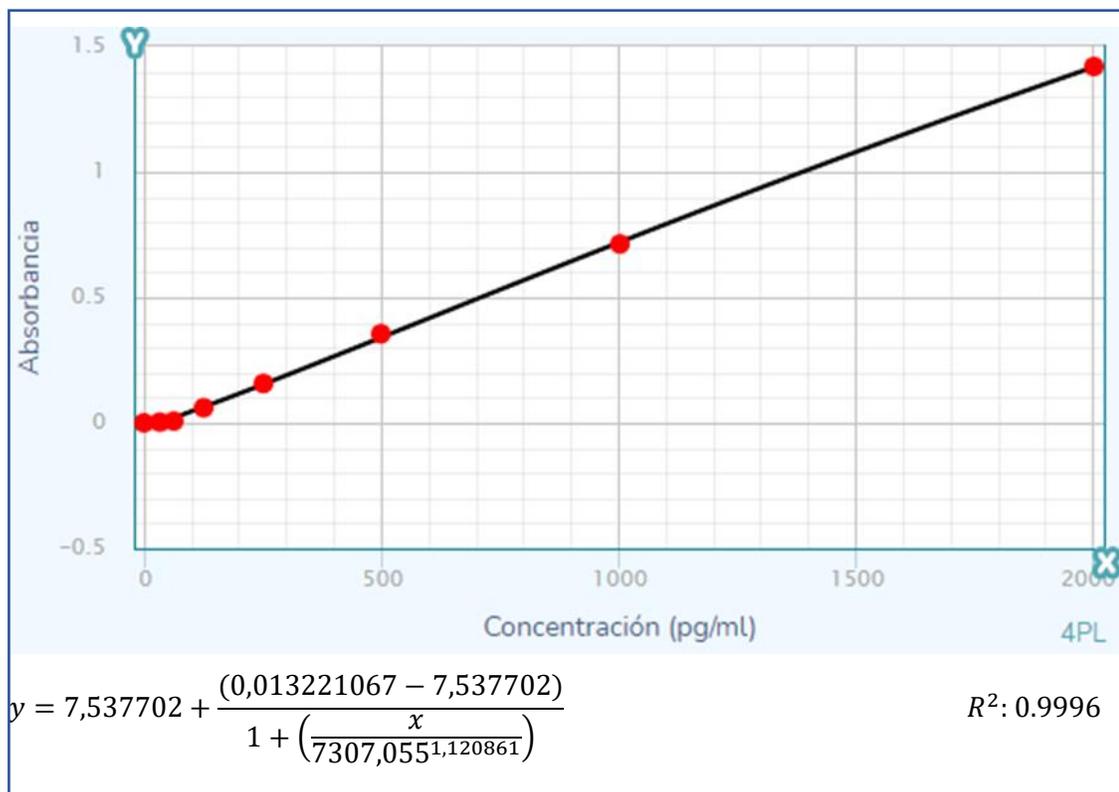


Figura 14. Curva de calibración para kit ELISA Miostatina (protocolo nuevo).

Se muestra la curva de calibración para el kit de ELISA de Miostatina para ratón DGDF80 mediante la regresión logística de cuatro parámetros (4pl). Se obtuvo un R^2 : 0,9996.

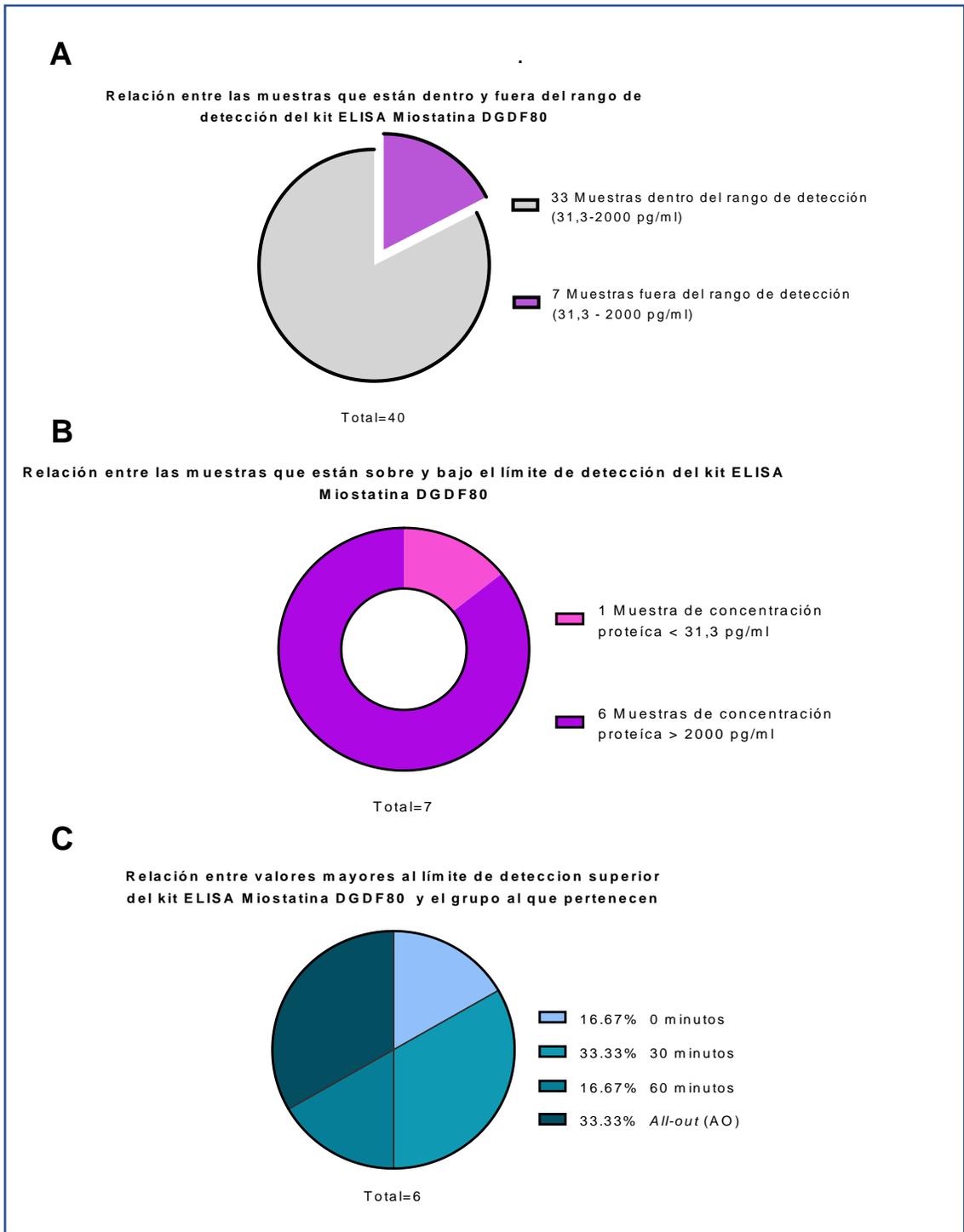


Figura 15. Gráficos descriptivos de los datos obtenidos por el kit ELISA de Miostatina (protocolo nuevo).

Se observa el porcentaje de muestras que están dentro del rango de detección de este kit (A), a que grupos de estudio pertenecen estas muestras (B) y si corresponden a tejido o plasma (C).

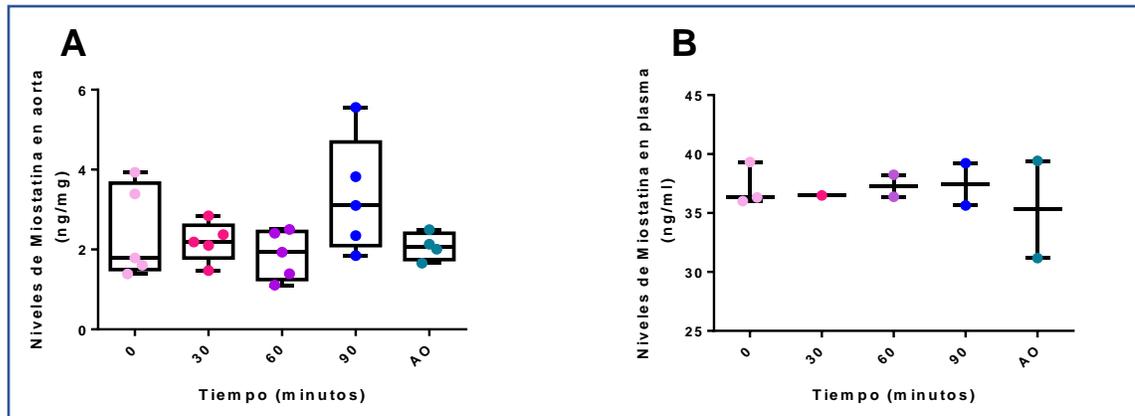


Figura 16. Expresión proteica de Miostatina a diferentes tiempos de ejercicio (protocolo nuevo).

Se muestra la cinética de expresión proteica de Miostatina en aorta de ratón al correr al 60% de su VAM por diferentes tiempos (A), Concentración de Miostatina en las muestras de plasma que fueron detectadas. (B) Las mediciones fueron en duplicado y se ajustaron a la regresión logística de cuatro parámetros (4pl). En A) n=4-5, en B) n=1-3 Análisis de datos no paramétricos, Kruskal-Wallis, post test Dunn's,

6.5. Detección por inmunohistoquímica (IHQ) de SM22 α , IL-6 y Miostatina.

Además de la estandarización de la metodología de RT-qPCR, también se estandarizaron los anticuerpos para IHQ. Esta técnica se realizó con el fin de comprobar que la expresión de estas mioquinas ocurría efectivamente en VSMC de aorta. Para esto se utilizó SM22 α como marcador de VSMC. Como control positivo exógeno de cada anticuerpo se utilizaron cortes histológicos de riñón de ratón C57BL/6J (datos no mostrados) y como control negativo se incubaron estas muestras sin anticuerpo primario. Para la estandarización de los anticuerpos se utilizaron diferentes concentraciones y distintos tiempos de exposición con DAB. Además, se hizo contraste nuclear con hematoxilina. En la figura 17, se observa la expresión de SM22 α en la capa media de la aorta, lugar en el que se encuentran las VSMC a los diferentes tiempos de corrida de ratones C57BL/6J (color café). Se muestran imágenes representativas de cortes histológicos de aortas de diferentes ratones en cada grupo de trabajo. Las aortas mostradas en la figura 17 se incubaron con una dilución 1:2000 del anticuerpo y con un tiempo de exposición de 30 seg.

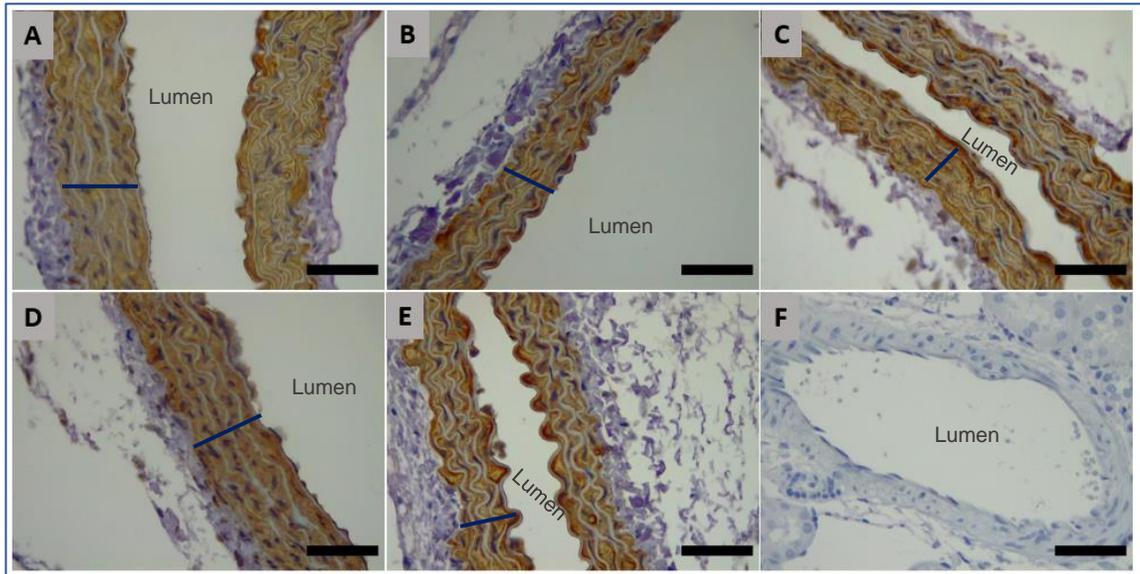


Figura 17. Detección de SM22 α en aorta mediante inmunohistoquímica (protocolo nuevo). Detección de SM22 α en aorta. A) Control; B) 30 min; C) 60 min; D) 90 min; E) AO; F) Control negativo sin anticuerpo primario (riñón). El anticuerpo primario se utilizó en una dilución 1/2000 (90 min, temperatura ambiente). Para el revelado se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa con cromógeno DAB. Se realizó contraste nuclear con hematoxilina. Las imágenes se tomaron con aumento 40x. La barra negra indica una de escala de 50 μ m. La barra azul marino indica capas de VSMC en la túnica media de la aorta.

En la figura 18, es posible ver imágenes representativas de cortes histológicos de aorta a los diferentes tiempos de ejercicio, incubadas con anticuerpo contra IL-6 con una dilución 1:50. Se observó la presencia de IL-6 en VSMC. El nivel de intensidad de su marca fue mayor cerca de la capa íntima y a medida que se acercaba a la capa adventicia, la intensidad de la marca disminuyó.

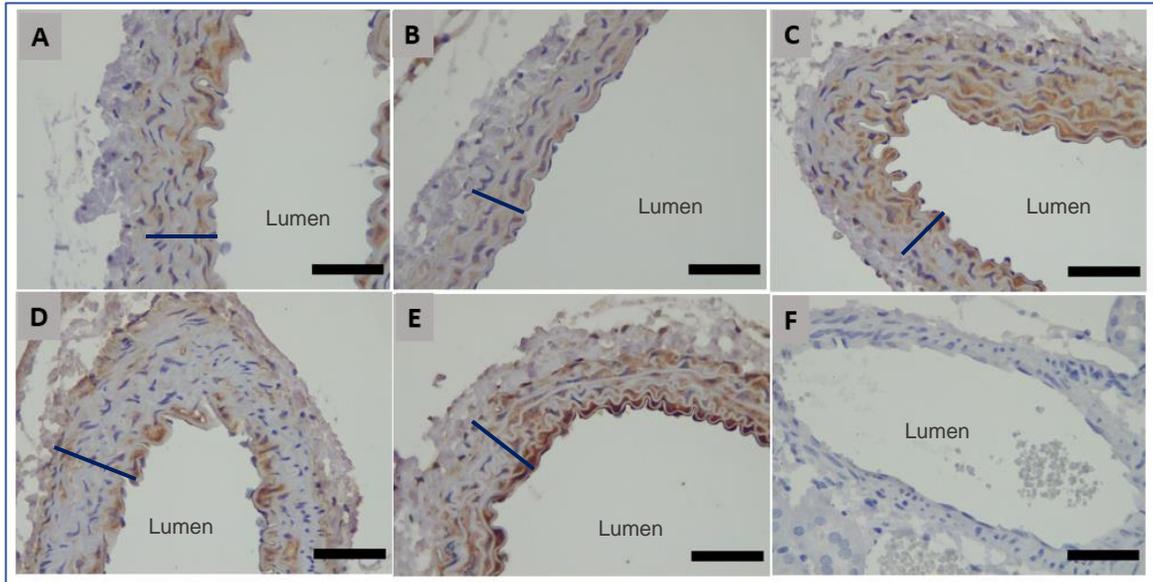


Figura 18. Detección de IL-6 en aorta mediante inmunohistoquímica (protocolo nuevo).

Detección de IL-6 en aorta. A) Control; B) 30 min; C) 60 min; D) 90 min; E) AO; F) Control negativo sin anticuerpo primario (Riñón). El anticuerpo primario se utilizó en una dilución 1/50 (90 min, temperatura ambiente). El revelado se realizó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa con cromógeno DAB. El contraste nuclear se realizó con hematoxilina. Las imágenes se tomaron con aumento 40x. La barra negra muestra la escala de 50 μm . La barra azul marino muestra las capas de VSMC en la túnica media de la aorta.

En la figura 19, se observa la expresión del propéptido de Miostatina en VSMC de aorta. Las muestras se incubaron con anticuerpo contra Miostatina a una dilución 1:50 y expuestas durante 60 seg. Al parecer, la intensidad de la marca es mayor en el grupo AO.

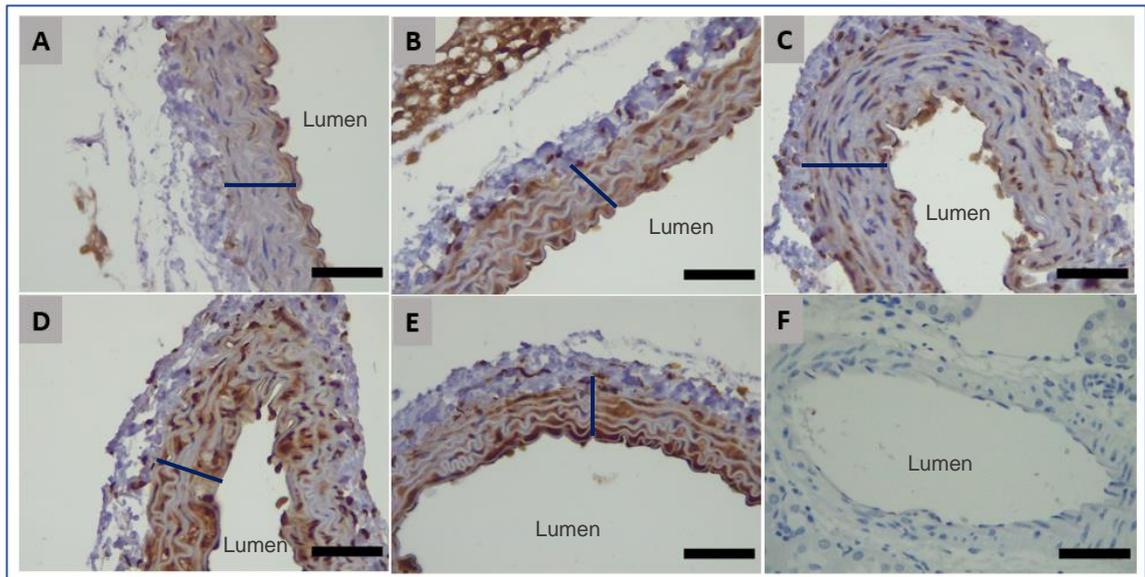


Figura 19. Detección de Miostatina en aorta mediante inmunohistoquímica (protocolo nuevo).

Detección del propéptido de Miostatina en aorta. A) Control; B) 30 min; C) 60 min; D) 90 min; E) AO; F) Control negativo sin anticuerpo primario (riñón). El anticuerpo primario se usó en una dilución 1/50 (90 min, temperatura ambiente). El revelado se realizó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa con cromógeno DAB. El contraste nuclear se realizó con hematoxilina. Las imágenes se tomaron con aumento 40x. La barra negra muestra la escala de 50 μm . La barra azul marino muestra las capas de VSMC en la túnica media de la aorta.

6.6. Detección de IL-6 y Miostatina en VSMC de aorta de ratón a diferentes tiempos de ejercicio *endurance*

Se realizó IHQ con nuevos cortes seriados para IL-6, Miostatina y SM22 α . En la figura 20 se observa la semicuantificación de cada mioquina. La identificación de las VSMC en los cortes histológicos se realizó utilizando SM22 α . Como era de esperar, toda la población celular de la túnica media son células positivas para SM22 α (ver barra azul en las Figuras 17 a la 19). Al analizar los cortes teñidos con anticuerpo anti-IL-6 se observó una tendencia a disminuir su densidad óptica a los 60 min ($p=0,35$ respecto al control) y luego aumentó alcanzando los niveles basales. Se observó una diferencia significativa entre el grupo de 60 min con el grupo AO ($p=0,01$). Esta tendencia fue similar a la observada con la cuantificación de proteínas mediante ELISA. En el caso de Miostatina, no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, existió una tendencia al aumento en la media de la densidad óptica en el grupo AO ($p=0,1$).

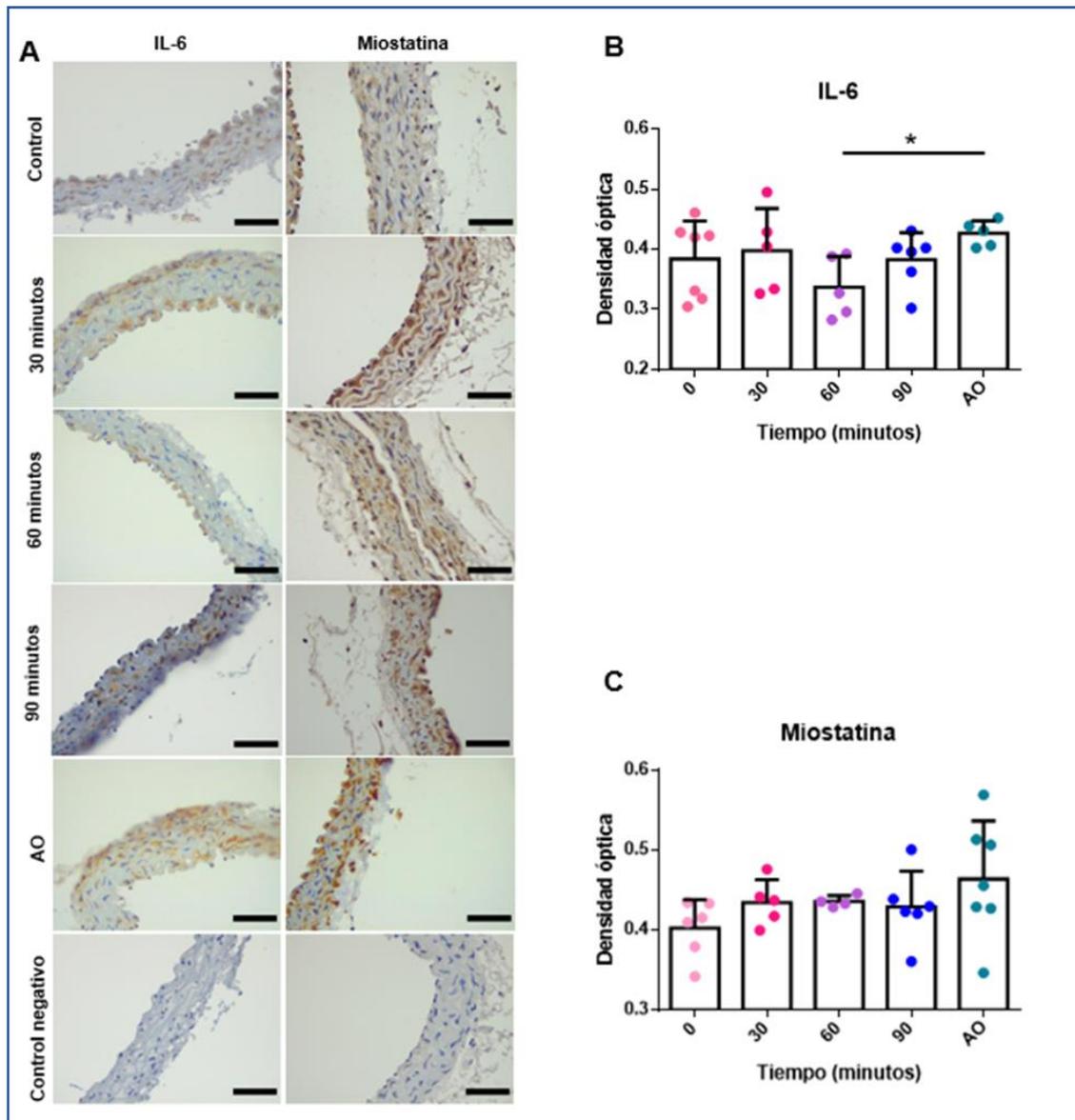


Figura 20. Semicuantificación de los niveles proteicos de IL-6 y Miostatina en aorta de ratón (protocolo nuevo).

Ambas mioquinas se detectaron en aorta mediante inmunohistoquímica. A) Imágenes representativas de aortas de ratones de los diferentes grupos experimentales, tomadas con un aumento 40x y con una escala correspondiente a 50 μ m. Panel izquierdo corresponde a IL-6 y panel derecho a Miostatina. La incubación de anticuerpo primario se realizó con una dilución 1/50 (90 min, temperatura ambiente). El revelado se realizó con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa con cromógeno DAB. El contraste nuclear se realizó con hematoxilina. El control negativo correspondió a una muestra incubada sin el anticuerpo primario. B) Semicuantificación de la densidad óptica de IL-6 (n=5-7). C) Semicuantificación de la densidad óptica de Miostatina (n=4-7). Análisis de datos no paramétricos, Kruskal-Wallis, post test Dunn's, *p<0.05 relativo al control

7. DISCUSIÓN

Hoy en día se conoce que la actividad física es clave para prevenir y combatir enfermedades no transmisibles como las enfermedades cardiovasculares.⁵ El músculo esquelético, al ser principal órgano efector de la actividad física, libera mioquinas para intercomunicar diferentes sistemas y satisfacer la demanda energética del cuerpo.¹² Entre estos factores del ejercicio encontramos a IL-6 y Miostatina, donde la primera tiene una acción antiinflamatoria y la segunda está implicada en la regulación negativa del crecimiento muscular.^{33,62} Se ha reportado en literatura que, a nivel de mRNA y proteína, IL-6 aumenta sus niveles y Miostatina los disminuye luego de la actividad física.⁹ Además de células musculares esqueléticas, también se ha descrito que estas mioquinas se expresan por otros tipos celulares, como por ejemplo, células musculares lisas.^{45,62} Sin embargo, se desconoce si el ejercicio es capaz de regular su expresión en VSMC.

Para poder responder esto, se realizó un protocolo de ejercicio en el que un grupo de ratones C57BL/6J corrieron al 60% de la VAM grupal. Sin embargo, en los resultados de este grupo de animales se observaron dispersiones elevadas en cada condición experimental. Incluso, la VAM del grupo de 90 min fue significativamente diferente respecto a las VAM del grupo control (0 min). Esto pudo deberse a que la selección de cada animal para las diferentes condiciones experimentales no fue azarosa, sino que aquellos ratones que tuvieron una VAM menor en el grupo que se eutanasiaría se dejaron en el grupo control. Luego, al analizar la expresión del mRNA de la mitad superior de la aorta, a pesar de que la media de la expresión de mRNA aumentó a los 30 min en ambas mioquinas, no se obtuvieron cifras significativas debido a que las desviaciones estándar de cada grupo eran muy elevadas (Figura 3). Para solucionar esto, se ideó un nuevo protocolo de ejercicio.

Según lo reportado en literatura, en protocolos de ejercicio agudo que han investigado la expresión de IL-6 a nivel de mRNA y proteína, su regulación es dependiente tanto de la intensidad como de la duración del ejercicio. Además, es un sensor energético, ya que su transcripción aumenta conforme disminuye la reserva de glicógeno en el músculo esquelético.^{69,72,73} En los protocolos descritos, los ratones corren

a exigencias mayores, como por ejemplo, 3 h a 24 m/min (que sería una VAM 100% de mis ratones),⁶⁸ 15 m/min durante 120 min, con una inclinación de 5 grados⁷⁴, al igual que los míos, pero corren a una VAM inferior. Entonces, en base a todos los datos presentados en el nuevo protocolo los ratones corrieron al 60% de su VAM individual y se agregó el grupo AO, donde los ratones corrieron hasta la fatiga. Es necesario mencionar que todos los animales de este grupo corrieron sobre 100 min (Tabla 4). En el protocolo nuevo, la selección de los animales para cada grupo experimental fue azarosa. A diferencia del primer protocolo realizado, no existieron diferencias significativas entre las VAM de cada grupo. La tabla comparativa entre los protocolos encontrados en literatura y el utilizado en esta tesis se encuentran en la tabla 5. Para futuros experimentos se sugiere la inclusión de un nuevo grupo experimental, el que se componga de ratones que no realizaron la prueba incremental ni el proceso de aclimatación a la trotadora, por lo que no son expuestos a la trotadora. De esta manera se podría analizar si el proceso antes de la prueba incremental influye en la expresión de estas mioquinas.

Tabla 5 Comparación entre protocolos de ejercicio tipo endurance realizados con ratones C57BL/6J para expresar IL-6.

Se resumen las características entre los protocolos reportados en literatura y el protocolo utilizado en esta tesis

| | Protocolo 1 | Protocolo 2 | Protocolo 3 | Protocolo Tesis |
|---------------------------|---|---|---|---|
| Velocidad (m/min) | 24 | 20 | 15 | 12,6-13,5 |
| Inclinación trotadora (%) | 7 | 10 | 5 | 5 |
| Tiempo (min) | 180 | 90 | 120 | 30-180 |
| Edad (semanas) | 8 | 8 | ~10 | 8 |
| Momento de eutanasia | Inmediatamente terminada la sesion de ejercicio | 1 y 3 h después de terminado el protocolo | Inmediatamente terminada la sesion de ejercicio | Inmediatamente terminada la sesion de ejercicio |
| Referencia | Tominaga, T., <i>et. al</i> 2019 | Alisson L., <i>et. al</i> 2021 | Castellani, L., <i>et. al</i> , 2015 | |

Una vez obtenida la muestra, se comenzó a estandarizar los partidores. En este trabajo se escogió aquellos con una eficiencia cercana a 100% y un R² cercano a 1. Según literatura, la eficiencia de partidores debe estar en un rango de 100 ± 10%, de

esta manera nos aseguramos que por cada ciclo se duplica la cantidad de material genético.⁷⁵ Además, un coeficiente de correlación lineal de Pearson, R^2 , cercano a 1 indica que la amplificación es lineal a diferentes concentraciones de la muestra.⁷⁵ En el caso de IL-6 se obtuvo una eficiencia de 122,88%. Una eficiencia significativamente mayor a 100% normalmente hace referencia a un error experimental como por ejemplo, una mala dilución seriada de la muestra.⁷⁵ SYBR Green, es un fluoróforo que funciona como molécula reportera para la determinación del C_T de cada gen blanco. Esta molécula se une a DNA doble hebra de forma inespecífica por lo que también puede unirse a dímeros de partidores. Para descartar esta opción, al momento de estandarizar los partidores se analizó la curva de *melting*. A pesar de usar concentraciones elevadas de partidores de IL-6, Miostatina y β -actina, no se observó formación de dímeros de partidador.

En literatura, la β -actina se ha utilizado ampliamente como gen *housekeeping*, ya que se asume que su expresión es constante. Sin embargo, bajo ciertos estímulos, como el ejercicio, su expresión en muestras de músculo esquelético humano presenta variaciones antes y después de este.⁷⁶ Debido a esto, autores como Jemiolo *et al.* sugieren el uso de más de un gen *housekeeping* cuando el estímulo usado sea la actividad física.⁷⁶ Por esta razón, a pesar de que la expresión de β -actina no presenta grandes variaciones en las condiciones experimentales utilizadas, se optó por el uso de un segundo gen *housekeeping* (18S) en la técnica RT-qPCR, de esta manera los resultados son de mayor confianza.

A pesar de que aún no se obtienen resultados significativos en la expresión de mRNA de ambas mioquinas en aorta, se observó una disminución en las desviaciones estándar de cada grupo experimental en comparación al primer protocolo utilizado. Esto conllevó a que los valores “*p*” fueran menores. Es posible que al aumentar el tamaño muestral de este experimento de cinética de expresión se obtengan cifras significativas. La disminución en las desviaciones presentadas en el segundo protocolo respecto al primero pueden deberse a que al iniciar con esta tesis no se limpiaba correctamente las aortas. Debido a esto, en el primer protocolo podría haber interferencia de otros tipos celulares, aumentando la dispersión de los datos. A pesar de que en el segundo

protocolo la limpieza de la muestra se optimizó, se propone la utilización de detergentes como saponina para limpiar células endoteliales de aorta y que de esta manera no exista interferencia de este tipo celular en experimentos como RT-qPCR. Por otra parte, se conoce que la aorta varía en su composición de VSMC y expresión de elastina o colágeno a medida que se aleja del corazón⁷⁷. Entonces, para que la utilización de la muestra sea más homogénea se sugiere usar para RT-qPCR y ELISA porciones de aortas mezcladas entre la primera y la segunda mitad de la aorta descendente. De esta manera es posible que se encuentre una relación entre la expresión del mensajero y la proteína de estas mioquinas.

En el primer protocolo de ejercicio utilizado se observó una tendencia a aumentar la expresión del mRNA de IL-6 en aorta a los 90 min y en cuádriceps a partir de los 30 min para luego descender a niveles basales (normalización respecto a β -actina). Una situación similar obtuvimos al analizar los datos de su expresión con el protocolo nuevo. En este caso, se aprecia una tendencia a aumentar a los 90 min en aorta. Sin embargo, el grupo AO está más cercano a cambios significativos al normalizar su expresión con β -actina ($p=0,167$ respecto al control). El hecho de que con β -actina se obtengan cifras más cercanas a la significancia en comparación a la normalización con 18S puede deberse a que la expresión de β -actina en las muestras de aorta es más estable que la expresión del gen 18S. En cuádriceps, al normalizar la expresión de IL-6 con ambos genes *housekeeping*, el grupo de 60 min y el AO presentan tendencias claras de aumento de la expresión de mRNA. Estos resultados se condicen con la literatura, ya que como se dijo anteriormente, la expresión del mRNA de IL-6 es dependiente de las reservas de glicógeno muscular. Por lo tanto, a medida que aumenta el tiempo de actividad física, menores son estas reservas y mayor es la expresión del gen de IL-6.⁶⁹ Además, en ratones que corren durante 3 h en una trotadora, la expresión del mRNA de IL-6 es significativamente mayor respecto al grupo control en el músculo soleo y gastrocnemio.⁶⁸ Por otra parte, se ha descrito una expresión significativamente mayor en *vastus lateralis* de humanos que realizan *knee extensor* durante 90 y 180 min.⁷⁸

Para la cuantificación de IL-6 se utilizaron dos kits ELISA diferentes. Con el primer kit solo se cuantificaron 10 muestras, debido a que todas las restantes tenían una

concentración menor a la sensibilidad del kit (15,6 pg/mL). Por esta razón, se utilizó un segundo kit de mayor sensibilidad. De esta manera se obtuvo señal de todas las muestras de aorta, por lo que es el kit más efectivo para la medición de esta mioquina en aorta. Sin embargo, en plasma aún no es posible determinar la concentración de IL-6, probablemente porque se han utilizado muestras muy diluidas. Por esta razón se sugiere para experimentos posteriores, utilizar directamente la muestra de plasma o utilizar alguna técnica para concentrar proteína como la co-inmunoprecipitación o liofilizar el plasma antes de analizar proteína. Al analizar la expresión de IL-6 en aorta mediante ELISA, observamos una leve tendencia a disminuir sus niveles en los primeros 30 min de ejercicio. Sin embargo, a medida que aumentó el tiempo que corrieron los ratones, también aumentaron los niveles de IL-6 alcanzando los basales. Este aumento fue casi significativo entre los 30 min y el grupo AO ($p=0,12$). En literatura, se muestra que gastrocnemios de ratones sedentarios analizados mediante ELISA poseen una concentración de IL-6 de 31,9 pg/mg, mientras que luego de correr durante 3 h aumenta a 39,3 pg/mg,⁶⁸ valores similares a los obtenidos en las aortas analizadas en esta tesis donde en el grupo control y AO se obtuvo 33,9 pg/mL y 38,7 pg/mL, respectivamente.

Al analizar las imágenes de inmunohistoquímica, tal como se esperaba, la detección de SM22 α , proteína de la maquinaria contráctil de las VSMC adultas,⁷⁹ marcó exclusivamente las VSMC de la túnica media de la aorta. Al detectar la presencia de IL-6, realizar el análisis de la densidad óptica de sus píxeles y graficarlos, encontramos una expresión similar a la obtenida por la técnica de ELISA. Se detectó un aumento estadísticamente significativo en sus niveles entre el grupo 60 min y el grupo AO. Cuando se analiza la muestra mediante ELISA se utiliza un homogenizado de la aorta completa, mientras que con IHQ se analiza específicamente la túnica media de la arteria. Esta diferencia podría explicar que con ELISA se observe una leve disminución de la expresión de IL-6 a los 30 min para luego aumentar a los niveles basales y que en el caso de IHQ sea a los 60 min.

Al comparar los niveles de mRNA y proteínas de IL-6 en aorta, es posible notar que en un principio la expresión del mRNA se mantiene sin cambios aparentes hasta los 90 min. Luego, su expresión aumenta cercano a la significancia cuando los ratones

corrieron sobre los 100 min. En cuanto a la proteína, durante los primeros minutos de ejercicio tiende a disminuir su expresión, pero esta vuelve a sus niveles basales a las 2 h de ejercicio. Entonces es probable que en VSMC, en un inicio aumente la traducción del mRNA de IL-6, y a tiempos mayores de ejercicio aumente la transcripción de este logrando alcanzar los niveles basales de esta proteína. Sin embargo, aún no es posible concluir esto, pues solo contamos con tendencias de cambio y no cambios estadísticamente significativos. A pesar de que aún no se sabe cuál es la función de IL-6 en VSMC por acción del ejercicio de resistencia, es posible que participe en procesos de proliferación o migración celular como ya se ha visto en estudios en la línea celular C2C12²⁹ mediando el proceso de angiogénesis observado en vasculatura de deportistas.

En el caso de Miostatina, desde el primer protocolo utilizado, observamos que contrario a lo esperado, a los 30 min la expresión de su mRNA tuvo una tendencia a aumentar para luego volver a niveles basales. Algo similar se observó en cuádriceps al normalizar respecto a β -actina. En el segundo protocolo usado, la tendencia a aumentar se apreció desde los 90 min en aorta (normalización respecto a 18S) y en cuádriceps fue significativo a los 60 min al normalizar su expresión con 18S. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con IL-6. Normalmente Miostatina es un regulador negativo del crecimiento muscular, por lo que tiene sentido que esta disminuya durante la actividad física.^{54,80} Sin embargo, se ha demostrado que también cumple un rol importante en el metabolismo del músculo durante el ejercicio.^{54,80} En ejercicio agudo, el músculo obtiene su energía principalmente de las reservas de glicógeno y de la glucosa sanguínea. La Miostatina regula la captación y uso de glucosa del músculo esquelético.⁸¹ Además, induce la expresión de mensajeros de genes asociados a glicólisis como Glut 4 y Glut 1⁸¹; asimismo, se ha descrito que aumenta el mRNA de IL-6 y su receptor.⁸¹ Por otra parte, se ha demostrado en ratones C57BL/6J que esta mioquina es importante para la capacidad aeróbica de estos animales, puesto que ratones *wild type* corren mayores distancias en el tiempo en comparación a ratones *knockout* de este gen, además son mas resistentes a la fatiga.⁸⁰ El rol metabólico de Miostatina nos ayudaría a entender porqué observamos una tendencia a aumentar su expresión a nivel de mRNA como de proteína durante el ejercicio. Sin embargo, al ser tendencias aún no es posible concluir nada al respecto. Otro aspecto a tener en consideración es que en nuestro protocolo, los

ratones son eutanasiados inmediatamente terminada la sesión de ejercicio, en cambio, en protocolos observados en literatura no es así. En un trabajo en el que ratas realizan un *single bout* de natación durante una hora, se observó una disminución significativa del mRNA de Miostatina en gastrocnemio.⁶⁴ También se observó esto en músculo *vastus lateralis* y soleo de humanos que corrieron durante 45 min.⁸² Sin embargo, en estos artículos las muestras se tomaron a las 4, 7 y 24 h después de terminada la sesión de ejercicio. Recientemente el grupo de Śliwicka, E., *et. al.* ha demostrado un aumento en los niveles de Miostatina plasmática en muestras de corredores aficionados que corren la maratón de Visegrad (42,195 Km). Estas muestras son tomadas 24 h luego de terminada la competición. Es conocido que en el ejercicio de larga duración (sobre 3 h) existe una respuesta inflamatoria asociada a daño muscular. En este caso se observa una correlación positiva entre la expresión de TNF- α y Miostatina lo que sugiere un rol más bien negativo en músculo al estar relacionada a inflamación⁸³. El grupo de Kerschán-Schindl K., *et. al.* también observó un aumento de los niveles plasmáticos de Miostatina en atletas de alto rendimiento que corrieron la ultramaratón Espartatlón (246 Km). En este caso las muestras fueron tomadas inmediatamente terminada la carrera y a los tres días de iniciada la competencia. Se observa un aumento de Miostatina en el tiempo que también relacionan a inflamación por daño muscular al ser carreras de sobre-exigencia. Por lo que, una vez obtenidos cambios estadísticamente significativos en nuestros animales sería interesante medir marcadores de inflamación como TNF- α para conocer si es que la tendencia de aumento se relaciona a procesos inflamatorios⁸⁴.

Al analizar la expresión de Miostatina en aorta mediante ELISA, no se observaron cambios significativos, pero si una tendencia a aumentar a los 90 min. En plasma, no se pudo observar tendencias puesto que son pocas muestras cuantificadas, ya que algunas de las evaluadas estaban por sobre el límite lineal de detección superior del kit utilizado. Estas deberán ser diluidas y cuantificadas nuevamente antes de poderlas agregar a este análisis.

Al analizar las imágenes de inmunohistoquímica de Miostatina y compararlas con las de SM22 α , se verificó que las VSMC expresan Miostatina. Al realizar la semicuantificación no se observaron diferencias significativas entre los grupos

experimentales. Se detectaron solo tendencias a aumentar su expresión a partir de los 30 min y al correr sobre 100 min (grupo AO). Es probable que esta diferencia entre los resultados obtenidos por ELISA e IHQ se deban a que en la primera técnica se trabajó con el dímero activo de Miostatina, mientras que en la segunda se analizó la expresión del propéptido. Al comparar la expresión del mRNA de Miostatina y la proteína por ELISA encontramos similitudes como que su expresión no varió hasta los 90 min de ejercicio. Sin embargo, el propéptido mostró tendencia de aumento desde los 30 min (IHQ), por lo que es probable que exista mRNA preformado de Miostatina y en los primeros minutos del ejercicio aumente su traducción o disminuya la degradación proteica de esta mioquina. Aún no se conoce el efecto de Miostatina sobre VSMC por acción del ejercicio de resistencia, pero es posible que tenga un rol dentro del mecanismo regulatorio de la proliferación y migración celular durante el remodelado vascular o también podría estar implicada en la expresión de genes contráctiles o de la matriz extracelular, puesto que ya se ha visto que favorece la expresión de ciertos genes como algunos relacionados a glicolisis en células de músculo esquelético.⁸¹

En cuanto a la temporalidad de expresión de IL-6 por acción de una sesión aguda de ejercicio de resistencia, se observó que en VSMC existe una tendencia de aumento en la expresión de estas mioquinas a partir de los 90 min. En literatura, encontramos que IL-6 aumenta significativamente a partir de los 30 min.^{67,78} Esto puede deberse a que el músculo esquelético como se dijo anteriormente es el encargado de la comunicación entre diferentes sistemas para satisfacer la demanda energética.¹² Entre los efectos fisiológicos del ejercicio a nivel cardiovascular encontramos un aumento del gasto cardíaco y, por consiguiente, un aumento en el flujo sanguíneo. Esto provoca un aumento de la fuerza tangencial o mejor conocido como *shear stress*. El *shear stress* provoca un estiramiento de células endoteliales y de VSMC generando por ejemplo, una respuesta vasodilatadora al inducir la liberación de NO de las células endoteliales lo que regula el tono vascular durante el ejercicio^{8,77} y también modifica la expresión de genes en VSMC.⁷⁷ Por lo que es posible esperar una respuesta más tardía al ejercicio en VSMC.

8. PROYECCIONES

Al ser esta una nueva línea de investigación es necesario realizar más experimentos para complementar los resultados obtenidos en esta tesis, entre ellos, llevar a cabo la tinción de muestras de aorta con anticuerpo contra la fracción activa de Miostatina mediante IHQ. Además, se podría analizar la expresión de estas mioquinas a los mismos tiempos de terminada la sesión de ejercicio y así corroborar que el ejercicio es el inductor de estas mioquinas en aorta. También, se podrían analizar otro tipo de vasos sanguíneos para robustecer estos resultados, por ejemplo, utilizar vasos sanguíneos de resistencia, como la arteria femoral. Además, se podría seguir investigando el rol que tienen estas mioquinas en músculo liso en un protocolo de entrenamiento crónico y entender los efectos a largo plazo en vasculatura.

9. CONCLUSIONES

1. Se optimizó un protocolo de ejercicio agudo en ratones C57BL/6J.
2. Se demostró que las mioquinas IL-6 y Miostatina son expresadas en VSMC.
3. Se detectó aumento significativo de IL-6 en aorta sólo por IHQ entre los 60 min de ejercicio y el grupo AO.
4. La determinación de los mRNA y proteínas de IL-6 y Miostatina sólo detectó tendencias a aumentar su expresión en protocolos de ejercicio sobre los 90 min.
5. Es necesario aumentar el tamaño muestral para obtener resultados confiables.

Entonces, se concluye que las células musculares lisas vasculares expresan las mioquinas IL-6 y Miostatina por acción del ejercicio agudo tipo *endurance*. Sin embargo, aún faltan experimentos para determinar cuál es el efecto de este tipo de ejercicio sobre la expresión de cada una.

10. REFERENCIAS

1. 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).
2. Liao, J., Zhang, Y., Wu, Y., Zeng, F. & Shi, L. Akt modulation by miR-145 during exercise-induced VSMC phenotypic switching in hypertension. *Life Sci.* **199**, 71–79 (2018).
3. WHO | World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data. <https://www.who.int/gho/ncd/en/>.
4. WHO | World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
5. Fiuza-Luces, C., Garatachea, N., Berger, N. A. & Lucia, A. Exercise is the real polypill. *Physiology* vol. 28 330–358 (2013).
6. Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J. & Zierath, J. R. Integrative biology of exercise. *Cell* vol. 159 738–749 (2014).
7. 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).
8. Thyfault, J. P. & Bergouignan, A. Exercise and metabolic health: beyond skeletal muscle. *Diabetologia* **63**, 1464–1474 (2020).
9. Ost, M., Coleman, V., Kasch, J. & Klaus, S. Regulation of myokine expression: Role of exercise and cellular stress. *Free Radic. Biol. Med.* **98**, 78–89 (2016).
10. Gleeson, M. Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology* vol. 103 693–699 (2007).
11. Green, D. J. & Smith, K. J. Effects of exercise on vascular function, structure, and health in humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, (2018).

12. Ball, D. Metabolic and endocrine response to exercise: Sympathoadrenal integration with skeletal muscle. *Journal of Endocrinology* vol. 224 R79–R95 (2015).
13. Görgens, S. W., Eckardt, K., Jensen, J., Drevon, C. A. & Eckel, J. Exercise and Regulation of Adipokine and Myokine Production. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **135**, 313–336 (2015).
14. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* **8**, 457–465 (2012).
15. Febbraio, M. A., Hiscock, N., Sacchetti, M., Fischer, C. P. & Pedersen, B. K. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes* **53**, 1643–1648 (2004).
16. Starkie, R., Ostrowski, S. R., Jauffred, S., Febbraio, M. & Pedersen, B. K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB J.* **17**, 1–10 (2003).
17. Whitham, M. & Febbraio, M. A. The ever-expanding myokinome: Discovery challenges and therapeutic implications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 719–729 (2016).
18. Raschke, S. & Eckel, J. Adipo-Myokines: Two sides of the same coin - Mediators of inflammation and mediators of exercise. *Mediators Inflamm.* **2013**, (2013).
19. Schering, L. *et al.* Identification of novel putative adipomyokines by a cross-species annotation of secretomes and expression profiles. *Arch. Physiol. Biochem.* **121**, 194–205 (2015).
20. Stefan, N. & Häring, H. U. The role of hepatokines in metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 144–152 (2013).
21. Johnen, H. *et al.* Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- β superfamily cytokine MIC-1. *Nat. Med.* **13**, 1333–1340 (2007).
22. Park, S. H. *et al.* Two in-and-out modulation strategies for endoplasmic reticulum stress-linked gene expression of pro-apoptotic macrophage-

- inhibitory cytokine 1. *J. Biol. Chem.* **287**, 19841–19855 (2012).
23. Murata, Y., Konishi, M. & Itoh, N. FGF21 as an endocrine regulator in lipid metabolism: From molecular evolution to physiology and pathophysiology. *J. Nutr. Metab.* **2011**, (2011).
 24. Woo, Y. C., Xu, A., Wang, Y. & Lam, K. S. L. Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: Clinical perspectives. *Clinical Endocrinology* vol. 78 489–496 (2013).
 25. Catoire, M. & Kersten, S. The search for exercise factors in humans. *FASEB J.* **29**, 1615–1628 (2015).
 26. Taga, T. & Kishimoto, T. Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 797–819 (1997).
 27. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. A. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* **88**, 1379–1406 (2008).
 28. Muñoz-Cánoves, P., Scheele, C., Pedersen, B. K. & Serrano, A. L. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: A double-edged sword? *FEBS J.* **280**, 4131–4148 (2013).
 29. Steyn, P. J., Dzobo, K., Smith, R. I. & Myburgh, K. H. Interleukin-6 induces myogenic differentiation via JAK2-STAT3 signaling in mouse C2C12 myoblast cell line and primary human myoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 30. Geiger, T. *et al.* Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur. J. Immunol.* **18**, 717–721 (1988).
 31. Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M. & Shiina, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science* vol. 122 143–159 (2012).
 32. Trivax, J. E. & McCullough, P. A. Phidippides cardiomyopathy: A review and case illustration. *Clinical Cardiology* vol. 35 69–73 (2012).
 33. McGinnis, G. R. *et al.* Interleukin-6 mediates exercise preconditioning against myocardial ischemia reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **308**, H1423–H1433 (2015).

34. Eckardt, K., Görgens, S. W., Raschke, S. & Eckel, J. Myokines in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetologia* vol. 57 1087–1099 (2014).
35. Steinbacher, P. & Eckl, P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* vol. 5 356–377 (2015).
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. Demyanets, S., Huber, K. & Wojta, J. Vascular effects of glycoprotein130 ligands - Part I: Pathophysiological role. *Vascular Pharmacology* vol. 56 34–46 (2012).
38. Rose-John, S. The soluble interleukin-6 receptor and related proteins. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 29 787–797 (2015).
39. Lust, J. A. *et al.* Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* **4**, 96–100 (1992).
40. Mülberg, J. *et al.* The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* **23**, 473–480 (1993).
41. Tawara, K., Oxford, J. T. & Jorczyk, C. L. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: Potential of anti-IL-6 therapies. *Cancer Management and Research* vol. 3 177–189 (2011).
42. Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. & Baumann, H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 7251–7255 (1987).
43. Loppnow, H. & Libby, P. Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J. Clin. Invest.* **85**, 731–738 (1990).
44. Viedt, C. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation

- and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor- κ B and activator protein-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 914–920 (2002).
45. 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).
 46. Han, Y., Runge, M. S. & Brasier, A. R. Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- κ B transcription factors. *Circ. Res.* **84**, 695–703 (1999).
 47. Wang, Z. & Newman, W. H. Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J. Surg. Res.* **111**, 261–266 (2003).
 48. Wang, Z., Castresana, M. R. & Newman, W. H. Reactive oxygen and NF- κ B in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 669–674 (2001).
 49. Yao, J. S. *et al.* Interleukin-6 upregulates expression of KDR and stimulates proliferation of human cerebrovascular smooth muscle cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**, 510–520 (2007).
 50. Holmes, A. G., Watt, M. J. & Febbraio, M. A. Suppressing lipolysis increases interleukin-6 at rest and during prolonged moderate-intensity exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* **97**, 689–696 (2004).
 51. Lenk, K. *et al.* Impact of exercise training on myostatin expression in the myocardium and skeletal muscle in a chronic heart failure model. *Eur. J. Heart Fail.* **11**, 342–348 (2009).
 52. McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* **387**, 83–90 (1997).
 53. HOSOYAMA, T. *et al.* Molecular Cloning of Equine (Thoroughbred) Myostatin cDNA and Detection of Myostatin Precursor Proteins in the

- Serum. *J. Reprod. Dev.* **48**, 335–335 (2002).
54. Allen, D. L., Hittel, D. S. & McPherron, A. C. Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation. *Med. Sci. Sports Exerc.* **43**, 1828–1835 (2011).
 55. Ahima, R. S. & Park, H.-K. Connecting Myokines and Metabolism. *Endocrinol Metab* **30**, 235–245 (2015).
 56. Clop, A. *et al.* A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* **38**, 813–818 (2006).
 57. Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P. L. & Bass, J. J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* **7**, 910–916 (1997).
 58. Schuelke, M. *et al.* Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2682–2688 (2004).
 59. Deng, B. *et al.* The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals. *Nutrition and Metabolism* vol. 14 (2017).
 60. Lee, S. J. & Glass, D. J. Treating cancer cachexia to treat cancer. *Skeletal Muscle* vol. 1 1–5 (2011).
 61. Verzola, D. *et al.* Myostatin mediates abdominal aortic atherosclerosis progression by inducing vascular smooth muscle cell dysfunction and monocyte recruitment. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
 62. Ciarmela, P., Wiater, E., Smith, S. M. & Vale, W. Presence, actions, and regulation of myostatin in rat uterus and myometrial cells. *Endocrinology* **150**, 906–914 (2009).
 63. Kovanecz, I. *et al.* Myostatin, a profibrotic factor and the main inhibitor of striated muscle mass, is present in the penile and vascular smooth muscle. *Int. J. Impot. Res.* **29**, 194–201 (2017).
 64. Matsakas, A., Friedel, A., Hertrampf, T. & Diel, P. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content

- in the rat. *Acta Physiol. Scand.* **183**, 299–307 (2005).
65. Saremi, A. *et al.* Effects of oral creatine and resistance training on serum myostatin and GASP-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **317**, 25–30 (2010).
 66. Charan, J. & Kantharia, N. How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* vol. 4 303–306 (2013).
 67. Nagase, H., Yao, S. & Ikeda, S. Acute and chronic effects of exercise on mRNA expression in the skeletal muscle of two mouse models of peripheral artery disease. *PLoS One* **12**, 1–20 (2017).
 68. Tominaga, T., Ma, S., Saitou, K. & Suzuki, K. Glucose ingestion inhibits endurance exercise-induced IL-6 producing macrophage infiltration in mice muscle. *Nutrients* **11**, (2019).
 69. Keller, C. *et al.* Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J.* **15**, 2748–2750 (2001).
 70. Philip, C. & Fischer, P. Interleukin-6 in acute exercise and training : what is the biological relevance. *Dep. Infect. Dis. Rigshospitalet Univ. Hosp. Copenhagen* **1991**, 6–33 (2016).
 71. Four Parameter Logistic Regression - MyAssays. <https://www.myassays.com/four-parameter-logistic-regression.html>.
 72. K., O., P., S. & B.K., P. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans - Effect of intensity of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **83**, 512–515 (2000).
 73. Cullen, T., Thomas, A. W., Webb, R. & Hughes, M. G. Interleukin-6 and associated cytokine responses to an acute bout of high intensity interval exercise: the effect of exercise intensity and volume. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **41**, 1–25 (2016).
 74. Castellani, L. *et al.* Exercise-mediated IL-6 signaling occurs independent of inflammation and is amplified by training in mouse adipose tissue. *J. Appl. Physiol.* **119**, 1347–1354 (2015).

75. Stratagene. *Methods and Application Guide Introduction to Quantitative PCR Introduction to Quantitative PCR. Stratagene* vol. 7 (2004).
76. Jemiolo, B. & Trappe, S. Single muscle fiber gene expression in human skeletal muscle: Validation of internal control with exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 1043–1050 (2004).
77. Green, D. J., Hopman, M. T. E., Padilla, J., Laughlin, M. H. & Thijssen, D. H. J. Vascular Adaptation to Exercise in Humans: Role of Hemodynamic Stimuli. *Physiol. Rev.* **97**, 495 (2017).
78. Steensberg, A. *et al.* IL-6 and TNF- α expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **283**, 1272–1278 (2002).
79. Han, M. *et al.* Smooth muscle $\alpha 2$ maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling. *Life Sci.* **84**, 394–401 (2009).
80. Mouisel, E. *et al.* Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, 444–454 (2014).
81. Chen, Y. *et al.* Myostatin regulates glucose metabolism via the AMP-activated protein kinase pathway in skeletal muscle cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 2072–2081 (2010).
82. Harber, M. P. *et al.* Protein synthesis and the expression of growth-related genes are altered by running in human vastus lateralis and soleus muscles. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **296**, 708–714 (2009).
83. Śliwicka, E., Cisoń, T., Pilaczyńska-Szcześniak, Ł., Ziemia, A. & Straburzyńska-Lupa, A. Effects of marathon race on selected myokines and sclerostin in middle-aged male amateur runners. *Sci. Rep.* **11**, 1–9 (2021).
84. Kerschán-Schindl, K. *et al.* Changes in Serum Levels of Myokines and Wnt-Antagonists after an Ultramarathon Race. *PLoS One* **10**, (2015).