



**TESIS DOCTORAL**

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA CITOQUINA IL6 EN EL  
TEJIDO ADIPOSO Y SU FUNCIÓN FISIOLÓGICA EN EL EPITELIO  
RESPIRATORIO**

**SELENE DÍAZ CHAMORRO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y  
CELULAR, BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA**

**CONFORMIDAD DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL**

**Francisco Centeno Velázquez**

**José María Carvajal González**

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y codirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

**2023**



## FINANCIACIÓN

Mi incorporación al grupo de Investigación “Configuración de Sistemas Moleculares y Celulares (COSMYC)” ha sido posible gracias a una ayuda para la financiación de contratos predoctorales para la formación de doctores en los centros públicos de I+D pertenecientes al Sistema Extremeño de Ciencia, Tecnología e Innovación en el ejercicio 2017, cofinanciada por la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura y el Fondo Social Europeo (FSE). Decreto 45/2016, de 12 de abril. DOE 95 de 19 de mayo de 2017. **PD16038**.

La realización del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación procedente de:

- Ayuda **GR15164** para la realización de actividades de investigación y desarrollo tecnológico, de divulgación y de transferencia de conocimiento por los Grupos de Investigación de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería de Economía, e Infraestructuras de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Decreto 54/2016, de 3 de mayo. DOE 87, de 09 de mayo de 2016.
- Proyecto de Investigación **BFU2017-85547-P** obtenido en la convocatoria de 2017 dentro del plan de ayudas a proyectos de I+D correspondientes al Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia, Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento, en el marco del Plan Estatal de I+D+i 2013-2016. 13 de junio de 2017 (BOE núm. 140). Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.
- Proyecto de Investigación **IB18014** obtenido en la convocatoria de 2018 dentro del plan de ayudas destinadas a la realización de proyectos de investigación en los Centros Públicos de I+D+i de la Comunidad Autónoma de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería de Economía, Competitividad e Innovación de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Orden de 20 de marzo de 2018 (DOE n.º 86, de 4 de mayo).

- Ayuda **GR18116** para la realización de actividades de investigación y desarrollo tecnológico, de divulgación y de transferencia de conocimiento por los Grupos de Investigación de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería de Economía, Competitividad e Innovación de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Decreto 14/2018, de 6 de febrero. DOE 78, de 24 de abril de 2019.



## **RECONOCIMIENTOS**

La realización de los experimentos de microscopía confocal fueron llevados a cabo en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura. Los experimentos de microscopía electrónica de barrido (SEM) fueron realizados en el Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies (SACSS) de la Universidad de Extremadura.

Las líneas celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral fueron cedidas por la Dra. Guadalupe Sabio Buzo, del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, fruto de la colaboración con su grupo de investigación a través del proyecto SAF2013-43506-R. Las muestras de biopsias de tejido humano fueron obtenidas a través del Biobanco del Área de Salud de Badajoz.

Los plásmidos empleados para la transducción lentiviral fueron amablemente proporcionados por el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Fidalgo Pérez.



## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	
<b>1. Interleuquina 6 (IL6)</b> .....	7
<b>2. Rutas de señalización mediadas por IL6</b> .....	11
2.1. El receptor de IL6.....	11
2.2. Interacción entre IL6 y su receptor.....	14
2.3. Señalización clásica y trans-señalización.....	15
2.4. Rutas de señalización mediadas por IL6.....	18
2.4.1. IL6/JAK/STAT.....	19
2.4.2. IL6/JAK/SHP-2/MAPKs.....	20
2.4.3. IL6/JAK/PI3K/PKB.....	21
2.4.4. Regulación de la señalización mediada por IL6.....	22
<b>3. Regulación de la expresión de IL6</b> .....	23
3.1. Mecanismos transcripcionales de regulación de la expresión de IL6.....	23
3.2. Mecanismos postrcripcionales de regulación de la expresión de IL6.....	24
<b>4. Función fisiológica de IL6</b> .....	25
4.1. IL6 en el Sistema Inmunitario.....	25
4.2. IL6 en el Hígado.....	26
4.3. IL6 en el Sistema Nervioso.....	27
4.4. IL6 en el Músculo Esquelético.....	29
4.5. IL6 en el Páncreas.....	30
4.6. IL6 en el Tejido Adiposo.....	31
4.7. IL6 en el Sistema Respiratorio.....	37

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>1. Modelo murino: preadipocitos blancos</b> .....	45
1.1. Cultivo y expansión de los preadipocitos blancos de ratón.....	45
<b>2. Tratamientos en los cultivos celulares</b> .....	46
<b>3. Análisis de proteínas mediante <i>immunoblotting</i> (<i>Western blot</i>)</b> .....	47
3.1. Preparación de los extractos proteicos. Lisados.....	48
3.2. Cuantificación de la concentración de proteínas.....	48
3.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)....	49
3.4. Electrotransferencia en húmedo.....	50
3.5. Marcaje con anticuerpos y revelado de las membranas.....	50
<b>4. Análisis de los niveles de expresión por PCR cuantitativa</b> .....	51
4.1. Extracción de ARN.....	52
4.2. Retrotranscripción.....	53
4.3. PCR cuantitativa.....	53
<b>5. Modelo humano: células de bronquio humano</b> .....	55
5.1. Obtención de las células progenitoras de bronquio humano.....	55
5.2. Cultivo primario de células de bronquio humano. Expansión y diferenciación.....	56
5.3. Organoides de células de bronquio humano.....	58
<b>6. Inmortalización celular: generación de una línea estable de células del Sistema Respiratorio</b> .....	59
6.1. Producción de partículas lentivirales.....	59
6.2. Transducción con lentivirus y selección de los cultivos celulares.....	60
6.3. Obtención de clones aislados a partir de las células seleccionadas.....	62
<b>7. Tratamientos en los cultivos celulares de bronquio humano</b> .....	62
<b>8. Inmunofluorescencia en células de las vías respiratorias</b> .....	63
<b>9. Adquisición y análisis de imágenes de microscopía</b> .....	65
<b>10. Ensayo de <i>Doubling Time</i></b> .....	65



11. Medida de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER).....	66
12. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	66
13. Medida del batido de los cilios.....	67
14. Análisis estadístico.....	67

## **CAPÍTULO I**

RESUMEN CAPÍTULO I.....	71
-------------------------	----

### **OBJETIVOS CAPÍTULO I**

Objetivos capítulo I.....	75
---------------------------	----

### **RESULTADOS CAPÍTULO I**

1. Wnt5a y JNK controlan la expresión de IL6 en preadipocitos <i>Wt</i> de ratón.....	79
2. p38MAPKs regulan los niveles de expresión de IL6 en preadipocitos de ratón.....	83
3. La vía de señalización MEK/ERK está implicada en la modulación de los niveles de expresión de IL6 en preadipocitos de ratón.....	94
4. p38δ podría regular el estado de fosforilación de ERK1/2 en preadipocitos de ratón.....	101

### **DISCUSIÓN CAPÍTULO I**

1. Wnt5a y JNK participan en la regulación de la expresión de IL6 en preadipocitos de ratón.....	106
2. p38MAPKs están implicadas en la modulación de los niveles de expresión de IL6 en preadipocitos de ratón.....	108
3. La familia ERK podría participar en la regulación de los niveles de expresión de IL6 en preadipocitos de ratón.....	112
4. p38δ podría regular el estado de fosforilación de ERK1/2.....	113

## CONCLUSIONES CAPÍTULO I

Conclusiones Capítulo I.....	117
------------------------------	-----

## CAPÍTULO II

RESUMEN CAPÍTULO II.....	121
--------------------------	-----

### OBJETIVOS CAPÍTULO II

Objetivos capítulo II.....	125
----------------------------	-----

### RESULTADOS CAPÍTULO II

<b>1. Generación de una línea de células madre basales derivadas del epitelio de las vías respiratorias humanas.....</b>	<b>129</b>
1.1. Inmortalización de células basales progenitoras procedentes de las vías respiratorias humanas.....	130
1.2. Obtención de clones aislados a partir de las células basales seleccionadas.....	132
<b>2. Caracterización del potencial de diferenciación de la línea celular a lo largo de los diferentes subcultivos.....</b>	<b>133</b>
2.1. IL6 promueve la diferenciación de las células basales hacia células multiciliadas.....	139
2.2. IL6 promueve la pseudoestratificación del epitelio de las vías respiratorias humanas.....	145

### DISCUSIÓN CAPÍTULO II

<b>1. IL6 promueve la diferenciación de las células basales a células multiciliadas.....</b>	<b>153</b>
<b>2. IL6 promueve la pseudoestratificación del epitelio de las vías respiratorias humanas.....</b>	<b>157</b>

**CONCLUSIONES CAPÍTULO II**

**Conclusiones Capítulo II.....163**

**BIBLIOGRAFÍA GENERAL**

**Bibliografía.....167**



### TABLA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>ADNc</b>	ADN complementario	<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>ALI</b>	<i>Air-Liquid Interface</i>	<b>HRP</b>	<i>Horseadish peroxidase</i> / Peroxidasa de rábano
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>hTERT</b>	Telomerasa transcriptasa inversa humana
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>IL</b>	Interleuquina
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bobino	<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>CB</b>	Células basales	<b>MiARN</b>	Micro-ARN
<b>CBM</b>	Módulo de Unión a Citoquinas	<b>MOI</b>	<i>Multiplicity of Infection</i>
<b>CMC</b>	Células multiciliadas	<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>CS</b>	Células Secretoras	<b>PBS</b>	Tampón salino de fosfato
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol	<b>PBS-t</b>	PBS-tritón
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfoxido	<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>DNAsa</b>	Desoxirribonucleasa	<b>P/S</b>	Penicilina/Estreptomina
<b>DNTPs</b>	deoxinucleótidos trifosfato	<b>p/v</b>	Peso/Volumen
<b>EDTA</b>	Etilendiaminotetraacético	<b>QPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>EGTA</b>	ácido egtazico	<b>SDS</b>	Dodecil Sulfao Sódico
<b>EPOC</b>	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica	<b>SEM</b>	<i>Scanning Electroni Microscopy</i>
<b>FBS</b>	Suero fetal bobino	<b>SN</b>	Sistema Nervioso
<b>GDT</b>	guanosina difosfato	<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central

<b>SNP</b>	Sistema Nervioso Periférico	<b>TGS</b>	Tampón Tris-Glicina-SDS
<b>TBS-T</b>	Tampón salino de Tris con Tween	<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>TEER</b>	Resistencia Eléctrica Transepitelial	<b>WB</b>	Western-Blot
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilendiamina	<b>WT</b>	<i>Wild type</i>
<b>TG</b>	Tampón Tris-Glicina		

## RESUMEN GENERAL

---

La Interleuquina 6 (IL6) es una citoquina esencial en la intercomunicación entre diferentes tejidos y órganos y desempeña un importante rol en el mantenimiento de la homeostasis en el organismo. Es producida por diversos tipos celulares y puede llevar a cabo funciones muy diferentes. Su estudio en los últimos años ha cobrado gran relevancia dado su implicación en importantes procesos que tienen lugar en los diferentes tejidos, tales como transducción de señales, proliferación, diferenciación o apoptosis celular.

Numerosos estudios han demostrado un papel central de IL6 en el tejido adiposo. Participa en la modulación del metabolismo glucídico y lipídico y, además, la desregulación de su señalización está estrechamente relacionada con la disfunción del propio tejido adiposo y la aparición de algunos desórdenes como son la obesidad o la resistencia a insulina. Dado su importante función, en el presente trabajo profundizamos en las rutas moleculares implicadas en la modulación de la expresión de la citoquina en este tejido.

Por otro lado, se ha observado que la señalización celular mediada por IL6 también es importante en la renovación y diferenciación del epitelio que tapiza las vías respiratorias, así como en el desarrollo de algunas patologías relacionadas con este tejido como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En base a esto, en este trabajo analizamos el papel fisiológico que esta citoquina desempeña en el epitelio respiratorio.





# INTRODUCCIÓN



### 1. Interleuquina 6 (IL6)

Las citoquinas son pequeños péptidos señalizadores que favorecen la intercomunicación celular. Funcionan a través de proteínas receptoras de superficie mediante las cuales activan diversas rutas y cascadas de señalización que inducen cambios en la función celular (Hammerich and Tacke, 2014). Una de las principales características de estas moléculas es su pleiotropía y redundancia funcional; una misma citoquina puede desempeñar gran variedad de funciones en diversas células y tejidos y, a su vez, diferentes citoquinas pueden realizar funciones similares en determinados tipos celulares. Dicha multifuncionalidad se debe a los receptores y vías de transducción a través de los cuales señalizan (Kishimoto et al., 1995). Dentro del grupo de las citoquinas encontramos interleuquinas, factores estimulantes de colonias, interferones y diversos factores de crecimiento que ejercen sus acciones de manera autocrina, paracrina o endocrina, regulando multitud de procesos, como proliferación o diferenciación (Scheller et al., 2011; Rose-John, 2018). Las citoquinas pueden tener funciones pro y/o antiinflamatorias dependiendo del contexto, es decir, de las células que las producen, de los tejidos diana sobre los que actúan o de los receptores de membrana y cascadas de señalización activadas (Brockner et al., 2010; Thaler et al., 2010). Y, dado la multitud de procesos fisiológicos en los que participan y el elevado número de patologías en cuyo desarrollo se ven implicadas, constituyen un grupo de proteínas con un gran potencial terapéutico (Brockner et al., 2010; Hammerich and Tacke, 2014).

Las interleuquinas (IL) son un grupo de citoquinas inmunomoduladoras que regulan el crecimiento, proliferación, diferenciación, migración, adhesión y activación celular durante la respuesta inmune (Brockner et al., 2010). Muchas de ellas, además, también son producidas por tejidos y órganos que no forman parte del sistema inmune donde desempeñan múltiples funciones; algunos ejemplos de ello son la IL1 $\beta$  que actúa como un modulador neuro-inmuno-endocrino regulando la ingesta, la homeostasis energética (Wisse et al., 2004) y los ciclos de sueño-vigilia (Opp, 2005); o las IL6, IL8 e IL10 que participan en la termorregulación, ejerciendo como pirógenos o antipiréticos

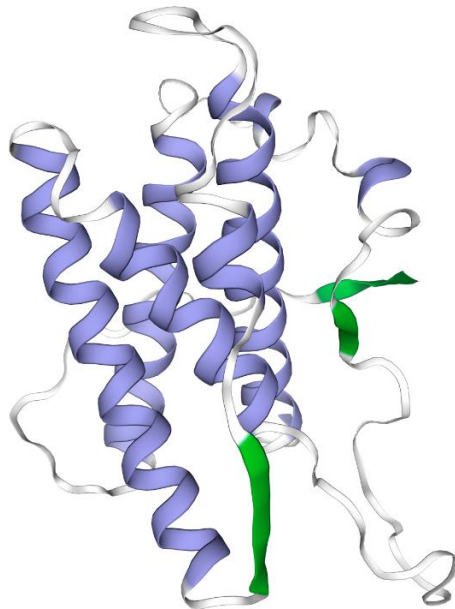
endógenos (Leon, 2002). Las interleuquinas proinflamatorias se producen en respuesta a multitud de estímulos, entre ellos la infección por patógenos o el daño tisular; su principal función en estos casos es desencadenar una respuesta inmune eficaz capaz de neutralizar al organismo invasor y eliminar las células dañadas. Por otro lado, las antiinflamatorias se encargan de proteger al organismo frente a una respuesta proinflamatoria exacerbada que pudiera causar daños sistémicos (Hammerich and Tacke, 2014). Fallos en los sistemas de señalización de estas moléculas pueden provocar en ocasiones patologías de tipo inflamatorio, así como el exceso de interleuquinas antiinflamatorias puede interferir en la respuesta inmune frente a patógenos o células cancerosas, favoreciendo su proliferación y el desarrollo tumoral (Motz and Coukos, 2013; Hammerich and Tacke, 2014).

De entre la gran cantidad de citoquinas que se conocen, IL6 ha destacado en los últimos años por el amplio abanico de funciones biológicas en las que participa. En 1985, Hirano y colaboradores, en una serie de estudios sobre el sistema inmune, identificaron un péptido que, producido por las células T, inducía la diferenciación y maduración final de células B humanas en células secretoras de inmunoglobulinas, factor al que denominaron BCDF (Factor de Diferenciación de Células B) o BSF-2 (Factor Estimulador II de células B), el equivalente humano al TRF murino (Factor que Reemplaza a las células T) identificado con anterioridad por Schimpl y Wecker (Schimpl and Wecker, 1972; Hirano et al., 1985, 1986). En esa misma época, otros grupos de investigación consiguieron clonar y estudiar factores con propiedades muy parecidas en otros dos tipos celulares, células endoteliales humanas (Astaldi et al., 1980) y fibroblastos humanos (Content et al., 1985); posteriormente, el análisis de la secuencia de nucleótidos del ADN que codificaba estos factores permitió concluir que se trataba, en todos los casos, del mismo péptido que pasó a denominarse Interleuquina 6 (IL6).

En el caso de los seres humanos, se trata de una proteína glicosilada de unos 184 aminoácidos con un peso molecular que oscila entre 21 y 28 KDa dependiendo de las modificaciones postraduccionales (de su estado de glicosilación y fosforilación) que experimente (Choy, 2004) y está codificada por un gen que se localiza en el brazo corto del cromosoma 7 (Sehgal et al., 1986). Con respecto a la IL6 murina, esta presenta una

longitud de 187 aminoácidos y un peso molecular de entre 22 y 29 KDa (Van Snick, 1990); el gen que la codifica se localiza en el cromosoma 5 (Mock et al., 1989) y, a diferencia de la IL6 humana no presenta sitios de N-glicosilación pero sí varios de O-glicosilación. La homología entre la IL6 humana y de ratón es del 65% a nivel de ADN y del 42% a nivel de proteína. Dicha homología es baja en la región N-terminal, pero la porción central está altamente conservada (Van Snick, 1990).

Junto a otras citoquinas tales como IL-11, Factor Inhibidor de la Leucemia (FIL), Oncostatina M (OSM), Factor Neurotrófico Ciliar (FNTC), Cardiotrofina-1 (CT-1), IL-33, IL-27 o Neuropoyetina (NPN) conforma la superfamilia de las citoquinas de tipo IL6 (Heinrich et al., 2003; Scheller et al., 2011). Todas ellas presentan un plegado común en 4-hélices, perteneciendo a la clase de proteínas todo en alfa (según la clasificación SCOPe). Así, presentan cuatro  $\alpha$ -hélices (A, B, C y D) dispuestas de modo que las hélices A y B se orientan en la misma dirección y C y D en la dirección opuesta (configuración *up-up-down-down*) (Somers et al., 1997; Scheller et al., 2011). Además de una estructura similar, todas estas citoquinas comparten receptores y vías de transducción de señales muy parecidas (Choy, 2004)



**Figura I.1: Representación de la estructura de la citoquina IL-6.** Las cuatro hélices principales (A, B, C y D) aparecen resaltadas en morado.

IL6 es producida no solo por multitud de células del sistema inmune como linfocitos, monocitos, macrófagos o neutrófilos, sino también por otros tipos celulares y tejidos como hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, tejido muscular o tejido adiposo, así como diferentes células tumorales que pueden generarla de forma constitutiva o bajo estimulación (Akira et al., 1990; Choy, 2004; Chalaris et al., 2011; Uciechowski and Dempke, 2020). De esta manera IL6 es secretada en respuesta a determinadas señales que pueden ser de tipo hormonal como la insulina o las catecolaminas (Vicennati et al., 2002), así como por factores bacterianos u otras citoquinas.

La Interleuquina 6 resulta esencial en la regulación del metabolismo lipídico, la actividad mitocondrial y la respuesta inmune tanto innata como adaptativa a infecciones por virus, bacterias y parásitos (Hunter and Jones, 2015). Participa, además, en importantes procesos tales como transducción de señales, proliferación, diferenciación, supervivencia celular, apoptosis, hematopoyesis, regeneración hepática y neuronal o desarrollo embrionario (Heinrich et al., 2003; Kishimoto, 2010; Uciechowski and Dempke, 2020).

La desregulación de su expresión se ha asociado a diversas patologías de tipo inflamatorias, autoinmunes como la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple, vasculares como síndrome metabólico o resistencia a insulina o cáncer (Heinrich et al., 2003; Kishimoto, 2010; Hunter and Jones, 2015; Uciechowski and Dempke, 2020). De hecho, multitud de estudios recientes han demostrado que IL6 es muy importante en la expansión y diferenciación de las células cancerígenas. Estos estudios revelan elevados niveles de IL6 en el microambiente de las células tumorales en diversos cánceres, entre ellos el cáncer de mama, relacionándose dichos niveles de IL6 con la regulación de la proliferación, metabolismo, supervivencia, angiogénesis, migración y resistencia a tratamientos terapéuticos de estas células madre tumorales (Dethlefsen et al., 2013; Kumari et al., 2016; Masjedi et al., 2018).

## 2. Rutas de señalización mediadas por IL6

### 2.1 El Receptor de IL6

Las citoquinas señalizan a través de complejos proteicos en los que participan receptores tipo  $\beta$ , que desencadenan la transducción de señales, y receptores tipo  $\alpha$ , que aumentan la especificidad de la respuesta en la célula diana y evitan la activación celular no deseada. Los receptores tipo  $\alpha$  presentan tres dominios de unión a sus ligandos específicos, son proteínas extracelulares solubles y son más pequeños que los  $\beta$ ; su función principal es presentar dichos ligandos a los receptores  $\beta$ . Estos receptores  $\beta$ , de cadena más larga, presentan de cinco a ocho dominios, algunos transmembrana, y forman homo o heterodímeros, disparando de esa manera la señalización intracelular (Garbers et al., 2012).

Todas las citoquinas de la superfamilia de la IL6 (a excepción de la IL31) utilizan el mismo transductor  $\beta$  de señales, la glicoproteína de 130KDa gp130. Mientras que IL6 e IL11 señalizan a través de la formación de homodímeros de esta glicoproteína, otros miembros de la superfamilia utilizan heterodímeros de gp130 u otro receptor  $\beta$  (LIFR, OSMR o WSX-1) (Taga and Kishimoto, 1997; Febbraio, 2007; Garbers et al., 2012). El hecho de que gp130 sea utilizado por prácticamente todos los miembros de la superfamilia de la IL6 explica, en gran medida, la redundancia funcional y pleiotropía que existe entre estas citoquinas (Kishimoto, 2010; Mihara et al., 2011).

En el caso de IL6, esta realiza sus múltiples funciones a través de la unión a su complejo-receptor constituido por una subunidad  $\alpha$  de unión al ligando de unos 80 KDa conocida como IL-6R $\alpha$  (también designada como gp80 o CD126) y la glicoproteína gp130 (también denominada gp130R $\beta$ , IL-6R $\beta$  o CD130) que, como ya he explicado con anterioridad, se encarga de la transducción de señales hacia el interior celular. La unión de IL6 a la subunidad IL6-R $\alpha$  no dispara la cascada de señalización por sí sola; para que dicha señalización se lleve a cabo se necesita de la interacción del complejo IL6-IL-6R $\alpha$  con la subunidad gp130; dicha unión da lugar a la homodimerización de esta glicoproteína, desencadenándose así la transducción de señales (Rose-John et al., 2006; Mihara et al., 2011; Scheller et al., 2011; Masjedi et al., 2018; Kang et al., 2019). Diversos

estudios han demostrado que IL6 presenta afinidad por la subunidad  $\alpha$  pero no por gp130 por sí sola y, del mismo modo, la glicoproteína IL-6R $\alpha$  tampoco presenta afinidad por gp130 si no está unida a su ligando; de manera que, sólo cuando se forma el complejo IL6- IL-6R $\alpha$  tiene lugar la unión con gp130 y se desencadena la señalización (Schmidt-Arras and Rose-John, 2016; Rose-John, 2020); por tanto, la función de la subunidad  $\alpha$  del receptor de IL6 es reclutar hacia la superficie celular a su ligando, haciendo sensibles a las células que lo expresan a dicha citoquina (Taga and Kishimoto, 1997).

La glicoproteína gp130 se encuentra presente en multitud de tipos celulares pero, a pesar de que su expresión es muy ubicua, el número de células que responden a IL6 es limitado; esto se debe a que la expresión de la subunidad IL-6R $\alpha$  se encuentra muy regulada y restringida a determinados tipos celulares como macrófagos, monocitos, células T, células B, neutrófilos y algunos tejidos no directamente relacionados con la inmunidad como son los hepatocitos (Garbers et al., 2012; Kang et al., 2019), tejido adiposo (Memoli et al., 2007), músculo esquelético (Akerstrom et al., 2009) y glándulas endocrinas como la hipófisis y la corteza adrenal (Bethin et al., 2000). El hecho de que los componentes del receptor IL-6R $\alpha$  muestren una expresión más limitada indica que la capacidad de respuesta celular depende, en gran medida, de la expresión regulada de los receptores específicos de los ligandos; además de la expresión de las propias citoquinas que también va a determinar dónde y cuándo gp130 va a llevar a cabo su función señalizadora (Hirota et al., 1996; Taga and Kishimoto, 1997).

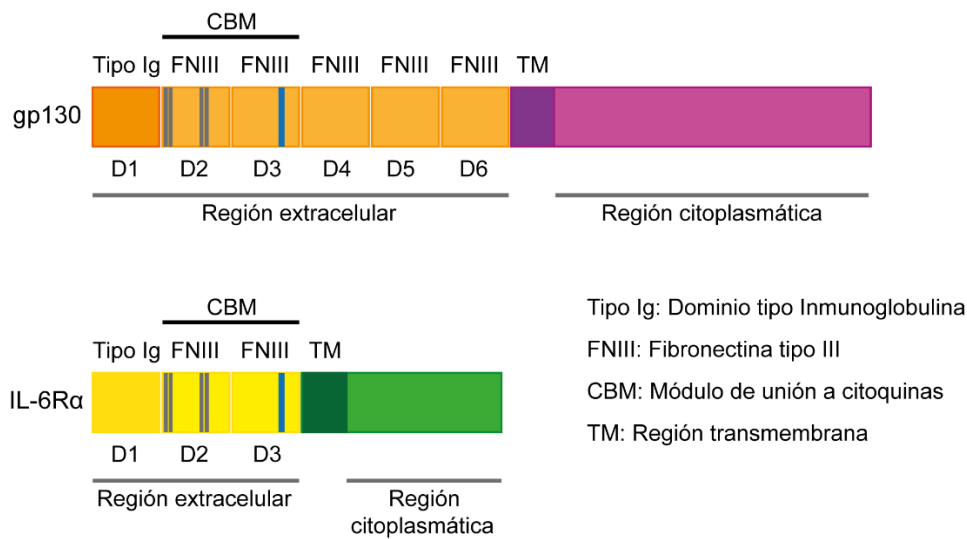
Tanto el receptor IL-6R $\alpha$  como gp130 pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquinas de clase I (Liongue and Ward, 2007). Dichos receptores presentan en su parte extracelular una región de unos 200 aminoácidos con una estructura muy conservada que resulta esencial para la interacción ligando-receptor. Esta región se conoce como Módulo de Unión a Citoquinas (CBM, del inglés *Cytokine-Binding Module*; también denominado CHD, *Cytokine Receptor Homology Domain*; o D200) y se compone de dos dominios de Fibronectina de tipo III. Este módulo se caracteriza por presentar en su extremo amino-terminal dos pares de cisteínas unidas mediante enlaces disulfuro muy conservadas y un motivo WSXWS (W, triptófano; S, serina; X, aminoácido no



conservado) en el extremo carboxilo-terminal. Dichos residuos son muy importantes para que los receptores puedan llevar a cabo sus funciones, ya que mutaciones en ellos suprimen su capacidad de unión al ligando. Cada dominio de Fibronectina de tipo III presenta, aproximadamente, cien aminoácidos y se estructura en siete cadenas  $\beta$  colocadas en posición antiparalela en forma de barril abierto; de manera que, el hueco que queda entre dos barriles  $\beta$  (uno por cada dominio de Fibronectina) funciona como un bolsillo de unión del ligando. En el caso de gp130, su región extracelular comprende otros tres dominios adicionales entre el Módulo de Unión a Citoquinas y su región transmembrana (Taga and Kishimoto, 1997; Heinrich et al., 2003; Liongue and Ward, 2007; Kang et al., 2020). Diversos estudios indican que dichos dominios se encargan de acoplar la unión ligando-receptor y la transducción de señales, posibilitando que las regiones citoplasmáticas del homodímero de gp130 estén lo suficientemente próximas como para que se desencadene la cascada de señalización (Timmermann et al., 2002; Heinrich et al., 2003). De hecho, el uso de mutantes carentes de estos dominios demostró una reducida o nula transducción de señales hacia sus regiones intracitosólicas (Scheller et al., 2011). Además de sus módulos de unión a citoquinas, en el extremo amino terminal de su región extracelular, estos receptores presentan un dominio de tipo Inmunoglobulina implicado en la escisión de dichos receptores de la membrana plasmática celular y en su transporte intracelular a través de la vía secretora (Vollmer et al., 1999).

Por otro lado, aunque la región citoplasmática del receptor IL-6R $\alpha$  no es indispensable para la formación del complejo-receptor ni para la transducción de señales, está implicada en la orientación de dicho receptor hacia la membrana basolateral en las células polarizadas (Martens et al., 2000). En el caso de la glicoproteína gp130, su parte citoplasmática es considerablemente más larga, reflejo de su participación funcional en la transducción de señales (Heinrich et al., 1998). Además, resulta crucial para la endocitosis mediada por ligando del complejo IL6-Receptor (Dittrich et al., 1994, 1996), para la regulación de la expresión de este receptor en la superficie celular, (Dittrich et al., 1996), así como para la correcta orientación del

receptor en la membrana basolateral de las células polarizadas (Doumanov et al., 2006) (Figura I.2).



**Figura I.2: Representación esquemática de los receptores implicados en la señalización de IL6 (gp130 y IL-6R $\alpha$ ).** Estos receptores presentan en su parte extracelular una región de unos 200 aminoácidos esencial para la interacción ligando-receptor, conocida como Módulo de Unión a Citoquinas (CBM), formada por dos dominios de Fibronectina de tipo III. Gp130, presenta además tres dominios adicionales, entre el Módulo de Unión a Citoquinas y su región transmembrana. Además, en el extremo amino terminal de sus regiones extracelulares, estos receptores presentan un dominio de tipo Inmunoglobulina. Esquema adaptado de (Heinrich et al., 2003).

## 2.2 Interacción entre IL6 y su receptor

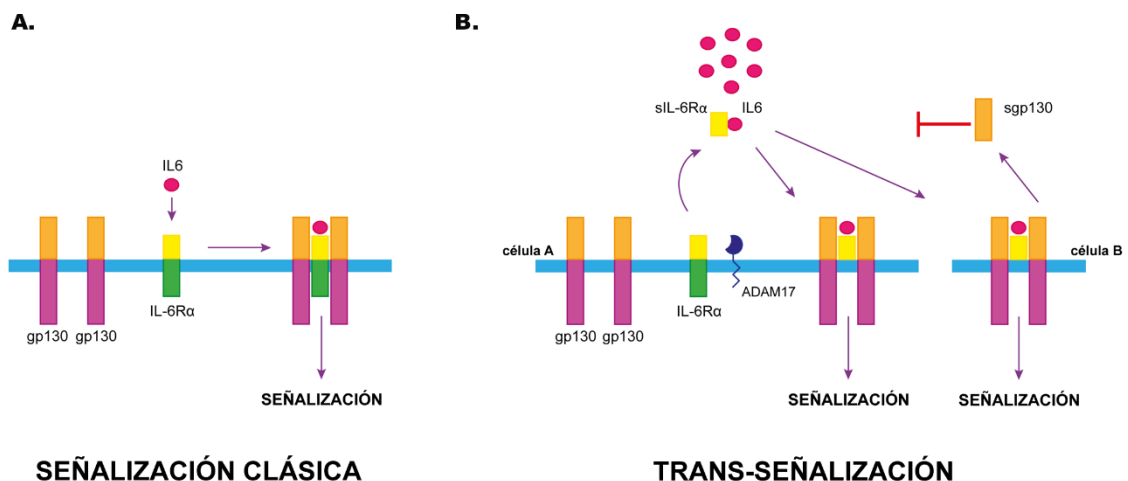
La interacción de la Interleuquina 6 con su receptor está mediada por uniones de tipo iónico e hidrofóbico (Somers et al., 1997). Esta citoquina presenta tres dominios o sitios de interacción, los sitios II y III son de unión al receptor  $\beta$  mientras que el sitio I es de interacción con el receptor IL-6R $\alpha$ . Este receptor  $\alpha$ , a su vez, interacciona con la citoquina a través de sus dominios II y III que, como ya he explicado con anterioridad, conforman el CBM (Heinrich et al., 1998). La estructura del sitio II de IL6 nos proporciona información acerca de por qué necesita unirse a IL6R $\alpha$  para interaccionar con gp130, y es que realmente este sitio II de unión al receptor  $\beta$  lo proporciona el complejo binario formado por la citoquina y el receptor  $\alpha$ ; de manera que, la interacción del complejo IL6-Receptor  $\alpha$  con gp130 se separa en dos zonas espacialmente distintas: el sitio IIa resulta necesario para el reclutamiento de la glicoproteína gp130, con la que

interacciona a través de su Módulo de Unión a Citoquinas. El sitio IIb lo proporciona realmente el receptor IL6R $\alpha$  y la interacción tiene lugar entre el dominio III de este receptor y el dominio III de la proteína gp130. Este sitio afianza la unión del complejo, actúa como un refuerzo molecular favoreciendo la interacción de IL6 con el Módulo de Unión a Citoquinas de gp130 (Boulanger et al., 2003). Por último, el sitio III constituye otro sitio de unión a gp130, pero en este caso la interacción tiene lugar con su dominio de tipo Inmunoglobulina (Müller-Newen, 2003; Scheller et al., 2011). El análisis estructural del complejo IL6-IL6R $\alpha$ -gp130 mostró un modelo hexamérico (Müller-Newen, 2003). Se trataría de una estructura hexamérica muy conservada entre los complejos de señalización de las citoquinas gp130, compuesta por dos moléculas de IL6, dos del receptor IL6R $\alpha$  y otras dos de gp130 que se ensamblarían de forma secuencial y cooperativa (Boulanger et al., 2003). Además de este, también se ha descrito otro modelo de activación alternativo basado en una estructura tetramérica. Este complejo receptor estaría constituido por una molécula de IL6, una del receptor IL6R $\alpha$  y dos de gp130. Diversos estudios con formas mutantes de gp130 han mostrado que sólo uno de los dos sitios de unión a IL6 en el homodímero de gp130 sería suficiente para desencadenar la transducción de señales. Además, los resultados de estos estudios parecen indicar que bajas concentraciones de IL6 favorecerían la formación de complejos tetraméricos, mientras que concentraciones más altas de esta citoquina conducirían a la formación de complejos hexaméricos (Grötzinger et al., 1999; Scheller et al., 2011).

### **2.3 Señalización clásica y trans-señalización**

El descubrimiento de formas solubles de los receptores de las citoquinas ha supuesto una auténtica revolución en la investigación de estas moléculas. Numerosos estudios han demostrado su importante papel como reguladores de los efectos inflamatorios de estas al actuar como agonistas o antagonistas de su señalización. Algunos ejemplos de estos receptores solubles son los de la IL1 $\alpha$  o del TNF $\alpha$  que antagonizan la actividad biológica de sus ligandos o la forma soluble del receptor  $\alpha$  de IL6 que amplifica la señalización de esta citoquina al activar células que no expresan la forma transmembrana de dicho receptor en su superficie (Scheller et al., 2011).

De esta manera, además de la señalización clásica en la que sólo las células que expresan en su membrana al receptor IL-6R $\alpha$  pueden responder a IL6 (figura I.3A), se ha descrito otra vía de señalización alternativa para esta citoquina, la trans-señalización, que implica a la forma soluble del receptor  $\alpha$ , sIL-6R $\alpha$ . Dado que, ni la región citoplasmática ni la parte transmembrana de este receptor son imprescindibles para la señalización de IL6, IL-6R $\alpha$  puede escindirse de la membrana plasmática de las células, proteolíticamente, generando una forma soluble, sIL-6R $\alpha$ , capaz de unirse a su ligando y desencadenar la transducción de señales por unión del complejo IL6/sIL-6R $\alpha$  a la glicoproteína gp130 (figura I.3B). Por tanto, la generación de esta forma soluble permite la estimulación de tipos celulares, como por ejemplo las células madre hematopoyéticas, las células T, las células endoteliales o los queratinocitos, que sí expresan gp130 en su superficie pero no la subunidad  $\alpha$  (Chalaris et al., 2011; Schaper and Rose-John, 2015). La principal proteasa responsable de esta escisión es la metaloproteasa de membrana ADAM17 (TACE), que también está implicada en la escisión del receptor de TNF $\alpha$  o de los ligandos del EGF-R (Schumacher and Rose-John, 2019). Alternativamente, se ha descrito otro mecanismo que permite producir este receptor soluble de IL6 y se trata de la transcripción de un ARNm alternativo de IL6R $\alpha$ ; sin embargo, este mecanismo sólo ha sido descrito en humanos y no se ha identificado en ratón (Scheller et al., 2011).



**Figura I.3: Señalización clásica vs trans-señalización.** (A) Señalización clásica: el complejo de señalización está formado por una o dos moléculas de IL6 que se unen a una o dos moléculas de IL-6R $\alpha$  presentes en la membrana de las células diana, promoviendo el reclutamiento de dos moléculas de gp130 y desencadenándose la señalización hacia el interior celular. (B) Tran-señalización a través de la unión de IL6 a la forma soluble del receptor  $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ). Las células que sólo expresan gp130 en su membrana pueden ser activadas por el complejo IL6/sIL-6R. sIL-6R es generado por la actividad proteolítica de ADAM 17 en células que sí expresan en su membrana al receptor IL-6R $\alpha$  o por la transcripción de un ARNm alternativo. El complejo IL6/sIL-6R se une posteriormente a gp130, induciendo la señalización de IL6. Por transcripción de un ARNm alternativo, se puede generar una forma soluble de gp130, sgp130, el cual puede interactuar con el complejo formado por IL6 y sIL-6R evitando su unión a gp130 y, por tanto, inhibiendo la trans-señalización. Esquema adaptado de (Scheller et al., 2011).

Diversos estudios han demostrado que mientras que la señalización clásica, a través de los receptores de membrana, participa en las actividades regenerativas o antiinflamatorias de esta citoquina, la trans-señalización es responsable de los efectos proinflamatorios de la IL6. Un ejemplo de ello se observa en la estimulación de células endoteliales por trans-señalización tras producirse un daño tisular. Esta señalización resulta crucial para el reclutamiento de linfocitos y monocitos hacia las áreas dañadas; de manera que, la activación de estas células endoteliales carentes de IL-6R $\alpha$  en su superficie, por formas solubles del mismo procedentes de la escisión de dicho receptor de la membrana de neutrófilos adyacentes, conduce a la secreción de diversas quimiocinas que atraen a las células mononucleares hasta la zona, desencadenándose una respuesta inflamatoria (Chalaris et al., 2011; Scheller et al., 2011; Rose-John, 2012). Por otro lado, se ha observado también que esta señalización a través de sIL-6R $\alpha$  está implicada en diversas patologías de carácter inflamatorio como la enfermedad de Crohn o la artritis reumatoide, así como en la evolución y prevalencia de algunos tipos de cáncer como el de colon o el de ovarios (Scheller et al., 2011).

De esta forma, dado los procesos inflamatorios en los que está implicada esta vía alternativa de señalización de la IL6 y su papel en determinados tipos de cáncer, numerosos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en encontrar tratamientos y herramientas capaces de inhibirla específicamente, sin afectar a la señalización clásica, como estrategia terapéutica para el tratamiento de determinadas enfermedades (Kopf et al., 2010). Un mecanismo natural de regulación de la trans-señalización es el que tiene lugar a través de la forma soluble de la proteína transductora de señales, sgp130. Esta forma soluble del receptor  $\beta$  se produce principalmente por un

procesamiento alternativo de su ARNm y es capaz de unirse al complejo formado por la IL6 y la forma soluble del receptor  $\alpha$  (IL6- sIL-6R $\alpha$ ) bloqueando sus efectos biológicos; es decir, sgp130 actúa como un inhibidor específico de la trans-señalización al impedir la unión de dicho complejo a la forma transmembrana de gp130 sin comprometer la señalización clásica (Narazaki et al., 1993; Jostock et al., 2001; Richards et al., 2006; Rose-John, 2012). Además de sgp130, otra forma soluble alternativa de gp130 denominada gp130-RAPS se ha encontrado en orina humana, plasma y líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide; se trata de una isoforma constituida únicamente por el dominio de tipo inmunoglobulina y el módulo de unión a citoquinas que, al igual que sgp130, puede unirse al complejo IL6- sIL-6R $\alpha$ , antagonizando sus efectos (Richards et al., 2006; Rose-John, 2012).

#### **2.4 Rutas de señalización mediadas por IL6**

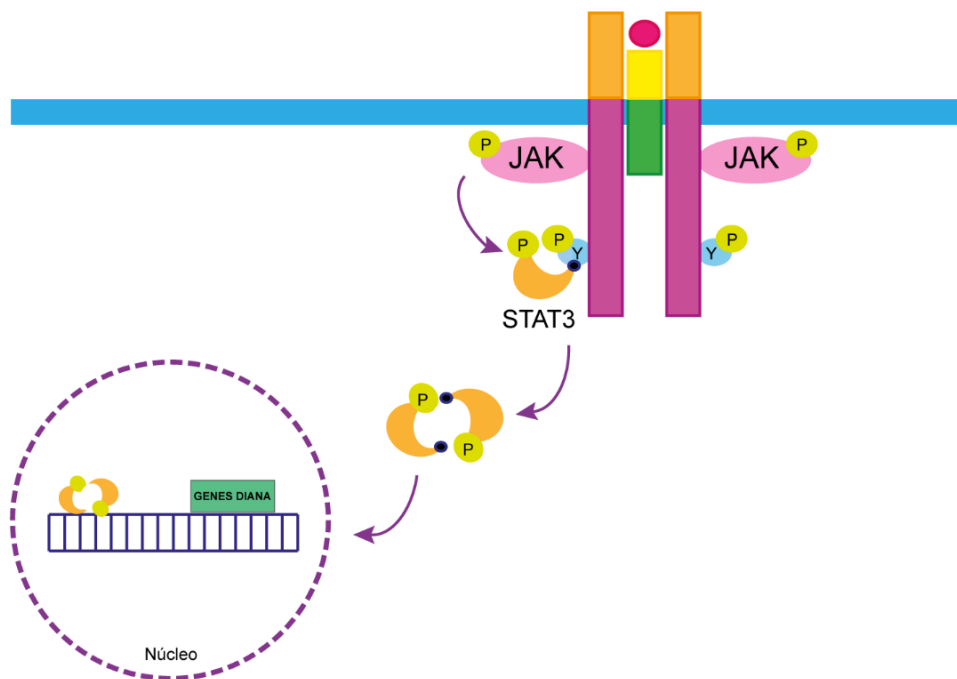
La unión de IL6 a su receptor induce la dimerización de gp130, como ya se ha comentado con anterioridad, y esta dimerización desencadena la activación de tirosinas quinasas de la familia JAK: JAK1, JAK2 y Tyk2, que van a actuar como mediadores en la transducción de señales (Heinrich et al., 2003).

Estas proteínas JAK se expresan en multitud de tejidos y aparecen unidas constitutivamente a la región citoplasmática del receptor gp130. Junto a él forman complejos que conducen hacia el interior celular cascadas de señalización procedentes de la unión extracelular de las citoquinas a sus receptores en las células diana, lo que conlleva, finalmente, a que se produzcan cambios en los patrones de expresión de determinados genes (Haan et al., 2006).

La activación de las proteínas JAK por trans-fosforilación, desencadena la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático de gp130 (Eulenfeld et al., 2012) y estos residuos fosforilados constituyen sitios de unión para otras moléculas de señalización como los factores de transcripción STAT, la tirosina fosfatasa SHP-2 que puede desencadenar la activación de MAPKs, o la fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3K) (Heinrich et al., 2003).

### 2.4.1 IL6/JAK/STAT

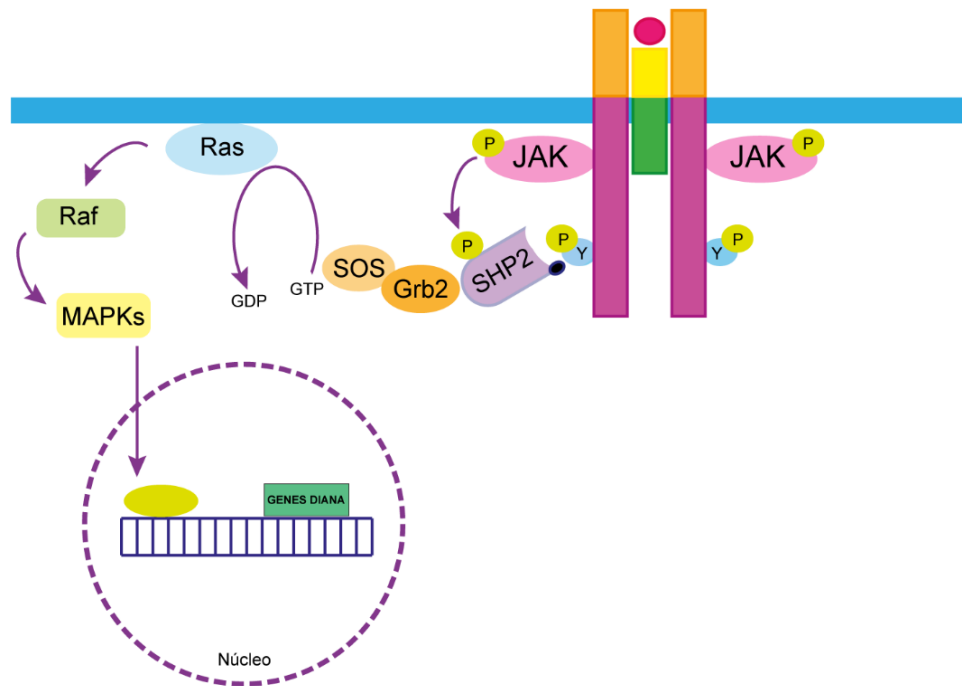
La familia de las proteínas STAT se compone de siete miembros STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6, de los cuales STAT3 y, en menor medida STAT1, son activados por IL6 (Heinrich et al., 1998). Estas proteínas se unen a través de su dominio SH2 a motivos fosfotirosina de la región citoplasmática del receptor gp130, una vez reclutadas son fosforiladas por las proteínas JAK en un residuo de tirosina en su extremo C-terminal, lo que desencadena el reclutamiento de otras moléculas STAT fosforiladas con las que forman homo o heterodímeros (Heinrich et al., 1998; Abroun et al., 2015). Tras esto, se translocan al núcleo, donde se van a unir a través de su dominio de unión a ADN a secuencias específicas de los promotores de sus genes diana, estimulando o reprimiendo su expresión (Heinrich et al., 1998, 2003; Meyer and Vinkemeier, 2007; Abroun et al., 2015) (Figura I.4).



**Figura I.4: Vía de señalización IL6/JAK/STAT.** Las moléculas de gp130, tras su unión al complejo IL6/IL-6R $\alpha$ , son fosforiladas en residuos de tirosina en su región citoplasmática por proteínas JAK. Estos residuos fosforilados constituyen sitios de anclaje para proteínas STAT (STAT1 y STAT3) que, a su vez, son fosforiladas, desencadenándose el reclutamiento de otras moléculas STAT fosforiladas con las que forman homo o heterodímeros. Tras esto, se translocan al núcleo donde regulan la expresión de multitud de genes. Esquema adaptado de (Heinrich et al., 1998).

### 2.4.2 IL6/JAK/SHP-2/MAPKs

La dimerización del receptor gp130 de IL6, no solo conduce a la activación de la vía de señalización JAK/STAT, sino también a la inducción de la cascada de las MAPKs. Tras la fosforilación en la tirosina<sup>759</sup> de la región citoplasmática de gp130, la proteína SHP-2 es reclutada, interaccionando con el receptor a través de su dominio SH2. Una vez unida a gp130, es fosforilada por las proteínas JAK y esto conduce al reclutamiento de Grb2. Dicha proteína se encuentra unida constitutivamente a SOS, un intercambiador GDT/GTP para Ras, cuya forma GTP permite la activación de la cascada de señalización RAF/MAPKs, que promueve la expresión de genes implicados en supervivencia (Heinrich et al., 2003; Mihara et al., 2011) (Figura I.5).

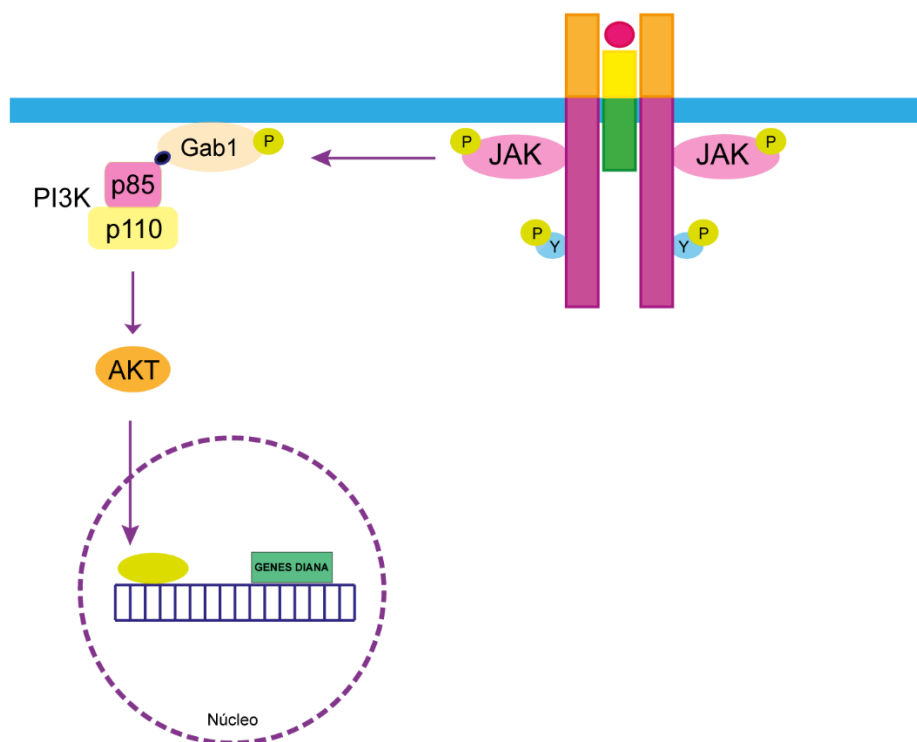


**Figura I.5: Vía de señalización IL6/JAK/SHP-2/MAPKs.** Tras la fosforilación de gp130 en residuos de tirosina de su región citoplasmática por proteínas JAK, SHP-2 se une al receptor a través de su dominio SH2 y se fosforila. Tras lo cual, Grb2 unida a SOS es reclutada hacia la membrana plasmática, desencadenándose la cascada de señalización RAF/MAPKs, a través de Ras. Esquema adaptado de (Heinrich et al., 2003).



### 2.4.3 IL6/JAK/PI3K/AKT

Otra vía de señalización que puede ser activada por la interacción IL6-gp130 es la ruta PI3K/AKT. Una vez IL6 se ha unido a su receptor, las proteínas JAKs fosforiladas reclutan a Gab1 fosforilándola en residuos de tirosina. Gab1 fosforilada, a su vez, se une al dominio SH2 de la subunidad reguladora p85 de PI3K, lo que conduce a la activación de AKT por parte de PDK1, translocando al núcleo donde promueve la expresión de genes relacionados con supervivencia y control del ciclo celular (Takahashi-Tezuka et al., 1998; Heinrich et al., 2003) (Figura I.6).



**Figura I.6: Vía de señalización IL6/JAK/PI3K/AKT.** La unión de IL6 a su receptor desencadena la fosforilación de proteínas JAK que reclutan y fosforilan, a su vez, a Gab1. Dicha proteína, una vez fosforilada, se une a la subunidad reguladora p85 de PI3K, desencadenándose la activación y translocación al núcleo de AKT, donde regula la expresión de diversos genes (Heinrich et al., 2003).

Además, reflejo de la enorme complejidad que rodea a la señalización por citoquinas, cabe destacar que Gab1 también está involucrado en la activación de la cascada RAS-RAF-MAPKs a través de su interacción con SHP2/Grb2/SOS (Takahashi-Tezuka et al., 1998; Eulenfeld et al., 2012). Y, a su vez, indirectamente, la ruta JAK/STAT

también puede promover la activación de RAS y, por tanto, la vía de las MAPKs, a través de SOCS (Heinrich et al., 2003).

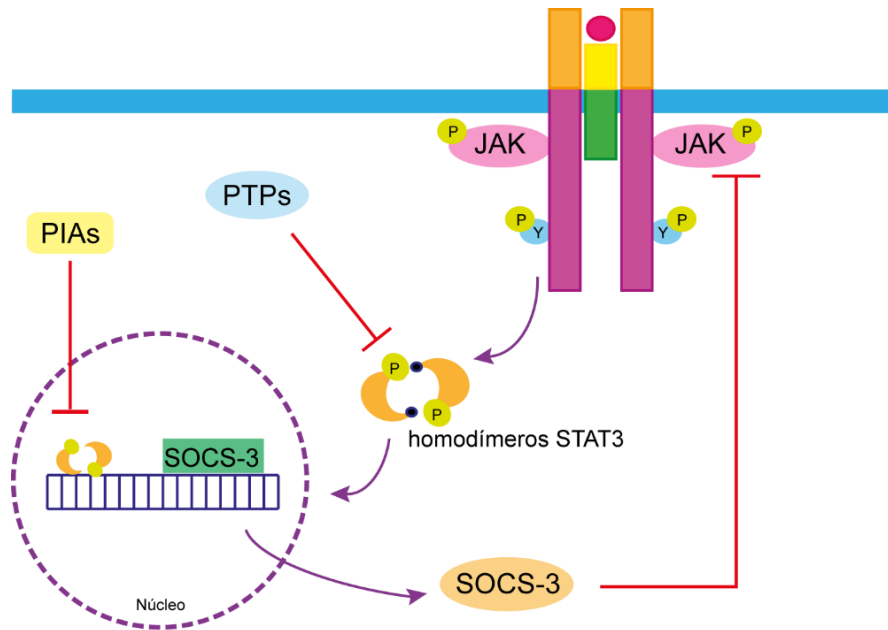
#### **2.4.4 Regulación de la señalización mediada por IL6**

Los sistemas implicados en la señalización de IL6 deben regularse estrictamente para que la duración y la magnitud de la transducción de señales sea la correcta. Son tres grupos de proteínas principalmente las que están involucradas en el control de la señalización de IL6, los supresores de la señalización de las citoquinas (SOCS), las proteínas inhibidoras de las STATs activadas (PIAS) y las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) (Heinrich et al., 2003).

Las proteínas SOCS regulan negativamente la señalización JAK/STAT mediante su unión a JAK y a los receptores de membrana de las citoquinas. En el caso de IL6, su unión a su receptor gp130 permite la activación de la proteína STAT3 que induce la transcripción de SOCS-3 (proteína supresora de la señalización por citoquinas 3). Esta proteína SOCS-3 interacciona, a su vez, con JAK y con el receptor gp130, inhibiendo la transducción de señales (Heinrich et al., 2003; Kishimoto, 2006) (Figura 1.7).

El segundo grupo de reguladores negativos de la señalización JAK/STAT son las proteínas PIAS. Estas proteínas inhiben la actividad de los factores de transcripción STAT. En la señalización de IL6, PIAS-3 se asocia con STAT3 una vez está activado, bloqueando su función transcripcional (Heinrich et al., 2003; Kishimoto, 2006) (Figura 1.7).

Por último, el tercer grupo de proteínas reguladoras lo constituyen las proteínas tirosina fosfatasa. Dichas proteínas inhiben la fosforilación de las proteínas diana de JAK, interrumpiendo, de esta forma, la cascada de señalización. Las PTPs implicadas en la regulación de la señalización de IL6, SHP-1 y SHP-2, desfosforilan a STAT3, inhibiendo su actividad como factor de transcripción (Heinrich et al., 2003) (Figura 1.7).



**Figura 1.7: Mecanismos de regulación de la señalización mediada por IL6/STAT.** STAT3 activa la expresión del gen SOCS-3 que puede inhibir la señalización de STAT3 de dos maneras. Una es uniéndose al receptor gp130, bloqueando el reclutamiento de transductores de la señalización y la segunda es uniéndose a las proteínas JAKs asociadas a gp130, inhibiendo su actividad quinasa. PIAS3 es el segundo regulador negativo de la ruta IL6/JAK/STAT. Su mecanismo de acción consiste en unirse a STAT3 e inhibir su actividad transcripcional. La tercera clase de reguladores negativos de la ruta de señalización IL6/JAK/STAT son las PTPs. Las PTPs (SHP-1 y SHP-2) disminuyen la activación de STAT3 por desfosforilación directa de los dímeros STAT3, inhibiendo su actividad transcripcional. Esquema adaptado de (Heinrich et al., 1998).

### 3. Regulación de la expresión de IL6

La expresión del gen de IL6 está regulada por modificaciones epigenéticas en su cromatina (modificación de histonas y metilación del ADN), así como por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales en los que intervienen diversas proteínas y micro-ARNs (miARNs).

#### 3.1 Mecanismos transcripcionales de regulación de la expresión de IL6

Múltiples elementos reguladores en cis de la región 5' del gen de IL6 se han identificado como sitios de unión para diferentes factores de transcripción. Algunos de esos factores de transcripción se unen al ADN favoreciendo su transcripción, es el caso del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), el factor nuclear IL6 (NF-IL6), la proteína activadora 1 (AP-1), la proteína de especificidad 1 (SP-1) o el factor regulador de interferón 1 (IRF1) (Akira

and Kishimoto, 1992). Y otros como el receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PPRA $\alpha$ ), el receptor de estrógenos, el receptor de glucocorticoides, p53 o el receptor de hidrocarburos de arilo (Ahr) la inhiben (Delerive et al., 1999). Además, algunos miARNs también pueden, directa o indirectamente suprimir la acción de estos factores de transcripción, regulando la síntesis del ARNm (Tanaka et al., 2013).

### 3.2 Mecanismos postranscripcionales de regulación de la expresión de IL6

La regulación postranscripcional de la expresión de IL6 tiene lugar a través de la unión de diversos factores a la región 3' UTR de su ARNm, lo que conduce a su estabilización o a su degradación. Los principales factores involucrados en esta regulación postranscripcional son miARNs y proteínas de unión a ARN (RBPs; *RNA Binding Proteins*) (Tanaka et al., 2016; Kang et al., 2020).

Los miARNs pueden unirse a la región 3' UTR tanto del ARNm de IL6 directamente, como a elementos *upstream* activadores de la expresión de la citoquina, inhibiendo de esta manera su expresión (Kang et al., 2020). Algunos ejemplos son el miARN-26 que se une a la región 3' UTR tanto del ARNm de IL6 como de su activador NF- $\kappa$ B; o el miARN-365 que se une al 3' UTR del ARNm de IL6 (Song et al., 2015; Chen et al., 2016).

Las proteínas de unión a ARN contienen dominios de unión a ácidos nucleicos del tipo dedos de zinc y modulan la estabilidad del ARNm a través de diversos mecanismos. Dichas proteínas reconocen elementos reguladores en cis, tales como elementos ricos en Adenina y Uracilo (elementos ARE) y estructuras en *loop* en las regiones 3' UTR de los ARNm y forman complejos ribonucleoproteicos de silenciamiento que favorecen la degradación del ARN (Kang et al., 2020). En el caso de IL6, RBPs tales como Roquin-1 o Regnasa-1 se unen a sus secuencias diana en el ARNm y, una vez ancladas, reclutan al complejo de deadenilación CCR4-NOT que se encarga del acortamiento de la cola de poli(A) en la región 3' UTR; a continuación, se hidroliza la 7-metil-guanosina de la caperuza 5' en la región 5' UTR (*decapping*) y se desencadena la digestión y degradación final del ARNm (Anderson, 2010; Mino and Takeuchi, 2018; Kang et al., 2020).

La degradación mediada tanto por miARNs como por RBPs del ARNm de IL6 tiene lugar en los gránulos de estrés o cuerpos de procesamiento, a los que se reclutan los diferentes componentes que van a llevar a cabo la descomposición del ARNm (Anderson and Kedersha, 2008).

Los mecanismos de control de la expresión de IL6, al igual que ocurría con los mecanismos implicados en la modulación de su señalización, resultan fundamentales puesto que la desregulación de los niveles de su ARNm conduce a aberraciones en su señalización que pueden tener como consecuencia el desarrollo de diversas enfermedades o una inadecuada activación de las respuestas inmunes.

#### **4. Función fisiológica de la IL6**

Como ya se ha mencionado anteriormente, IL6 es una citoquina que participa en multitud de procesos dado la complejidad de sus circuitos de señalización. Desempeña importantes labores en la regulación del metabolismo, inflamación, regeneración y procesos neuronales (Scheller et al., 2011); y no solo cabe destacar su papel fisiológico en el organismo, sino también su implicación en la patofisiología de multitud de enfermedades, especialmente aquellas relacionadas con la inflamación, la respuesta inmune o el metabolismo.

##### **4.1 IL6 en el Sistema Inmunitario**

Y, es precisamente su rol como modulador en el sistema inmune una de las primeras y principales funciones que se le atribuyeron. IL6 induce la maduración de células B en células secretoras de anticuerpos y, además, controla la supervivencia y expansión de esta población celular (Hunter and Jones, 2015). Experimentos llevados a cabo con ratones IL6<sup>-/-</sup> que fueron inmunizados mostraron una menor producción de inmunoglobulinas G y mayor susceptibilidad a la infección que ratones no deficientes en IL6 (Kopf et al., 1994).

La inflamación aguda es un mecanismo de defensa frente a daño tisular o la invasión por patógenos. Una vez la situación de peligro que ocasionó la respuesta

inmune es neutralizada, esta inflamación debe resolverse para garantizar el correcto funcionamiento de todo el sistema; cuando esto no ocurre y el proceso inflamatorio se vuelve crónico se produce daño en los tejidos, lo que contribuye a la aparición de enfermedades inflamatorias (Jones, 2005). Una de las principales moléculas implicada en dichas respuestas inflamatorias es la IL6, resultando clave en la transición entre la respuesta innata inicial y la adaptativa. Durante la inflamación aguda IL6 es secretada fundamentalmente por monocitos y macrófagos y participa en el reemplazo de los neutrófilos infiltrados por monocitos y células T. Induce, por un lado, la apoptosis de los neutrófilos, evitando así un mayor daño tisular por la acumulación de proteasas y especies reactivas del oxígeno liberadas por estos, y por otro lado, modula la expresión de moléculas quimioatrayentes de monocitos y células T para su reclutamiento (Scheller et al., 2011). En situaciones de inflamación crónica, son las células T las que la producen y actúa como un factor proinflamatorio, correlacionando sus niveles con la severidad del proceso inflamatorio (Jones, 2005).

IL6 también regula la diferenciación de células T nativas en células T reguladoras y T activadoras o T *helper* (Scheller et al., 2011). Induce la diferenciación de células T *helper* 2 (Th2), especializadas en la protección frente a patógenos extracelulares y bloquea la diferenciación de las células T nativas en células T reguladoras, promoviendo el desarrollo de células T *helper* 17 (Th17), implicadas en la aparición de inflamación crónica y enfermedades autoinmunes (Bettelli et al., 2006).

#### **4.2 IL6 en el Hígado**

Además de las funciones que ejerce en el sistema inmunitario, IL6 también destaca en la función hepática. Participa en la regeneración del órgano, promoviendo la reentrada de los hepatocitos en ciclo celular; de hecho, estudios llevados a cabo con ratones a los que se les había practicado una hepatectomía parcial, mostraron un aumento significativo de los niveles de IL6 en la vena porta hepática de dichos ratones, solo 2 horas después de la extirpación (Schmidt-Arras and Rose-John, 2016).

La respuesta de fase aguda se desencadena como consecuencia de un daño tisular, una infección por patógenos o inflamación en el organismo. Uno de los procesos más importantes que se induce durante esta respuesta es la síntesis hepática de proteínas de fase aguda, cuyo objetivo es la restauración de la homeostasis (Tanaka et al., 2014, 2018). Se trata de un conjunto de proteínas plasmáticas que cumplen distintas funciones como formar parte del sistema del complemento, de la cascada de coagulación o participar en la respuesta inflamatoria y, entre ellas, encontramos la proteína C reactiva o el fibrinógeno. Los mediadores más importantes de esta respuesta de fase aguda son las citoquinas y, entre ellas, la IL6 destaca como el principal inductor. IL6 es liberada por diferentes tipos celulares en la zona dañada (neutrófilos, monocitos, macrófagos, células endoteliales y fibroblastos), y viaja a través del torrente sanguíneo al hígado donde promueve la producción de estas proteínas de fase aguda por los hepatocitos (Tanaka et al., 2014; Schmidt-Arras and Rose-John, 2016).

También desempeña un importante rol en el control del metabolismo de la glucosa hepática, ya que regula negativamente la expresión de la enzima glucosa-6-fosfatasa, promoviendo la degradación de glucógeno (Schmidt-Arras and Rose-John, 2016).

#### **4.3 IL6 en el Sistema Nervioso**

IL6 también realiza importantes funciones en el Sistema Nervioso (SN), tanto a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP). Neuronas, células gliales y oligodendrocitos la expresan junto a su receptor IL6-R $\alpha$  y numerosos estímulos como otras citoquinas o neurotransmisores pueden inducir su expresión (Erta et al., 2012).

Uno de los principales procesos en los que IL6 participa es la neurogénesis, regulando la renovación de las células neuroepiteliales y células gliales, precursores de todas las neuronas y la microglía (astrocitos y oligodendrocitos) (Deverman and Patterson, 2009; Erta et al., 2012). Se trata de un proceso muy influenciado por factores como el estrés, el envejecimiento o la neuroinflamación, de hecho, se encuentra alterado en patologías como el Alzheimer, el Parkinson o la enfermedad de Huntington,

en las cuales la inflamación juega un importante papel y la expresión de IL6 se encuentra muy elevada (Ekdahl et al., 2003; Whitney et al., 2009; Erta et al., 2012).

Sin embargo existen estudios contradictorios sobre el rol de IL6 en este proceso, ya que por un lado, se ha observado que *in vitro* los niveles de IL6 correlacionan negativamente con la diferenciación de las células madre neuronales hacia neuronas, contribuyendo a la disfunción de estas células (Monje et al., 2003); y por otro lado, numerosos grupos han demostrado el efecto potenciador de IL6 tanto en la gliogénesis, a través de la señalización STAT3, como en la neurogénesis, a través de la vía de las MAPKs/CREB (Oh et al., 2010; Erta et al., 2012). De este modo, por ejemplo, se ha visto que estimula la diferenciación de células de Schwann (Zhang et al., 2007), y, además, puede influir en las características funcionales de algunos tipos de neuronas como es el caso de las neuronas simpáticas y su fenotipo colinérgico (Oh and O'Malley, 1994; März et al., 1998; Erta et al., 2012). A la luz de estos resultados podría ocurrir que el efecto de IL6 sobre la neurogénesis dependa en gran medida de su concentración, tiempo de exposición, moléculas implicadas en su señalización, estado de desarrollo o presencia de otros factores neurotróficos (Erta et al., 2012).

IL6 contribuye también, en gran medida, a la aparición de neuroinflamación; participa en la activación de las células del sistema inmune (astrocitos y microglía) que residen en el sistema nervioso e incrementa la producción de mediadores inflamatorios tales como, proteínas de fase aguda, citoquinas proinflamatorias o prostaglandinas, contribuyendo así a la inflamación del tejido (Bolin et al., 2005; Quintana et al., 2008; Spooren et al., 2011).Cuál es la labor que esta citoquina tiene en el desarrollo de diversas patologías del SN es algo en lo que se trabaja activamente en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, sin embargo, no resulta fácil ya que, aunque diversos estudios muestran que IL6 influye activamente en el desarrollo de determinadas enfermedades, como son el Alzheimer (Hüll et al., 1996) o la Esclerosis Múltiple (Maimone et al., 1997; Malmeström et al., 2006), experimentos con modelos animales han demostrado su efecto neuroprotector en otras patologías como el Parkinson (Bolin et al., 2002) o la enfermedad de Huntington (Bolin et al., 2002).



Además, aunque IL6 se haya relacionado tradicionalmente con inflamación y patogénesis del SN, también es fundamental en el mantenimiento de su homeostasis participando en procesos como la regulación del gasto energético y la ingesta (Wernstedt et al., 2006), inducción de la fiebre (Chai et al., 1996), dolor (Murphy et al., 1999), ciclos sueño-vigilia (Morrow and Opp, 2005), aprendizaje y memoria (Heyser et al., 1997; Balschun et al., 2004; Baier et al., 2009; Yirmiya and Goshen, 2011), o regeneración (Heyser et al., 1997; Fisher et al., 2001) entre otros muchos.

#### **4.4 IL6 en el Músculo Esquelético**

El músculo esquelético es otro órgano capaz de secretar citoquinas y otros péptidos que van a ejercer su acción en el propio músculo y en otros órganos como el tejido adiposo, el hígado o el páncreas. De entre las mioquinas que secreta, IL6 destaca por su implicación en procesos relacionados con la obtención de energía (Pedersen and Febbraio, 2012). Durante el ejercicio físico, IL6 se secreta al torrente sanguíneo en respuesta a la contracción muscular y sus niveles aumentan de manera proporcional a la duración e intensidad del ejercicio y la masa muscular que lo realiza (Keller et al., 2005; Fischer, 2006; Pedersen and Febbraio, 2012). Además podría actuar como un sensor energético en este órgano, ya que su expresión se eleva cuando las reservas de glucógeno intramuscular disminuyen (Steensberg et al., 2001; Febbraio et al., 2003; Keller et al., 2005).

La IL6 liberada por el músculo esquelético durante el ejercicio ejerce diversas funciones metabólicas en diferentes órganos, entre ellas, contribuye a la liberación de glucosa hepática, estimula la producción del péptido GLP-1 (péptido similar al glucagón-1) en el intestino y el páncreas, favoreciendo de esta forma la secreción de insulina en estos órganos, estimula la lipólisis y la oxidación de ácidos grasos en el tejido adiposo, aumenta la captación de glucosa basal y la translocación del transportador de glucosa GLUT4 (Gomarasca et al., 2020).

Uno de los beneficios del entrenamiento continuado es la reducción de los niveles de IL6 en reposo; mientras que el ejercicio repetitivo mejora la sensibilidad a IL6 en el músculo esquelético, el sedentarismo, por el contrario, aumenta los niveles basales

de IL6 y lleva al órgano a desarrollar resistencia a IL6, relacionada con el desarrollo también de resistencia a insulina (Lombardi et al., 2016; Gomasasca et al., 2020).

#### **4.5 IL6 en el Páncreas**

Uno de los procesos patológicos en los que IL6 tiene un papel destacado es la resistencia a insulina, estrechamente ligada a la diabetes mellitus tipo 2. La resistencia a la insulina se debe a la incapacidad de las células para hacer uso de la glucosa circulante lo que conduce a un estado de hiperglucemia (Rehman et al., 2017). Dicha patología se caracteriza por la desregulación en la señalización por insulina debido a concentraciones inadecuadas de la hormona o modificaciones funcionales de las moléculas que participan en la transducción de señales (Awazawa et al., 2011), repercutiendo en órganos diana como son el hígado, el tejido adiposo o el músculo esquelético.

La secreción de insulina es llevada a cabo, fundamentalmente, por las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos y se encuentra muy influenciada por el estrés oxidativo y la inflamación; IL6 es uno de los principales precursores de inflamación de bajo grado en este tejido y diversos estudios han demostrado que la exposición crónica de islotes pancreáticos humanos y de ratón a IL6 altera la secreción normal de insulina estimulada por glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas (Ellingsgaard et al., 2008; Rehman et al., 2017). También, parece que la sobreexpresión de IL6 en dicho órgano correlaciona con la apoptosis progresiva de las células  $\beta$  al potenciar la síntesis de óxido nítrico inducida por IL1 (Wadt et al., 1998). Sin embargo, parece que los efectos de la IL6 sobre las células pancreáticas, depende en gran medida de la dosis y el tiempo de exposición a dicha citoquina, puesto que la exposición aguda no tiene efectos sobre el funcionamiento normal de estas células (Kim et al., 2004; Rehman et al., 2017).

Por otro lado, diversos estudios experimentales han demostrado que IL6 también participa en la inducción de la resistencia a insulina en hígado y tejido adiposo a través de la expresión de SOCS3 y la inhibición tanto de la autofosforilación del receptor de insulina como de la fosforilación de IRS1 e IRS2 (Rehman et al., 2017). La insulina ejerce su acción a través de la unión a su receptor de membrana (IR) que, una vez activado, se autofosforila y fosforila a varios intermediarios, entre ellos la familia de los

IRS (Sustratos del Receptor de Insulina). En tejido adiposo, IL6 regula la expresión de la proteína SOC3, de hecho, se ha observado que los niveles de expresión de esta proteína aumentan en líneas celulares de adipocitos expuestas a la citoquina (Lagathu et al., 2003); SOC3 interactúa con IRS1 e IRS2 promoviendo su proteólisis y, por ende, inhibiendo la transducción de señales (Emanuelli et al., 2000; Rotter et al., 2003). IL6 también contribuye a la resistencia a insulina al disminuir la autofosforilación del receptor de insulina y del sustrato IRS1 (Gillies et al., 2016; Rehman et al., 2017). Experimentos con ratones a los que se les aplicó un tratamiento prolongado con IL6 antes de suministrarles insulina mostraron una disminución en la señalización del IR, que se reflejó en su sensibilidad a dicha hormona en el hígado (Klover et al., 2003).

Sin embargo, existen también estudios que, contrariamente, correlacionan niveles elevados de IL6 con protección frente a la resistencia a insulina; por ejemplo, Awazawa y colaboradores mostraron un aumento en la sensibilidad a insulina en hepatocitos debido a la regulación positiva ejercida por la adiponectina sobre IRS2, en un proceso dependiente de IL6 (Awazawa et al., 2011); u otro ejemplo es el observado en el músculo esquelético, donde la IL6 producida durante y después del ejercicio físico repercute positivamente en la sensibilidad a la hormona (Park et al., 2015).

De esta manera parece que, como ocurría con el efecto de IL6 sobre las células  $\beta$  pancreáticas, su rol en la señalización de la insulina en el tejido adiposo, hígado y músculo esquelético está íntimamente relacionado con el tiempo de exposición (Senn et al., 2002), los intermediarios que participen en la señalización (Awazawa et al., 2011) o el órgano y las circunstancias bajo las cuales se secreta (Trayhurn et al., 2011).

#### **4.6 IL6 en el Tejido Adiposo**

El tejido adiposo blanco es un órgano complejo y heterogéneo en cuanto a su composición y distribución corporal. Está formado fundamentalmente por adipocitos maduros y preadipocitos, así como por otros tipos celulares incluidos fibroblastos, células endoteliales, pericitos, fibras nerviosas y células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, y linfocitos T y B (Harwood, 2012; Chait and den Hartigh,

2020; Michailidou et al., 2022). Tradicionalmente ha sido objeto de estudio por su papel como regulador de la homeostasis energética, encargándose del almacenamiento y la liberación de lípidos según las necesidades metabólicas (ingesta, ayuno, ejercicio físico, gestación o lactancia) del organismo (Galic et al., 2010; Zwick et al., 2018). Sin embargo, numerosos estudios en los últimos años han puesto de manifiesto su importante función, también, como órgano endocrino (Kershaw and Flier, 2004; Blüher, 2013; Klöting and Blüher, 2014; Fasshauer and Blüher, 2015a).

Los diferentes tipos celulares que componen el tejido adiposo sintetizan y secretan una gran variedad de biomoléculas tales como hormonas, factores de coagulación, factores de crecimiento, mediadores pro- y antiinflamatorios y quimioquinas que genéricamente reciben el nombre de adipoquinas (Ahima and Lazar, 2008; Malagón et al., 2013; Smitka and Marešová, 2015; Burhans et al., 2018). Dichos factores actúan tanto de manera autocrina/paracrina como endocrina, ejerciendo sus acciones en diferentes tejidos y órganos incluidos cerebro, hígado, páncreas, músculo esquelético, sistema inmune o el propio tejido adiposo (Blüher and Mantzoros, 2015; Burhans et al., 2018), donde regulan una gran variedad de procesos biológicos como la respuesta inmune, la inflamación, el metabolismo de la glucosa y los lípidos, la adipogénesis, la homeostasis energética o la coagulación, entre otros (Fasshauer and Blüher, 2015a; Smitka and Marešová, 2015). De hecho, la disfunción del tejido adiposo y, por ende, la desregulación de estas adipoquinas tiene como consecuencia el desarrollo de diversas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2, así como trastornos vasculares y diferentes cánceres (Van Gaal et al., 2006; LeRoith et al., 2008; Blüher, 2013; Fasshauer and Blüher, 2015b; Manieri et al., 2019).

A lo largo de los últimos años, de entre las más de 600 adipoquinas secretadas por el tejido adiposo (Kershaw and Flier, 2004), IL6 ha generado un interés especial ya que, como se ha comentado con anterioridad, resulta fundamental en el mantenimiento de la homeostasis tisular. En este tejido regula procesos tan importantes como el metabolismo glucídico y lipídico (Malagón et al., 2013) y además, está implicada en el desarrollo de diversas patologías como la obesidad y la resistencia a insulina (Eder et al., 2009). Así, los niveles de IL6 en plasma correlacionan positivamente con la acumulación

de grasa y el incremento de masa corporal, elevándose en la obesidad (Fried et al., 1998) y la diabetes tipo 2 (Pradhan, 2001) y disminuyendo con la pérdida de tejido adiposo y de peso corporal (Ziccardi et al., 2002; Esposito et al., 2003).

La obesidad es una condición muy compleja y multifactorial que, además, constituye uno de los factores de mayor predisposición a padecer lo que se conoce como síndrome metabólico, que agrupa a patologías como la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, hipertensión, resistencia a insulina, diabetes mellitus o hiperlipidemia (Isomaa et al., 2001). Pese a la elevada incidencia que tiene en la población mundial, los mecanismos moleculares implicados en su aparición y en el de las patologías que aparecen asociadas a ella están aún poco esclarecidos. Durante su desarrollo no solo se produce un incremento en el tamaño de los adipocitos y en la acumulación de grasa en el tejido adiposo, también aumenta la producción de factores proinflamatorios tales como IL6, por parte de los adipocitos y macrófagos infiltrados, y se activan diferentes rutas que regulan la respuesta a estrés (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003). De hecho, actualmente la obesidad se concibe como un estado inflamatorio sistémico de bajo grado, caracterizado por la sobreproducción de citoquinas y adipoquinas proinflamatorias que alteran la homeostasis energética y aumentan el riesgo cardiometabólico (Eder et al., 2009; Olefsky and Glass, 2010).

Actualmente son numerosos los trabajos centrados en dilucidar la relación existente entre IL6 y la progresión de la obesidad, así como cuáles son los mecanismos moleculares que regulan su expresión en el tejido, con el objetivo de obtener dianas terapéuticas basadas en ella y su señalización.

En los últimos años, las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) se han convertido en moléculas clave en el metabolismo del tejido adiposo. Existen evidencias de su importante implicación en la obesidad, diabetes y resistencia a insulina. Así, por ejemplo, se ha encontrado un elevado nivel de activación de las p38MAPKs en pacientes obesos y diabéticos (González-Terán et al., 2016), sugiriendo que éstas podrían estar implicadas en el propio origen de estas patologías.

Las MAPKs son serina, treonina y tirosina quinasas muy conservadas evolutivamente en todos los eucariotas y desempeñan un papel crucial en el desarrollo normal y fisiopatológico, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis (Cargnello and Roux, 2011). Las MAPKs actúan en cascadas de señalización que incluyen tres quinasas principales: MAPKKKs, MAPKKs y MAPKs. Las MAPK quinasas quinasas responden a estímulos extra o intracelulares y transmiten las señales fosforilando quinasas intermedias. Estas MAPKs quinasas activan a las MAPKs terminales, y éstas a su vez fosforilan a otras proteínas diana en la vía, que ejecutan acciones específicas según la señal de entrada (Guo et al., 2020; Lee et al., 2020). Las MAPKs controlan estrictamente multitud de procesos como proliferación, diferenciación, supervivencia o muerte (Cargnello and Roux, 2011; Yang and Huang, 2015), por lo que la desregulación de sus vías de señalización puede conducir a la aparición de diversas enfermedades, entre ellas, como ya se ha comentado anteriormente, la obesidad (Anerillas et al., 2020; Patel and Naik, 2020). Dentro de las MAPKs encontramos dos subfamilias, las SAPKs p38MAPKs y JNK, que responden principalmente a señales de estrés (Kuma et al., 2005; Manieri and Sabio, 2015). Y la familia ERK, que son activadas fundamentalmente por factores de crecimiento (Cargnello and Roux, 2011). Mientras que la familia p38MAPK tiene cuatro isoformas, p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , activadas por MKK3 y MKK6 (Sacks et al., 2018), la familia JNK tiene tres isoformas, JNK1, 2 y 3, y son fosforiladas por MKK4 y MKK7 (Sabio and Davis, 2010). Por otro lado, la familia ERK tiene tres isoformas, ERK1 y ERK2 activadas por MEK1/2 y ERK5 activada por MEK5 (Cargnello and Roux, 2011).

Diversos estudios sitúan a estas proteínas como mediadores fundamentales en la producción de citoquinas proinflamatorias, entre las que se encuentra IL6, en diferentes tipos celulares (Del Reino et al., 2014; Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017; García-Hernández et al., 2021). Por esta razón, se han convertido en objetivos moleculares clave en la búsqueda de posibles tratamientos para enfermedades inflamatorias crónicas (Thalhamer et al., 2008). De este modo, se ha estudiado el papel que desempeñan en la expresión de IL6 en diversos tejidos. Por ejemplo, se ha visto que la ablación de JNK1 en el tejido adiposo de ratones disminuye la expresión de IL6 y protege contra la resistencia hepática a la insulina inducida por una dieta alta en calorías

(Sabio et al., 2008). Además, se ha demostrado que Wnt5a aumenta la expresión de IL6 a través de la activación de JNK en adipocitos viscerales de humanos obesos (Zuriaga et al., 2017). A la luz de estos resultados parece que la expresión de IL6 mediada por JNK podría ser un mecanismo generalizado y común en diferentes organismos y tejidos. Por otra parte, la familia de las ERK también se ha implicado en la expresión de IL6. Experimentos en los que se trataron preadipocitos humanos con la enzima D-dopacromo tautomerasa, implicada en el metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo, mostraron un aumento de los niveles de fosforilación de ERK1/2 y de la expresión de IL6, que fueron atenuados por la aplicación de U0126, un inhibidor de ERK1/2 (Ishimoto et al., 2012). Así mismo, otro ejemplo de implicación de ERK en la modulación de la expresión de IL6 se observó en un ensayo realizado con la línea celular de adipocitos 3T3-L1, en el que el tratamiento con ácido ursólico aumentó la expresión de IL6 a través de ERK1/2 y NFκB (Feng et al., 2020). En cuanto a las p38MAPKs, aunque se conoce su participación en la regulación de la expresión de IL6 en varias líneas celulares (Beyaert et al., 1996), así como en condrocitos (Rasheed et al., 2011), células endoteliales humanas (Liu et al., 2009), astrocitos (Van Wagoner et al., 2002) o fibras musculares lisas (Amrani et al., 2001), su función en la regulación de la expresión de IL6 en el tejido adiposo es mucho más desconocida. Recientemente se ha observado que en cultivo celulares 3T3-L1 sometidos a estrés inflamatorio con TNFα, aumentó la fosforilación de las MAPKs, p38, JNK y ERK1/2, en preadipocitos y adipocitos, repercutiendo en la posterior expresión de factores inflamatorios. Por otro lado, el silenciamiento de la expresión de fosfatasas de doble especificidad en dichos cultivos, también aumentó la señalización de las MAPKs, reflejándose en un incremento significativo de la expresión de genes proinflamatorios, entre ellos IL6 (Ferguson et al., 2019).

Otro grupo de proteínas importantes tanto en la adipogénesis como en la expresión de IL6 es la familia de las glicoproteínas WNT. Se trata de unas moléculas de señalización que son secretadas en respuesta a diversos estímulos y desempeñan multitud de funciones durante el desarrollo embrionario (Fuster et al., 2015). Actúan de manera autocrina/paracrina activando diferentes rutas de señalización,

tradicionalmente conocidas como canónicas ( $\beta$ -catenina dependientes) y no canónicas ( $\beta$ -catenina independientes) y controlan procesos tan importantes como la proliferación, la diferenciación o la supervivencia celular (Catalán et al., 2014).

Ambos tipos de rutas se activan en el tejido adiposo favoreciendo el mantenimiento de su homeostasis; de esta manera se ha visto, por ejemplo, que ligandos Wnt canónicos como Wnt10b inhiben la adipogénesis (Ross, 2000; Kawai et al., 2007; Takada et al., 2009), mientras que el ligando Wnt no canónico, Wnt5b, la promueve indirectamente al inhibir la vía canónica Wnt10b (Kanazawa et al., 2005). Sin embargo, aunque la señalización no canónica también está presente en el tejido adiposo, su función en este tejido no está tan estudiada como el de la señalización canónica (Zuriaga et al., 2017). Algunos resultados parecen indicar que los ligandos no canónicos están relacionados principalmente con la respuesta inflamatoria en el tejido adiposo (Catalán et al., 2014).

WNT5a es el principal ligando WNT que actúa a través de la señalización no canónica. Son dos las vías de señalización independientes de  $\beta$ -catenina que pueden ser activadas por el ligando WNT5a, la ruta de señalización de polaridad celular planar, WNT5a/PCP, implicada en proliferación celular y la ruta WNT5/Ca<sup>2+</sup>, que interviene, fundamentalmente, en la regulación de los niveles de calcio en el interior de las células. En ambos casos, la transducción de señales se dispara con la unión de WNT5a a su receptor de membrana Frizzled (Ouchi et al., 2010).

En el tejido adiposo WNT5a desempeña funciones antiadipogénicas y proinflamatorias, relacionándose con la obesidad y patologías asociadas como la diabetes mellitus tipo 2 (Pereira et al., 2008; Bilkovski et al., 2011; Catalán et al., 2014). Se ha demostrado que su expresión en tejido adiposo de ratón es inducida por dieta alta en calorías y durante la obesidad (Oh and Olefsky, 2010; Ouchi et al., 2010; Catalán et al., 2014); además también se ha visto que su expresión está exacerbada en los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo de individuos obesos y con diabetes mellitus tipo 2 (Bilkovski et al., 2011). Por otro lado, la ablación de WNT5a en ratones obesos



umenta la sensibilidad a la insulina y reduce la respuesta inflamatoria en los adipocitos (Fuster et al., 2015).

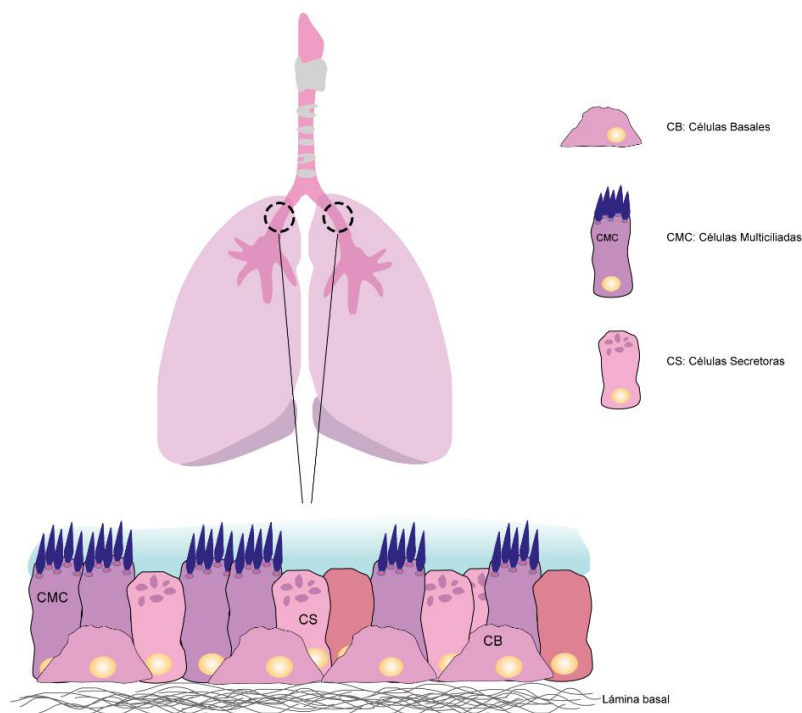
Dado la importancia que esta proteína tiene en la inflamación del tejido adiposo, numerosos trabajos se han centrado en dilucidar la relación existente entre dicha molécula y la producción de mediadores proinflamatorios como IL6. Estudios con tejido adiposo humano de individuos con obesidad mostraron que la señalización no canónica WNT5a/PCP conducía a una mayor producción de IL6 a través de la activación de JNK, lo que contribuía a un mayor grado de inflamación sistémica en el tejido (Zuriaga et al., 2017).

Sin duda, la búsqueda de vías de señalización implicadas en el desarrollo de la respuesta inflamatoria asociada a la obesidad ha pasado a ser de vital importancia. Su relación con la disfunción del propio tejido adiposo y con la aparición de otras patologías como la resistencia a insulina o la diabetes hacen necesario seguir investigando sobre su origen. Sin embargo, a pesar de los hallazgos sobre la regulación de la expresión de factores proinflamatorios en el tejido adiposo, los mecanismos específicos implicados en la sobreproducción de IL6 en este tejido están todavía pobremente definidos. En base a esto, en el primer capítulo de esta Tesis nos propusimos profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la sobreproducción de IL6 en el tejido adiposo. Estudiar el papel que las quinasas p38MAPKs desempeñan en la expresión de esta citoquina, así como la participación del eje de señalización WNT5a-JNK en dicho proceso.

#### **4.7 IL6 en el Sistema Respiratorio**

La función de IL6 en el sistema respiratorio ha cobrado gran relevancia en los últimos años debido a su implicación en la regeneración y diferenciación del epitelio que reviste las vías respiratorias (Tadokoro et al., 2014). Así como en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar y su relación con el desarrollo de enfermedades crónicas de tipo inflamatorio como el asma, la EPOC (Enfermedad Obstructiva Crónica) o la fibrosis pulmonar (Dawson et al., 2021).

El epitelio que tapiza las vías respiratorias es una capa multicelular pseudoestratificada compleja, constituida por al menos 11 tipos celulares diferentes entre los que destacan las células basales, más próximas a la lámina basal y con capacidad para dar lugar al resto de tipos celulares; las células secretoras, encargadas de secretar hacia el lumen mucus, constituido principalmente por proteínas altamente glicosiladas, lípidos, iones, glicosaminoglicanos y agua, y cuya función principal es atrapar posibles partículas en suspensión y actuar de barrera frente a la entrada de patógenos y sustancias contaminantes; y células multiciliadas, con centenares de cilios que baten de forma coordinada para mover la capa mucosa hacia la zona proximal del sistema respiratorio y expulsar fuera del organismo partículas, patógenos y fluidos no deseados fuera del organismo (Bertalanffy and Leblond, 1955; Brooks and Wallingford, 2014; Herriges and Morrisey, 2014) (Figura I.8).



**Figura I.8: Esquema de las células que componen el epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias.** El epitelio que recubre las vías respiratorias humanas es en su mayor parte pseudoestratificado, con células basales, multiciliadas y secretoras principalmente, y la transición a epitelio cuboidal simple, sin células basales, se da únicamente en los bronquiolos más distales, los que están en contacto con los alveolos. CB: Células basales. CMC: Células multiciliadas. CS: Células secretoras.

Las poblaciones de los diferentes tipos celulares que encontramos en el epitelio respiratorio deben estar en equilibrio para asegurar así el mantenimiento de la homeostasis en el tejido. Para ello, las actividades regenerativas y de diferenciación de las células madre basales se encuentran estrictamente reguladas. En condiciones normales, el recambio celular en las vías respiratorias es bajo, sin embargo, cuando el epitelio es dañado por exposición a algún agente tóxico o por la entrada de algún agente patógeno, ese recambio es rápidamente restaurado a través de la diferenciación de las células madre basales (Tadokoro et al., 2014). Defectos en los patrones de señalización y diferenciación de estas células basales se han relacionado con multitud de enfermedades que afectan al sistema respiratorio como el asma o la fibrosis quística (Leeman et al., 2014; Dawson et al., 2021).

Estudios recientes han demostrado la participación de IL6 en este proceso de reparación y renovación del tejido respiratorio a través de la regulación de la expresión de genes que participan en la diferenciación celular. En este epitelio, la modulación de la ruta de Notch determina el balance entre los distintos tipos celulares (Rock et al., 2011). Cuando la ruta está inhibida, las células multiciliadas se expanden en detrimento de la población de células secretoras. Además, dicha inhibición también parece estar implicada en la transdiferenciación de células secretoras en células multiciliadas (Lafkas et al., 2015). Otros dos genes que resultan fundamentales en el proceso de la multiciliogénesis son *MCIDAS* y *FOXJ1*. Por un lado, *MCIDAS* activa la transcripción de genes requeridos en la formación de los cuerpos basales de los cilios (Stubbs et al., 2012; Balestra and Gönczy, 2014; Ma et al., 2014) y, por otro lado, *FOXJ1* regula la extensión del axonema, la motilidad del cilio y el anclaje de los cuerpos basales (Gomperts et al., 2004; Stauber et al., 2017), e interacciona con otros factores de transcripción controlando el ensamblaje de los distintos componentes del cilio (Yu et al., 2008; Didon et al., 2013).

La activación de la cascada de señalización IL6/STAT3 induce la diferenciación de las células basales a células multiciliadas, a expensas del linaje secretor, regulando la expresión de los genes antes mencionados. Como ya se comentó en el punto 2.4.1 de este apartado de introducción, la unión de IL6 a su complejo receptor en la membrana

celular activa a las proteínas JAK y promueve la dimerización y translocación al núcleo de STAT3. Es entonces cuando STAT3 se une a la región promotora del gen *NOTCH1* reprimiendo su expresión y a las de *MCIDAS* y *FOXJ1* induciéndolas, favoreciendo de esta manera la diferenciación de las células multiciliadas (Tadokoro et al., 2014; Dawson et al., 2021). Alteraciones en esta población de células multiciliadas en respuesta a estrés, tabaco, contaminación o episodios de inflamación pueden conducir a infecciones respiratorias recurrentes como la EPOC. Es, por tanto, razonable pensar que IL6 desempeña un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio respiratorio, favoreciendo su autorrenovación y regeneración a partir de las células madre basales.

Otra función destacada de IL6 en el sistema respiratorio es su participación en la respuesta inmunitaria y su relación con el desarrollo de enfermedades crónicas de tipo inflamatorio en este tejido. Dado que el sistema respiratorio se encuentra constantemente expuesto al exterior y a la posible entrada de patógenos, la regulación estricta de la respuesta inmunitaria en este tejido resulta crucial para el mantenimiento de su integridad (Atamas et al., 2013). Macrófagos, neutrófilos y linfocitos, así como células epiteliales, endoteliales y mesenquimales del propio epitelio respiratorio participan en la regulación de la respuesta inmune, fundamentalmente, a través de la liberación de diversos factores pro/antiinflamatorios, entre los que se encuentra IL6 (Hallstrand et al., 2014; Dawson et al., 2021).

Las enfermedades pulmonares crónicas como el asma, la EPOC o la fibrosis pulmonar constituyen, actualmente, un importante problema de salud a nivel mundial ya que su prevalencia ha aumentado en los últimos años como consecuencia del envejecimiento de la población y la contaminación del aire (Garth et al., 2018). Una de las características más notorias de todos estos trastornos es la aparición de un estado inflamatorio crónico, consecuencia de la presencia exacerbada de factores proinflamatorios como IL6 (Atamas et al., 2013; Garth et al., 2018; Dawson et al., 2021). De este modo, se han encontrado, por ejemplo, niveles elevados de esta citoquina en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC (Wei et al., 2015; Dawson et al., 2021), así como en modelos murinos y pacientes con fibrosis pulmonar (Dawson et al., 2021). Diversos

trabajos apuntan a un papel determinante de IL6 en la patogenia de estas enfermedades y, aunque los mecanismos mediante los cuales afecta a la función pulmonar todavía no están bien definidos, parece que es determinante en la desregulación de la respuesta inmunitaria, favoreciendo su prolongación en el tiempo y la producción exacerbada de otros factores proinflamatorios (Rincon and Irvin, 2012).

IL6 es, además, una citoquina muy importante en la lucha frente a la infección por virus en las vías respiratorias. Como ya se ha comentado anteriormente, IL6 participa tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa regulando las poblaciones de neutrófilos y macrófagos, así como el reclutamiento y la diferenciación de las células T. De hecho, experimentos en los que se infectaron ratones deficientes en IL6 y ratones *wild type* con el virus de la influenza mostraron una respuesta inmune deficiente en aquellos animales que no expresaban la citoquina (Lauder et al., 2013; Yang et al., 2017). Y, extrapolando estos resultados a los humanos, se ha visto que individuos con mutaciones en la región promotora del gen de IL6 que dan lugar a una producción insuficiente de la citoquina son más susceptibles a las infecciones por virus respiratorios (Doyle et al., 2010). Sin embargo, existen evidencias de que la sobreexpresión de esta citoquina puede tener, también, efectos opuestos y generar una respuesta inmune exacerbada y sostenida en el tiempo tras la infección, con efectos nocivos en el individuo (Velazquez-Salinas et al., 2019). Por ejemplo, en la infección por SARS-CoV-2 los individuos con un cuadro clínico más grave presentaban un estado generalizado de hiperinflamación, con liberación exacerbada de citoquinas, entre ellas IL6 y una sobreactivación de sus sistemas inmunes (McGonagle et al., 2020; Patra et al., 2020; Smetana and Brábek, 2020).

Por tanto, IL-6, como hemos visto, puede tener funciones totalmente contrapuestas en el sistema respiratorio, favoreciendo la regeneración del tejido y la protección frente a infecciones, pero también participando en el desarrollo de estados crónicos de inflamación característicos de multitud de enfermedades respiratorias. Tener en cuenta el contexto y la dinámica de la señalización de esta citoquina es de vital importancia a la hora de diseñar terapias más específicas para abordar los efectos patológicos de sus acciones. Con respecto a esto, los últimos esfuerzos se han centrado

en terapias basadas en el bloqueo específico de su trans-señalización en lugar de un bloqueo global de todas sus funciones ya que se ha visto que es su señalización a través de receptores solubles la que modula, principalmente, las respuestas proinflamatorias (McGonagle et al., 2020; Dawson et al., 2021; McElvaney et al., 2021).

Dado su implicación en el desarrollo de todas estas enfermedades respiratorias, su contribución al mantenimiento de la homeostasis del epitelio, así como las funciones que ejerce en la regulación y desregulación inmunitaria, en el segundo capítulo de esta Tesis nos propusimos estudiar el papel fisiológico que IL6 desempeña en el epitelio respiratorio.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**





### 1. Modelo murino: preadipocitos blancos

En el estudio del papel de las p38MAPKs en la expresión de IL6 se utilizaron preadipocitos blancos procedentes de ratones *wild-type* (Wt) y de ratones en los que se había apagado selectivamente la expresión individual de los siguientes genes: *Mkk3* ( $Mkk3^{-/-}$ ), *Mkk6* ( $Mkk6^{-/-}$ ), *p38 $\alpha$*  ( $p38\alpha^{-/-}$ ), *p38 $\beta$*  ( $p38\beta^{-/-}$ ), *p38 $\gamma$*  ( $p38\gamma^{-/-}$ ) y *p38 $\delta$*  ( $p38\delta^{-/-}$ ). Dichas líneas celulares fueron inmortalizadas mediante infección lentiviral, empleando la región codificante del antígeno T del virus SV40 clonada en un plásmido pBABE (SV40T-pBABE-neo); y fueron cedidas por la doctora Guadalupe Sabio fruto de la colaboración con su grupo de investigación a través del proyecto SAF2013-43506-R.

#### 1.1 Cultivo y expansión de los preadipocitos blancos de ratón

Las diferentes líneas celulares inmortalizadas se crecieron en placas de cultivo de 100mm (*Falcon*, #353003) con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; *Gibco*, #21969-c35) suplementado con Suero Fetal Bovino (FBS; al 10% v/v, *Gibco*, #10500-064), L-Glutamina 2mM (*Gibco*, #25030-024) y Penicilina/Estreptomicina (P/S; al 1% v/v, *Gibco*, #15140-122) y se mantuvieron en cultivo a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar una confluencia del 70-80%, realizándoles cambios de medio cada 2-3 días. Una vez las células alcanzaron dicha confluencia, se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS (*Fisher B.*, #BP2944) y se incubaron con tripsina-EDTA (*Gibco*, #11570626) durante 2-3 minutos a 37°C hasta conseguir que se despegaran de las placas, obteniéndose una suspensión celular. A continuación, las células se transfirieron a un tubo *falcon* (*Corning*, #10203001) con medio DMEM completo y se centrifugaron a 200xg durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se retiró y el precipitado de células se resuspendió en medio DMEM completo, quedando así el cultivo preparado para la realización de los distintos experimentos.

## 2. Tratamientos en los cultivos celulares de preadipocitos blancos de ratón

Para el tratamiento de los distintos cultivos, las células en suspensión se contaron utilizando el sistema *Countess™ 3 FL Automated Cell Counter (Invitrogen)* y se sembraron en placas de 35mm (*Falcon, #430588*) a una confluencia de  $6 \times 10^5$  células/placa. Transcurridas 8 horas, el medio de cultivo se sustituyó por medio DMEM sin FBS y después de 4 horas, dicho medio se reemplazó por medio DMEM sin FBS suplementado con diferentes agentes químicos, en función de las condiciones experimentales. Los compuestos utilizados se prepararon siguiendo las indicaciones de cada fabricante y los tratamientos se llevaron a cabo durante 8 horas, incubándose las células a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. En el caso de los cultivos controles, fueron incubados durante el mismo tiempo con los volúmenes correspondientes del solvente. A continuación, se detallan los reactivos utilizados en los cultivos, así como su concentración de uso:

- **JNK-IN-8** (*Calbiochem, #420135*): Se trata de un inhibidor intracelular específico e irreversible de la actividad de las tres isoformas de la quinasa JNK (JNK1, JNK2, JNK3). Forma un enlace covalente con una cisteína conservada del sitio de unión a ATP de dicha quinasa, inhibiendo, de esta manera, la fosforilación de su sustrato directo, c-Jun, en las células (Zhang et al., 2012). Disuelto en DMSO se utilizó a una concentración de 3µM.
- **WNT5a** (*R&D Systems, #645-WN-010*): Se trata de un ligando específico de la ruta no canónica de la familia de las proteínas WNT. Resulta fundamental durante el desarrollo embrionario y, entre la multitud de funciones que desempeña, ha sido relacionado con la inflamación del tejido adiposo inducida por la obesidad y la resistencia sistémica a la insulina (Zuriaga et al., 2017). Disuelto en PBS-BSA al 0,1% (p/v) se utilizó a varias concentraciones diferentes: 0,2µg/ml; 0,5µg/ml y 1µg/ml.
- **BOX5** (*EMD Millipore, #681673*): Se trata de un hexapéptido que deriva de la proteína Wnt5a y antagoniza eficazmente las actividad biológicas mediadas por dicha proteína en los cultivos celulares. Ejerce su acción por unión directa al

receptor transmembrana FZD5 (*Frizzled Class Receptor 5*). Disuelto en DMSO, se utilizó a una concentración de 3µg/ml.

- **BIRB 0796** (*Sigma-Aldrich, #506172*): Se trata de un inhibidor intracelular que impide que las diferentes isoformas de la quinasa p38 adquieran su conformación activa. p38 presenta un dominio DFG (Aspartato-Fenilalanina-Glicina), muy conservado, próximo a su centro activo; en presencia del inhibidor este dominio DFG es desplazado, apareciendo un nuevo bolsillo hidrofóbico que es ocupado por el inhibidor; a su vez, la fenilalanina del dominio DFG desplazado, se sitúa de manera que interfiere estéricamente con el bolsillo de unión a ATP, inactivando p38 (Pargellis et al., 2002). Disuelto en DMSO, se utilizó a una concentración de 10µM.
- **U0126** (*Cell Signaling, #9903*): Se trata de un compuesto orgánico que inhibe la activación de ERK, al inhibir la actividad de la quinasa MEK (Favata et al., 1998). Disuelto en DMSO, se utilizó a una concentración de 10µM.
- **PD184352** (*Tocris, #4237*): Se trata de un inhibidor de la actividad de MEK que bloquea eficazmente la fosforilación de ERK y la transducción continua de señales a través de esta vía (Allen et al., 2003). Disuelto en DMSO, se utilizó a una concentración de 2µM.
- **Microcystin L-R** (*Sigma-Aldrich, #33893*): Se trata de un péptido hepatotóxico producido por la cianobacteria *Microcystis aeruginosa* que actúa como un potente inhibidor de las proteínas fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A) (Honkanen et al., 1990). Disuelto en metanol, se utilizó a una concentración de 10µM.

### 3. Análisis de proteínas mediante *Immunoblotting* (*Western-blot*)

El análisis de los niveles de expresión y estados de fosforilación de proteínas se llevó a cabo mediante *western-blot*; esta técnica consiste en la separación

de las proteínas en función de su peso molecular en geles de acrilamida y su posterior transferencia a una membrana, para su detección a través del marcaje con anticuerpos.

### **3.1 Preparación de los extractos proteicos. Lisados**

En la extracción de proteínas de las muestras de interés se empleó un tampón de lisis preparado en fresco y compuesto por Tris-HCl 50mM (pH 7,5) (*Panreac*, #A2264), EGTA 1mM (*Sigma*, #E-4378), EDTA 1mM (*Fisher*, #010700153), ortovanadato sódico 1mM (*Sigma*, #S6508-10G), fosfato sódico 5mM (*Sigma*, #342483-25G), fluoruro sódico 10mM (*Sigma*, #201154-100G), sacarosa 0,27M (*Panreac*, #131621.1210),  $\beta$ -mercaptoetanol (1% v/v; *Panreac*, #A1108.0100), Tritón X-100 (*Sigma*, #T9284) y un cóctel de inhibidores de proteasas 1x (*Roche*, #11873580001).

Para la preparación de los extractos, las células se lavaron con PBS y, una vez retirado, se les añadió 80 $\mu$ l del tampón de lisis antes descrito; a continuación, con ayuda de un raspador de células de tipo *scraper* se despegaron de las placas de cultivo y se transfirieron a tubos *ependorf* para su incubación durante 1 hora a 4°C y en agitación. Trascurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14000xg durante 30 minutos y 4°C para eliminar los restos de membranas y fragmentos celulares no lisados. Finalmente, los sobrenadantes se transfirieron a tubos *ependorf* y se separaron alícuotas de 10  $\mu$ l de cada una de las muestras para determinar, a posteriori, la cantidad de proteínas presentes en cada una de ellas.

### **3.2 Cuantificación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó mediante el método colorimétrico de *Bradford* (Bradford, 1976) empleando el reactivo *Coomassie G250* (*Bio-Rad*, #5000205) y albúmina de suero bovino (BSA, *Panreac*, #A8412) para elaborar una recta patrón de concentraciones conocidas de proteína. Para ello, se tomaron cantidades crecientes de BSA, desde 0,25 $\mu$ g hasta 2,5 $\mu$ g, que se diluyeron en agua hasta un volumen final de 160 $\mu$ l y se dispensaron en una placa de 96 pocillos (*TPP*, #92096). En la misma placa, se prepararon las muestras, añadiendo 1 $\mu$ l de extracto proteico a 159 $\mu$ l de agua. Tanto en los diferentes puntos de la recta patrón

como en las muestras, se añadieron 40µl de reactivo de *Coomassie* y se homogenizó muy bien para, a continuación, medir la absorbancia de los distintos pocillos a 595nm en el lector de placas multipocillo *Infinite M Plex (Tecan)*. La concentración de proteínas de cada uno de los extractos se determinó por regresión lineal a partir de la recta patrón construida con las cantidades conocidas de BSA.

### **3.3 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)**

Conocida la concentración de proteínas, las muestras se mezclaron con el volumen apropiado de tampón de carga (1/5 del volumen total) para mantener así las condiciones desnaturizantes, incrementar la densidad de la muestra y permitir la visualización del frente por la adición de azul de bromofenol. Este tampón de carga contenía Tris-HCl 6,5mM pH 6,8, SDS (10% p/v; *Sigma*, #161-031), glicerol (50% v/v; *Panreac*, #122329), azul de bromofenol (0,025% p/v; *Bio-Rad*, #1610404) y β-mercaptoetanol (20% v/v). Una vez mezcladas, las muestras se incubaron a 95°C durante 5 minutos para su desnaturización térmica, quedando así listas para ser separadas en geles de acrilamida.

La separación de las proteínas en función de su peso molecular se llevó a cabo en geles de acrilamida-bis-acrilamida siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Para ello se preparó primero el gel inferior o separador, con una concentración de acrilamida del 10%. Este gel estaba constituido por acrilamida-bis-acrilamida 40% (24,8% v/v, *Alfa Aesar*, #J60868), Tris 1,5M pH 8,8 (25% v/v), SDS 10% (1% v/v), persulfato amónico 10% (0,5% v/v, *Panreac*, #A2941), TEMED (0,1% v/v, *Sigma*, #T9281) y H<sub>2</sub>O (48,6% v/v). Una vez polimerizado, se preparó el gel superior con la misma composición, pero una menor concentración de acrilamida (4%) y utilizando Tris 0,5M pH 6,8 en lugar del Tris 1,5M pH 8,8 para permitir la concentración de las proteínas justo en la zona superior del gel separador. Se cargaron alícuotas de entre 10µg y 20µg y, además, se utilizó el patrón de pesos moleculares *Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad*, #161-0374). La electroforesis se realizó en un tampón constituido por Tris 25mM, Glicina 192mM y SDS al 0,1% (p/v, *Fisher*, #BP13414), a un voltaje constante inicial de 70V hasta el empaquetamiento de las proteínas, modificándose después hasta

120V. Se utilizó el sistema de electroforesis *Miniprotean 3 (Bio-Rad)*, y la fuente de alimentación *Power Pac 300 (Bio-Rad)*.

### 3.4 Electrotransferencia en húmedo

Tras la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad, #1620112*) por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta con tampón de transferencia constituido por Tris 25mM, Glicina 192mM (*Thermo Scientific #J62914-K3*) y metanol al 20% (v/v, *#Panreac, A3493*). La transferencia se realizó a 4°C aplicando una intensidad de campo eléctrico constante de 1000mA totales por membrana. Se utilizó la fuente de alimentación *Consort EV261 (Bio-Rad)*. Con el fin de comprobar la eficacia de la electrotransferencia y la homogeneidad de carga de las diferentes muestras, las membranas se tiñeron con el colorante reversible *Ponceau S. (Sigma, #P7170)*. Una vez teñidas, el colorante se retiró de las membranas mediante lavados con una solución de Tris-HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150mM (*Panreac, #131659.1214*) y tween-20 al 0,05% (v/v, *Fisher, #BP337*) (TBS-T).

### 3.5 Marcaje con anticuerpos y revelado de las membranas

Para el marcaje de nuestras proteínas con anticuerpos específicos, las membranas se incubaron con una solución de TBS-T a la que se añadió leche desnatada al 5% (p/v), durante 1 hora, a temperatura ambiente y en agitación constante, con el fin de bloquear las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados. Dichos anticuerpos primarios, recogidos en la tabla M.1, se prepararon en la misma solución de bloqueo, y se incubaron durante toda la noche a 4°C y en agitación.

Tabla M.1: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante *Western blot*

Anticuerpo primario	Dilución	Fuente	Casa Comercial
Anti-MKK3	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #8535</i>
Anti-MKK6	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #9264</i>
Anti-pCJUN	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #3270</i>
Anti-CJUN	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling #9165</i>

<b>Anti-pJNK</b>	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #4668</i>
<b>Anti-JNK</b>	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #9252</i>
<b>Anti-pERK1/2</b>	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #9101</i>
<b>Anti- ERK1/2</b>	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #9102</i>
<b>Anti-VINCULINA</b>	1:1000	Ratón	<i>Sigma, #V4505</i>
<b>Anti-<math>\alpha</math>TUBULINA</b>	1:1000	Ratón	<i>Thermo Fisher, #32–2,500</i>

Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con TBS-T cinco veces durante 10 minutos en agitación y, a continuación, se incubaron durante 1 hora, a temperatura ambiente, con los anticuerpos secundarios correspondientes (tabla M.2), conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), preparados también en solución de bloqueo.

Tabla M.2: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas mediante *Western blot*

<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Fuente</b>	<b>Casa Comercial</b>
<b>Anti-Mouse-HRP</b>	1:1000	Caballo	<i>Cell Signaling, #7076</i>
<b>Anti-Rabbit-HRP</b>	1:1000	Cabra	<i>Cell Signaling, #7074</i>

Una vez incubadas con los anticuerpos secundarios, las membranas de nitrocelulosa se sometieron a seis lavados con TBS-T, y se incubaron durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente *Supersignal™ West Dura* (Thermo Fisher, #34075). Las membranas se revelaron utilizando el equipo iBright CL1000 (Invitrogen). Como control interno, para normalizar los niveles de proteínas entre todas las muestras se utilizó la inmunodetección de vinculina o  $\alpha$ Tubulina, así como la tinción de la membrana con *Ponceau S*. La cuantificación de la señal adquirida se realizó por densitometría, utilizando el software *ImageJ*.

#### **4. Análisis de los niveles de expresión por PCR cuantitativa**

El análisis de los niveles de expresión de los distintos genes en los cultivos celulares se realizó mediante la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) presente en

las muestras. Para ello se extrajo el ARNm, que se sometió después a una reacción de retrotranscripción para sintetizar el ADN complementario (ADNc), utilizado como molde para la PCR cuantitativa.

#### **4.1 Extracción de ARN**

El ARN total de las células en cultivo se obtuvo utilizando el agente *Trizol™* (*Thermo Fisher Scientific*, #15596026), siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, los cultivos celulares se lavaron con PBS, y a continuación se incubaron con 350µl de Trizol durante 5 minutos, a temperatura ambiente, pipeteando varias veces para favorecer la lisis celular. Dado que se trataba de preadipocitos con elevado contenido en grasas, las muestras se centrifugaron a 12000g durante 5 minutos y 4°C, y los sobrenadante obtenidos se transfirieron a tubos *ependorf* limpios. Seguidamente, se añadió 70µl de cloroformo (*Alfa Aesar*, #J67241.AP) a cada una de las muestras y se homogeneizaron empleando un vórtex. Tras 2-3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12000g durante 15 minutos y 4°C. Una vez centrifugadas, se observaron dos fases en los tubos, una fase orgánica y una acuosa que contenía el ARN de interés; con cuidado se transfirió la fase acuosa a tubos limpios evitando arrastrar contaminantes de la fase orgánica inferior. A continuación, se añadió a cada una de las soluciones acuosas 175µl de isopropanol (*Panreac*, #131090), se homogeneizaron con un vórtex y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron a 12000g durante 10 minutos y 4°C. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante se eliminó y el ARN precipitado se lavó con etanol al 75% (*Panreac*, #131086.1211), homogeneizando muy bien y centrifugando a 7.500g durante 5 min y 4°C. Posteriormente, los sobrenadantes se eliminaron y los precipitados de ARN se dejaron secar a temperatura ambiente, con el fin de conseguir la total evaporación del etanol. Por último, los precipitados de ARN se resuspendieron en 25 µl de agua mili-Q libre de ARNasas.

Una vez purificado, se determinó la concentración de ARN midiendo su absorbancia espectrofotométrica a 260nm, así como la presencia de proteínas



contaminantes mediante el ratio  $A_{260}/A_{280}$ . Para ello se utilizó el equipo espectrofotométrico *BioPhotometer* (Eppendorf).

#### **4.2 Retrotranscripción**

Para la retrotranscripción del ARNm a ADNc se utilizó el kit comercial *High-Capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems, #4368814). Siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, se retrotranscribieron 400ng de ARN totales.

Se calculó el volumen de ARN equivalente a 400ng y se llevó a 10 $\mu$ l de agua destilada libre de ARNasas para cada una de las muestras. En otro tubo, se preparó una única mezcla para todas las muestras, del tampón 10x, los cebadores aleatorios para la enzima, la mezcla de dNTPs y la retrotranscriptasa. Una vez preparada, se añadieron 10  $\mu$ l de dicha mezcla a cada uno de los tubos con el ARN, quedando listos para la reacción en el termociclador. Las muestras se incubaron primero a 25°C durante 10 minutos, después 2 horas a 37°C y, por último, a 85°C durante 5 minutos. El equipo termociclador utilizado fue *Veriti 96-well Therman Cycler* (Applied Biosystems). Una vez finalizada la reacción de retrotranscripción, las muestras se diluyeron 10 veces con agua mili-Q para su uso en la reacción de PCR cuantitativa.

#### **4.3 PCR cuantitativa**

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), utilizando el kit *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, #A25742), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Se utilizaron para ello placas de 96 pocillos (*MicroAMP EnduraPlate Optical 96-Well*, Applied Biosystems, #4483354) en las que se depositó 1 $\mu$ l de cada muestra del ADNc sintetizado en el paso anterior. En tubos *eppendorf* se prepararon las mezclas con los cebadores específicos para cada gen objeto de estudio, de manera que por cada ADNc se mezclaron 2 $\mu$ l de los cebadores, 2 $\mu$ l de agua mili-Q y 5 $\mu$ l de la *master mix* proporcionada por el kit, en total 9  $\mu$ l que se depositaron sobre el ADNc en cada uno

de los pocillos. Se realizaron duplicados técnicos de cada gen analizado sobre la misma muestra. El protocolo de qPCR empleado consistió en una primera etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguida de una repetición de 50 ciclos, en cada uno de los cuales se llevó a cabo en primer lugar la desnaturalización del ADN a 95°C durante 10 minutos, a continuación, la hibridación de los cebadores al ADN molde a 60°C, y la extensión de la nueva cadena de ADN, paso tras el cual fue medida la señal de fluorescencia en cada pocillo. Finalizada la reacción, se incluyó un paso para analizar la temperatura de desnaturalización de cada producto de PCR (*melt curves*), con el objetivo de confirmar la presencia de un único producto, validando, de esta manera, la especificidad de los cebadores diseñados. Para ello se midió la emisión de fluorescencia de *SYBR Green* durante el aumento paulatino de temperatura de 60°C a 95°C. El equipo utilizado fue el termociclador *QuantStudio 3 (Applied Biosystems)*.

Para la cuantificación se determinó el ciclo en el que cada muestra superó un determinado umbral de fluorescencia (Ct) y la amplificación de los genes *Gapdh*,  *$\beta$ Actina* y *Eif1a* se utilizó como control interno para normalizar la cantidad de ADNc inicial entre las distintas muestras, calculando así la expresión de los genes estudiados ( $\Delta$ Ct). La expresión relativa de los transcritos se calculó refiriendo los valores obtenidos en presencia de tratamiento a los correspondientes a la condición basal o de no tratamientos ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

Las secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR para los genes estudiados se diseñaron a partir de los exones obtenidos de la base de datos *Ensembl* y el software *Primer3*, y todos los oligonucleótidos fueron diseñados con una temperatura de hibridación de 60°C y un tamaño de entre 18 y 25 nucleótidos. Las secuencias para el estudio de la expresión génica se recogen en la tabla M.3.

Tabla M.3: Listado de oligonucleótidos utilizados como cebadores en qPCR

Nombre del gen	Secuencia F	Secuencia R
<i>Il6</i>	TGCAAGAGACTTCCATCCAG	ATTCCACGATTTCCAGAG
<i>Wnt5a</i>	CTGGCAGGACTTTCTCAAGG	GTCTCTCGGCTGCCTATTTG
<i>p38<math>\alpha</math></i>	GCTTTTGATACAAAGACGGGGC	CAGACGCAACTCTCGGTAGG
<i>p38<math>\beta</math></i>	CTCCTTGGAAGAATGCTGGT	TTCCACTCCTCCAGCGTG
<i>p38<math>\gamma</math></i>	CAACAAGGTGGCCATCAAGA	CTCGTGGCGCATGTGTTT
<i>p38<math>\delta</math></i>	GTTTGAGATCTCTTTGTAGATGTGTTG	GGACCCTGAGGAGGAGACA
<i>Gapdh</i>	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGA
<i><math>\beta</math>-Actina</i>	TGTTACCAACTGGGACGACA	GGGGTGTGAAGGTCTCAAA
<i>Eif1a</i>	AATGTGCTTTGACGGTGTGA	TGATTTTGGCATGTTCTGGA

## 5. Modelo humano: células de bronquio humano

Para el estudio del papel de IL6 en la diferenciación del epitelio respiratorio de vertebrados se utilizaron células de bronquio humano. Dichas células procedían de biopsias de bronquio de donantes sanos y fueron obtenidas a través del Biobanco del Área de Salud de Badajoz (ref. B.0001437).

### 5.1 Obtención de las células progenitoras de bronquio humano

Las muestras de biopsias de bronquio humano fueron recibidas en PBS y lavadas dos veces con el mismo tampón. Una vez lavadas, se les retiró el PBS y se resuspendieron en medio Ham's F12 (*Gibco*, #11765-054) suplementado con Penicilina/Estreptomicina al 1% (v/v), al que se había añadido, además, pronasa (*Roche*, 10165921001) a una concentración de 1mg/ml, para disgregar el tejido y liberar las células progenitoras, ADNasa de páncreas bovino (*Sigma*, #DN25) a una concentración de 0,5mg/ml, para eliminar las hebras de ADN procedentes de las células muertas y el inhibidor de la quinasa Rho, Y-27632 (*StemCell*, #72304) a una concentración final de 10 $\mu$ M, para minimizar la apoptosis celular. Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C y en

rotación en dicho medio y, transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 1000xg durante 5 minutos. Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en el medio de expansión de células respiratorias, *PneumaCult ExPlus Basal Medium* (StemCell, #05041), previamente suplementado con *PneumaCult ExPlus 50x supplement* (al 2%, v/v, StemCell #05042), hidrocortisona a una concentración final de 0,2µM (StemCell, #07925), P/S al 1% (v/v), inhibidor de apoptosis Y-27632 a una concentración de 10µM, y con los inhibidores de la ruta de TGFβ/SMAD, DMH-1 (Tocris, #4126) y A83-01 (Tocris, #2939), ambos a una concentración de 1µM, para inhibir la diferenciación de las células basales y promover su proliferación. A continuación, la suspensión celular se dividió y sembró en 2 placas de 60mm (Falcon, #353004) previamente tratadas durante al menos 4h con una solución de colágeno a 50µg/ml (Gibco, #A10483-01) preparada en ácido acético 0,02N (Fluka, #34254). Una vez sembradas en las placas de cultivo, se dejó que las células se adhirieran durante toda la noche, manteniéndolas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y, al día siguiente, se les realizó un lavado con PBS para retirar las células muertas y se añadió medio fresco (*PneumaCult ExPlus* completo suplementado con los inhibidores antes mencionados) a las placas. En este momento, se consideró que las células basales se encontraban en fase 0. El medio fue renovado cada dos días y las células se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

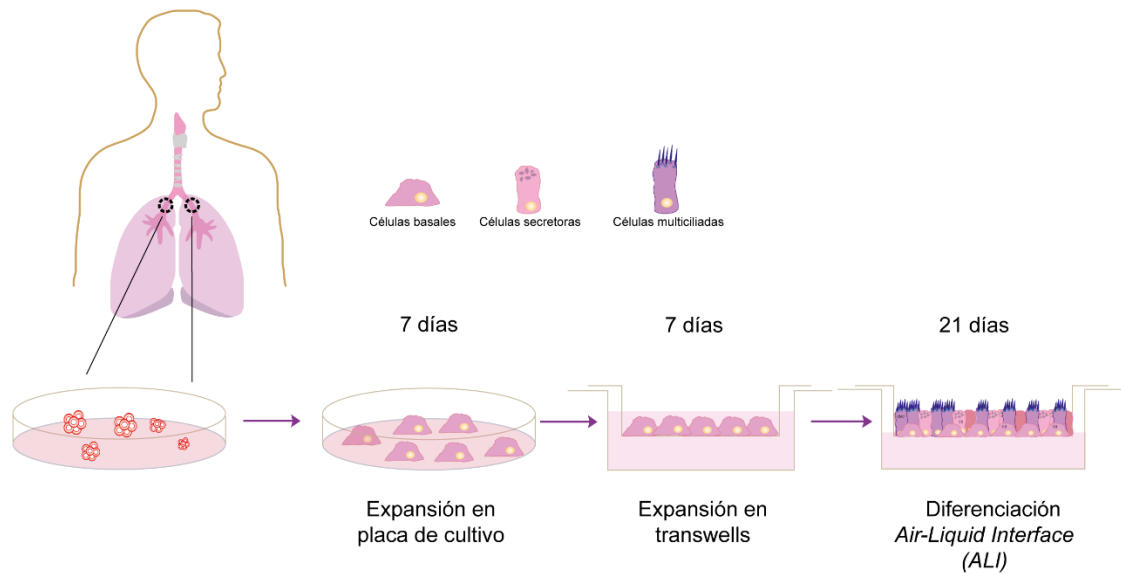
## **5.2 Cultivo primario de células de bronquio humano. Expansión y diferenciación**

Una vez que el cultivo celular en fase 0 alcanzó un 70-80% de confluencia en la placa (aproximadamente 6-7 días), las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 10-15 minutos a 37°C con PBS-EDTA (0,02%, p/v, Fisher, #010700153) para favorecer la separación de las uniones célula-célula. Transcurrido este tiempo, se retiró el PBS-EDTA y se añadió acutasa (Corning, #25-058-CI), que se incubó a temperatura ambiente hasta que las células se despegaron de la placa, obteniéndose una suspensión celular. A continuación, se añadió medio *PneumaCult Explus* completo a la suspensión y se centrifugó a 1000xg durante 5 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio *PneumaCult Explus* completo suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis, quedando así el cultivo preparado para la realización de los distintos experimentos.

Para promover la diferenciación del epitelio pseudoestratificado a partir de las células progenitoras de las vías respiratorias se utilizó el sistema de cultivo ALI (*Air-Liquid Interface*), mediante el cual las células se sembraron sobre membranas porosas fijadas a unos soportes de plástico en forma de cestos insertados en los pocillos de una placa de cultivo multipocillo. Estas membranas porosas, denominadas *transwells* (*Corning, #3460*), se trataron previamente con colágeno durante un tiempo mínimo de 4h y fueron después lavadas con PBS antes de añadir la suspensión celular. Al iniciar este sistema de cultivo, las células se sembraron sobre las membranas porosas, es decir, en el compartimento superior y en la cámara inferior se añadió *PneumaCult ExPlus* completo suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis hasta cubrir la base del soporte plástico. Las células se sembraron a una confluencia de  $8 \times 10^4$  células/*transwell*, y tras incubarlas toda la noche se cambió el medio de la cámara superior para retirar las células no adheridas. El medio de ambas cámaras fue renovado cada dos días hasta que las células tapizaron por completo la membrana porosa (aproximadamente 7 días).

Transcurrido ese tiempo, el medio de la cámara inferior fue sustituido por medio de diferenciación *PneumaCult-ALI Complete Base Medium* (*Stemcell, #05002*) suplementado con *PneumaCult-ALI 10X Supplement* al 10% (v/v, *Stemcell, #05003*), heparina a una concentración de  $3,46 \mu\text{M}$  (*Stemcell, #07980*), *PneumaCult-ALI Maintenance Supplement* al 1% (v/v, *Stemcell, #05006*) e hidrocortisona a una concentración de  $1 \mu\text{M}$ . En el espacio superior el medio de cultivo fue retirado para simular así la organización del tejido en las vías respiratorias, donde las células están en contacto con el aire en su cara apical y con la lámina basal del epitelio en su región más basal. Este sistema de cultivo se esquematiza en la figura M.1. El cultivo en medio *PneumaCult-ALI* completo se mantuvo durante 21 días, tiempo en el que las células progenitoras completaron la diferenciación del epitelio pseudoestratificado. Durante este proceso, el medio inferior se renovó cada 2 días, lavando antes de cada cambio de medio con PBS, incubando 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y retirándolo después, para eliminar el moco producido por las células durante su diferenciación (dichos lavados resultan muy

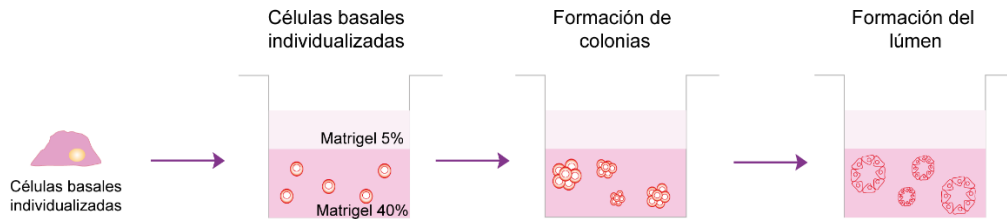
importantes para que las células sean accesibles a los anticuerpos en los ensayos de inmunofluorescencia).



**Figura M.1: Representación esquemática del sistema de cultivo y diferenciación de las células basales procedentes de bronquio humano.**

### 5.3 Organoides de células de bronquio humano

Para generar cultivos 3D a partir de células de bronquio humano, las células se expandieron hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Antes de resuspender e individualizar las células, se preparó una mezcla de matrigel (*Corning, #354230*) al 40% en medio de diferenciación *PneumaCult-ALI* completo en frío y se dispensó en los pocillos necesarios para realizar el experimento. Se utilizaron placas de 24 pocillos y se añadió 500  $\mu$ l de la mezcla de matrigel y medio *PneumaCult-ALI* completo, incubando durante 15 minutos a 37°C para permitir su solidificación. Transcurrido el tiempo de incubación, se preparó una suspensión celular de 3000 células en 500  $\mu$ l de medio *PneumaCult-ALI* y matrigel al 5% para cada uno de los pocillos utilizados y se dispensó en ellos sobre la mezcla de medio *PneumaCult-ALI* y matrigel al 40% ya solidificada. El medio superior se renovó cada 2 días y los organoides se cultivaron durante 21 días. Para la adquisición de las imágenes de los organoides en los distintos días de crecimiento se utilizó el sistema *EVOS Fluid Cell Imaging Station (Invitrogen)*.



**Figura M.2: Representación esquemática del sistema de cultivo de organoides de las vías respiratorias humanas.**

## **6. Inmortalización celular: generación de una línea estable de células del Sistema Respiratorio Humano**

Para la generación de una línea estable inmortalizada a partir de las células procedentes de biopsias de bronquio humano, se generaron partículas lentivirales que se utilizaron para dirigir la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) en las células infectadas.

### **6.1 Producción de partículas lentivirales**

El empaquetamiento de las partículas lentivirales se llevó a cabo en células HEK293T, cedidas por el laboratorio del doctor Miguel Fidalgo, que se mantuvieron en medio DMEM completo. Un día antes de realizar la transfección de los vectores lentivirales, se sembraron  $9 \times 10^6$  células en placas de cultivo de 150mm (*Falcon*, #353025) y se dejaron crecer durante toda la noche hasta alcanzar una confluencia del 70%.

Para la generación de los lentivirus se utilizaron tres construcciones: el vector pLV-hTERT-IRES-hygro (*Addgene*, #85140), necesario para la producción de la subunidad catalítica de la telomerasa humana, el vector pMD2.G (*Addgene*, #12259), que codifica para proteínas que conforman la envoltura vírica (VSV-G) y el vector psPAX2 (*Addgene*, #12260), que contiene la información para generar proteínas lentivirales implicadas en el empaquetamiento de los lentivirus (Gag-Pol-Rev).

Una vez las células HEK293T alcanzaron la confluencia deseada, se les cambió el medio DMEM y se cotransfectaron con las tres construcciones ya mencionadas,

utilizando el método de la polietilenimina (PEI; *Sigma*, #919012). Para ello se preparó, por un lado, una mezcla de los vectores lentivirales en NaCl 150mM. Se añadieron 20µg tanto del vector de empaquetamiento como del de envoltura y 40µg del vector pLV-hTERT a un volumen final de 1,6ml de NaCl 150mM. Por otro lado, en otro tubo con el mismo volumen de NaCl se añadieron 16µl de PEI 5x. Tras homogeneizar muy bien por separado, esta última solución con PEI se añadió a la solución con el ADN lentiviral, incubándose la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadió sobre las células gota a gota y estas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante toda la noche.

Tras 24 horas de incubación, el medio de cultivo de las células HEK293T se reemplazó por medio fresco y, tras otras 24 horas (es decir, 48 horas desde el momento de la transfección) el medio fue colectado. Se centrifugó durante 5 minutos a 4500xg y 4°C para precipitar posibles restos celulares y el sobrenadante con las partículas víricas se concentró mediante centrifugación en filtros *Amicon Ultra 100KDa* (*Merk*, #UFC910096) durante 30min a 4500xg y 4°C. Los concentrados de lentivirus se alicuotaron en volúmenes pequeños (75µl) para evitar ciclos de descongelación-recongelación. Este proceso se llevó a cabo otra vez al día siguiente (72h después de la transfección), obteniendo así concentrados de lentivirus listos para infectar en los cultivos de interés.

La titulación de las partículas lentivirales se realizó utilizando el kit *UltraRapid Lentiviral Global Titer Kit* (*SBI*, #LV961A-1), que se basa en la extracción de ARN de células infectadas para evaluar, mediante qPCR, la proporción de células infectadas a través del análisis de secuencias específicas de la construcción que se integran en el ADN celular. El título de partículas lentivirales en los concentrados se estableció en, aproximadamente, 1x10<sup>6</sup> partículas infectivas/ml.

## **6.2 Transducción con lentivirus y selección de los cultivos celulares**

Las partículas víricas producidas se utilizaron para la generación de líneas celulares estables a partir de cultivos primarios de bronquio humano. Se emplearon,



concretamente, células procedentes de dos individuos que, en adelante en esta tesis pasarán a denominarse muestra BRO001 y muestra BRO002. Dichas células se expandieron en dos placas de 60mm como se describe en el apartado 5.2 de esta sección y, una vez crecidas, se levantaron de las placas, se resuspendieron en medio fresco y se contaron, preparando una suspensión de 25000 células en 100µl de medio *PneumaCult ExPlus* completo. El volumen total de concentrado lentiviral añadido a cada una de las suspensiones celulares fue de 75µl. En base al título de partículas lentivirales y al número de células (partículas víricas / células infectadas), se puede calcular un factor conocido como multiplicidad de la infección (MOI):  $0.075\text{ml de concentrado} \times 10^6 \text{ partículas víricas/ml} = 75000 \text{ partículas víricas añadidas a las } 25000 \text{ células (MOI = 3)}$ .

Para incrementar la eficiencia de la infección, se añadió, además, polibrene (*Sigma, #TR-1003*) a una concentración final de 8µg/ml, un polímero catiónico que actúa neutralizando la repulsión de cargas entre el virus y la membrana plasmática de las células, favoreciendo su adhesión. Una vez añadido el polibrene, las mezclas fueron homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras la incubación, se centrifugaron durante 5 minutos a 1000xg para incrementar la interacción célula-virus y las células se resuspendieron en el mismo medio, añadiendo 2,5ml de medio *PneumaCult ExPlus* completo con polibrene. Por último, se sembraron en dos placas de 60mm previamente tratadas con colágeno como se describió anteriormente.

Transcurridas 16-18 horas desde la infección, el medio fue renovado y las células se incubaron toda la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, se procedió a seleccionar las células que habían sido infectadas y para ello se utilizó higromicina (*Merck, #H3274*) a una concentración de 150 µg/ml. La selección se mantuvo durante 96 horas y a continuación el medio se reemplazó por medio *PneumaCult ExPlus* completo sin selección. Los cultivos celulares se mantuvieron, renovando el medio cada dos días, hasta que las células seleccionadas alcanzaron una confluencia del 70-80%.

### **6.3 Obtención de clones aislados a partir de las células seleccionadas**

Para el aislamiento de clones se empleó la técnica de la dilución límite con el objetivo de obtener colonias discretas procedentes de una única célula inicial. Se utilizaron para ello dos placas de 96 pocillos para la muestra BRO001 y dos para la muestra BRO002 (previamente tratadas con colágeno) y se confirmó el origen clonal de cada colonia en cada uno de los pocillos, mediante su observación al microscopio a lo largo de su formación.

Las células se levantaron y se resuspendieron en medio *PneumaCult Explus* para contarlas. A continuación, se realizaron varias diluciones seriadas hasta obtener, para cada una de las muestras, una suspensión de 192 células en 19,2 ml de medio *PneumaCult ExPlus* completo al que se añadió, además, los inhibidores de apoptosis y diferenciación ya mencionados en el apartado 5.1 de esta sección. Se homogeneizaron muy bien las mezclas y se dispensaron 100µl en cada uno de los pocillos con el fin de sembrar una única célula en cada uno de ellos.

Transcurridas 24 horas desde la siembra se procedió a identificar aquellos pocillos en los que únicamente había una célula mediante su observación en el microscopio de contraste de fases. Tras su identificación se les renovó el medio cada dos días, durante 15 días, incubándolos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células aisladas se observaron al microscopio en cada cambio de medio para controlar su crecimiento y, transcurrido este tiempo, se seleccionaron aquellos clones que habían conseguido generar colonias discretas. Con el objetivo de conseguir un mayor número de células con las que realizar futuros experimentos, cuando los clones individualizados alcanzaron un 70% de confluencia se disgregaron y se sembraron, en primer lugar, en placas de 12 pocillos y finalmente en placas de 60mm para ser congelados.

## **7. Tratamientos en los cultivos celulares de bronquio humano**

Los reactivos químicos empleados se prepararon siguiendo las indicaciones de cada fabricante. En el caso de los cultivos controles, éstos fueron incubados con los

volúmenes correspondientes del solvente. A continuación, se detallan los reactivos utilizados en los cultivos de células de bronquio humano:

- **IL6** (*Gibco, #PHC0065*): Se utilizó durante la diferenciación de los cultivos de células de bronquio humano. Disuelta en ácido acético 0,1M se utilizó a una concentración de 10ng/ml.
- **DAPT** (*Tocris, #2634*): Es un potente inhibidor de la ruta de señalización Notch y actúa a través del bloqueo de la  $\gamma$ -secretasa, que transduce la señal de esta ruta desde el receptor Notch I. Se empleó durante la diferenciación de los cultivos de células de bronquio humano. Disuelto en DMSO se utilizó a una concentración de 50 $\mu$ M.

## 8. Inmunofluorescencia en células de las vías respiratorias

La localización subcelular de las proteínas estudiadas en este trabajo de tesis fue analizada mediante inmunofluorescencia (IF). Esta técnica se llevó a cabo en cultivos de células de bronquio humano sembradas sobre *transwells*.

Para realizar los marcajes, las muestras se lavaron en primer lugar con PBS  $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$  para preservar las uniones célula-célula. A continuación, las células se fijaron utilizando dos técnicas diferentes en función de la proteína objeto de estudio: con paraformaldehído (PFA; *Polysciences, #18814-20*) al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente o con metanol frío durante 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En ambos casos, tras la incubación con el fijador, las muestras se lavaron dos veces con PBS con Tritón al 0,1% (v/v; PBS-t) durante 10 minutos. Tras los lavados, las membranas porosas sobre las que habían crecido las células se separaron de los soportes con ayuda de un bisturí y se colocaron en una cámara húmeda en oscuridad. Seguidamente, las muestras se incubaron con PBS con Tritón al 0,1% y albúmina de suero bovino al 2% (p/v, BSA; *Roche, #10735094001*) (PBS-t-BSA) durante 45 minutos para permeabilizar las membranas celulares y favorecer que los anticuerpos primarios interaccionaran con sus epítomos y, además, bloquear las posibles uniones inespecíficas de estos anticuerpos primarios.

Después de este tiempo, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios recogidos en la tabla M.4, preparados en PBS-t-BSA al 2%.

Tabla M.4: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Dilución	Fuente	Casa Comercial
<b>Anti-P63</b>	1:200	Conejo	<i>Abcam, #2524s</i>
<b>Anti-FOXJ1</b>	1:200	Ratón	<i>Invitrogen, #14-9965-82</i>
<b>Anti-ACETIL TUBULINA</b>	1:100	Ratón	<i>Sigma, #6793</i>
<b>Anti-CENTRIOLINA</b>	1:200	Conejo	<i>Sigma, #HPA020468</i>
<b>Anti-CENEXINA</b>	1:200	Ratón	<i>Sigma, #SAB1402295</i>
<b>Anti-Y TUBULINA</b>	1:200	Ratón	<i>Sigma, #T6557</i>

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las muestras se lavaron seis veces con PBS-t durante 10 minutos y, a continuación, se incubaron durante 1 hora, a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (tabla M.5), preparados también en PBS-t-BSA al 2%.

En esta misma solución se preparó, cuando fue necesario, la faloidina fluorescente (Faloidina-Alexa 488 (1:500, *Invitrogen, #A12379*)); Faloidina-Alexa 594 (1:500, *Invitrogen, #A12381*), así como el marcaje de los núcleos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; *Sigma, #62248K*) a una concentración de 0,3µM. Transcurrida la hora de incubación con los anticuerpos secundarios, las muestras se lavaron con PBS-t durante 1 hora y, finalmente, se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio *Vectashield (Vector laboratories, #H1000)*, quedando listas para la adquisición de imágenes.

Tabla M.5: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia

Anticuerpo secundario	Dilución	Fuente	Casa Comercial
<b>Alexa-Fluor 594 Anti-Rabbit</b>	1:500	Cabra	<i>Invitrogen, #A11036</i>
<b>Alexa-Fluor 488 Anti-Rabbit</b>	1:500	Cabra	<i>Invitrogen, # A21206</i>

<b>Alexa-Fluor 594 Anti-Mouse</b>	1:500	Cabra	<i>Invitrogen, #A11031</i>
<b>Alexa-Fluor 488 Anti-Mouse</b>	1:500	Cabra	<i>Invitrogen, #A11001</i>

## 9. Adquisición y análisis de imágenes de microscopía

La adquisición de imágenes de IF se llevó a cabo en la Unidad de Microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura. Se utilizó el sistema de microscopía confocal *Olympus FV 1000*, y las imágenes fueron procesadas utilizando los softwares *ImageJ* y *Adobe Photoshop CC 2020*.

Las imágenes obtenidas de los cultivos de células de las vías respiratorias fueron procesadas para cuantificar las poblaciones celulares, para lo que se utilizó la señal procedente del marcaje con anticuerpos específicos de cada tipo celular. Las áreas para cuantificar fueron definidas a partir de las imágenes obtenidas con el objetivo 40X del microscopio *Olympus FV 1000*, con un zoom 2x y una resolución de 1024x1024. Las imágenes se separaron por canales y se utilizó el software *ImageJ*. Para la cuantificación del número total de células se empleó la señal procedente del marcaje de los núcleos celulares con DAPI.

## 10. Ensayo de *Doubling Time*

La capacidad de proliferación celular de los cultivos de bronquio humano bajo las diferentes condiciones experimentales fue evaluada mediante el análisis del tiempo en el cual el número de células iniciales se duplicó, conocido como *doubling time*. Para ello, se plaqueó un número constante de células de  $8 \times 10^3$  en placas multipocillo de 12 pocillos (*Corning, #3513*) y se incubó hasta que los cultivos alcanzaron una confluencia del 70-80%, teniendo en cuenta las horas transcurridas desde la siembra. Tras esto, las células fueron despegadas y contadas para plaquear de nuevo el mismo número de células en el siguiente pase. Se utilizó la ecuación  $Td = \frac{(t_2 - t_1) \ln(2)}{\ln c_2 - \ln c_1}$ , donde Td sería el tiempo de duplicación,  $t_2 - t_1$  representa el tiempo transcurrido entre la siembra y la recolección de las células,  $c_1$  es el número de células plaqueadas y  $c_2$  es el número de

células totales recolectadas del pocillo. El cultivo se mantuvo durante 6 pases y las condiciones experimentales se plaquearon por duplicado.

### **11. Medida de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER)**

Las células epiteliales de las vías respiratorias se sembraron en los *transwells* según se ha descrito anteriormente. Transcurridas 24h desde la siembra y, a lo largo del proceso de diferenciación, la resistencia transepitelial (*Transepithelial Electrical Resistance, TEER*) se midió utilizando el equipo *EVOM3* (*World Precision Instruments*). Para ello se retiró el medio *PneumaCult-ALI* del compartimento inferior y se añadió medio DMEM suplementado con FBS al 10%, además de Glutamina 2mM y P/S al 1%, en ambas cámaras del pocillo *transwell*. Como blanco se utilizó un *transwell* con medio de cultivo sin células. Los valores obtenidos fueron expresados en las unidades internacionales KOhm/cm<sup>2</sup>.

### **12. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Mediante microscopía electrónica de barrido se estudió la morfología, distribución y abundancia de los cilios en las células multiciliadas. Para ello se diferenciaron cultivos de células progenitoras de bronquio humano y, una vez diferenciados, los *transwells* se lavaron con PBS Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup>, manteniéndolos en sus soportes plásticos dentro de la placa multipocillo. Las células se fijaron con una solución de cacodilato sódico 0,1M (*Sigma, #C0250*) con glutaraldehído (al 2,5% v/v, *Sigma, #G5882*) durante 90 minutos a 4°C. Una vez fijadas, se realizaron tres lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con cacodilato sódico 0,1M y, a continuación, se incubaron durante 2 horas a 4°C en una solución de cacodilato sódico 0,1M con tetraóxido de osmio (al 1% v/v, *Sigma, #75632*). Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el exceso de tetraóxido de osmio mediante otros tres lavados de 5 minutos con cacodilato sódico 0,1M a temperatura ambiente, y seguidamente se procedió a la deshidratación de las muestras con incubaciones de 30 minutos a 4°C en concentraciones de etanol crecientes, desde el 10% hasta el 100% (v/v).

Una vez deshidratadas las muestras, las membranas porosas de los *transwell* se separaron de los soportes plásticos y el resto de su procesamiento se llevó a cabo en el Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies de la Universidad de Extremadura. El etanol en el que se encontraban los filtros *transwells* se sustituyó progresivamente por CO<sub>2</sub> y éste fue retirado mediante la técnica del punto crítico para secar por completo las muestras. A continuación, se recubrieron de oro mediante pulverización catódica o *sputtering* quedando listas para su visualización en el equipo *Quanta 3D FEG (FEI Company)*. Las imágenes obtenidas se procesaron con el *software Adobe Photoshop CC 2020*.

### **13. Medida del batido de los cilios**

Para medir la frecuencia del batido de los cilios de las células multiciliadas, los cultivos se diferenciaron hasta ALI 21, momento en el cual la cámara superior de los *transwells* fue lavada con PBS Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup> a 37°C para eliminar el moco secretado por las células. Tras incubar durante 10 minutos, el PBS fue retirado y sustituido por una suspensión que contenía 5µl de bolas magnéticas (*Dynabeads Streptavidin C1, Invitrogen, #65001*) en 300µl de PBS Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup>, suspensión que fue incubada durante otros 10 minutos para permitir la decantación de las bolas magnéticas sobre las células. Posteriormente se retiró el volumen de la cámara superior y se dejó que las bolas magnéticas se fijasen a las células mediante una incubación de 90 minutos a 37°C. En el momento de adquirir las grabaciones, se añadieron 100µl de PBS Ca<sup>+2</sup>/Mg<sup>+2</sup> sobre los *transwells* y éstos se colocaron en el microscopio invertido *Motic AE20*. Las grabaciones fueron adquiridas con la cámara de un *iPhone XS (Apple Inc.)* a 240 fps y analizadas con el software *MATLAB* a través de una aplicación desarrollada en nuestro laboratorio para seguir el movimiento de las bolas magnéticas en las películas adquiridas.

### **14. Análisis estadístico**

Todos los experimentos descritos en esta tesis se realizaron empleando, al menos, dos réplicas biológicas con al menos cuatro réplicas experimentales de cada condición. Los datos representados se muestran como media ± desviación estándar y se

han analizado mediante el test *T de Student* para muestras no pareadas para comparaciones de dos grupos de datos, mientras que, para comparaciones de tres o más grupos, se utilizó un ANOVA unidireccional acoplado a un test de Bonferroni. La generación de gráficos y la significación estadística han sido obtenidas empleando el software *GraphPad Prism Software v7.00*.



# ***CAPÍTULO 1***

## ***Regulación de la expresión de IL6 en el tejido adiposo de ratón***



IL6 es una citoquina que resulta esencial en multitud de procesos biológicos, así como en la intercomunicación entre diferentes órganos y en el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos. Es producida por diversos tipos celulares y, dependiendo del contexto fisiológico, puede llevar a cabo funciones muy diferentes. En los últimos años su papel en el tejido adiposo ha suscitado gran interés dado su participación en el desarrollo de patologías como la obesidad o la resistencia a insulina. Sin embargo, a pesar de la elevada incidencia que tienen dichos desórdenes en la población y el importante rol que esta citoquina desempeña en este tejido, la complejidad de sus sistemas de señalización hace que los mecanismos moleculares que regulan su expresión estén aún poco esclarecidos.

En este primer capítulo de Tesis, mostramos que la expresión de IL6 en preadipocitos de ratón, al igual que ocurre en el tejido adiposo visceral humano, es parcialmente dependiente del ligando Wnt no canónico, WNT5a, y de la proteína JNK. Hemos estudiado, también, el papel de la familia p38MAPKs en la regulación de los niveles de expresión de la citoquina. Utilizando líneas inmortalizadas de preadipocitos que carecen de cada uno de los miembros de la familia p38MAPKs hemos demostrado que la expresión de IL6 depende, principalmente, de p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . De hecho, la falta de alguna de estas dos quinasas aumenta de manera exacerbada los niveles de IL6 en nuestro modelo. Observamos, además, que la señalización MEK/ERK tendría un papel destacado en la modulación de la producción de la citoquina. Así mismo, mostramos que la ausencia de p38 $\delta$  podría promover una mayor fosforilación de ERK1/2 de manera independiente a su activador canónico MEK1/2.



## **OBJETIVOS I**



## OBJETIVOS I

---

De entre las más de 600 adipoquinas secretadas por el tejido adiposo, IL6 ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la multitud de funciones biológicas que desempeña en este tejido, así como por su contribución a la aparición de patologías como la resistencia a insulina o la obesidad. De este modo, el aumento del riesgo cardiometabólico asociado a esta última se ha relacionado, precisamente, con una sobreproducción de factores proinflamatorios en el tejido adiposo, entre los que destaca IL6, que contribuyen a establecer un estado inflamatorio sistémico de bajo grado responsable de la disfunción del propio tejido.

La prevalencia de estas patologías en la población mundial se ha incrementado dramáticamente en los últimos años, llegando a alcanzar incluso una proporción epidémica. Sin embargo, pese a su incidencia y, debido a su carácter multifactorial, los mecanismos moleculares implicados en sus orígenes y desarrollos continúan siendo en gran parte desconocidos.

Dado la importante función que el tejido adiposo ejerce como órgano endocrino, así como el papel destacado que IL6 desempeña tanto en el desarrollo de la obesidad y patologías asociadas, como en el mantenimiento de la homeostasis de este tejido, estudiar las rutas moleculares implicadas en la regulación de la expresión de esta citoquina en tejido adiposo resulta clave para comprender el origen de dichas patologías. Además, constituye un importante punto de partida en la búsqueda de dianas terapéuticas que nos permitan desarrollar terapias de prevención y tratamientos efectivos.

En base a esto, en este primer capítulo de tesis nos propusimos **profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la expresión de IL6 en el tejido adiposo**. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la participación del eje de señalización WNT5a/JNK en la modulación de la expresión de IL6 en el tejido adiposo de ratón.

2. Caracterizar el papel de las p38MAPKs en la regulación de los niveles de expresión de IL6 en el tejido adiposo de ratón.



# RESULTADOS I

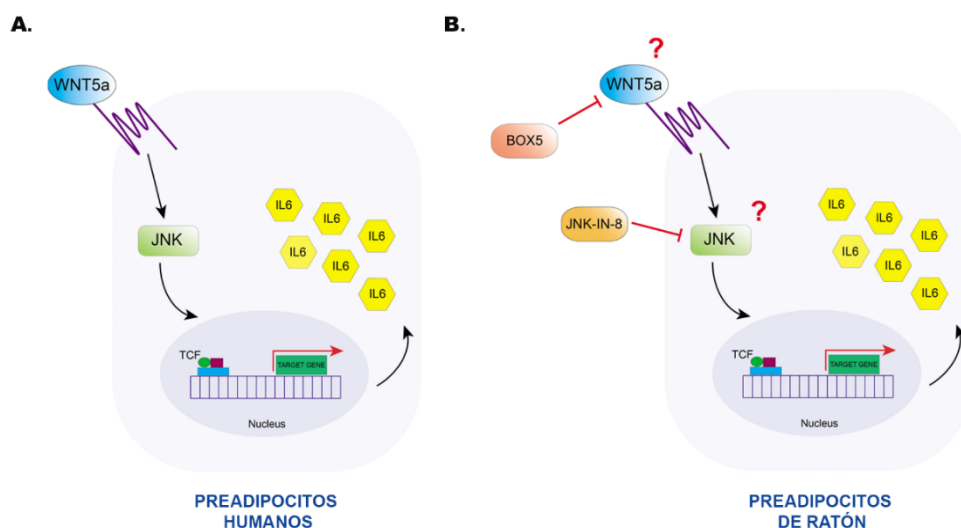


### 1. Wnt5a y JNK controlan la expresión de *Il6* en preadipocitos *Wt* de ratón

Como ya se ha comentado con anterioridad, conocer las vías de señalización implicadas en la regulación de la expresión de *Il6* en el tejido adiposo es de suma importancia dado el papel tan relevante que cumple en este tejido.

Resultados descritos en la bibliografía muestran mayores niveles de expresión de *Wnt5a* en adipocitos viscerales humanos, especialmente en individuos con obesidad, correlacionando dichos niveles con una mayor expresión de *Il6* en el tejido adiposo de estos individuos (Fuster et al., 2015; Zuriaga et al., 2017). Por otro lado, diversos trabajos señalan que JNK es la principal quinasa activada por la vía Wnt en mamíferos (Boutros et al., 1998; Gros et al., 2010). En este sentido, se ha visto que JNK desempeña un importante papel en la disfunción del tejido adiposo y las anomalías metabólicas asociadas en modelos animales de obesidad (Sabio et al., 2008; Han et al., 2013) (Figura RI.1A).

Sin embargo, a pesar de estos hallazgos, los mecanismos específicos que explican el aumento de la producción de *Il6* en el tejido adiposo siguen estando poco definidos. De esta manera, no se conoce en profundidad si la regulación que el eje de señalización *Wnt5a*/JNK ejerce sobre los niveles de expresión de *Il6* en el tejido adiposo humano es un mecanismo extendido a adipocitos de otras especies, incluido el ratón que es utilizado como modelo en muchos estudios sobre síndrome metabólico, obesidad y patologías asociadas (Figura RI.1B).



**Figura RI.1: Esquema de la participación del eje de señalización WNT5a/JNK en la expresión de *Il6*.**  
(A) Modelo de la regulación de la expresión de *Il6* propuesto para el tejido adiposo visceral humano versus posible esquema de la implicación de WNT5a y JNK en la regulación de la expresión de dicha citoquina en el tejido adiposo de ratón (B).

En base a esto nos propusimos analizar si esta vía de señalización estaba implicada en la modulación de la expresión de *Il6* en nuestro modelo experimental. En primer lugar, se comprobó si el bloqueo individual de la actividad biológica de ambas proteínas afectaba a los niveles de *Il6* en los cultivos de preadipocitos *Wt* de ratón. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de la citoquina mediante qPCR en los preadipocitos tras su tratamiento con un inhibidor de JNK y un antagonista de WNT5a (JNK-IN-8 y Box5, respectivamente, figura RI.1B), ambos altamente selectivos.

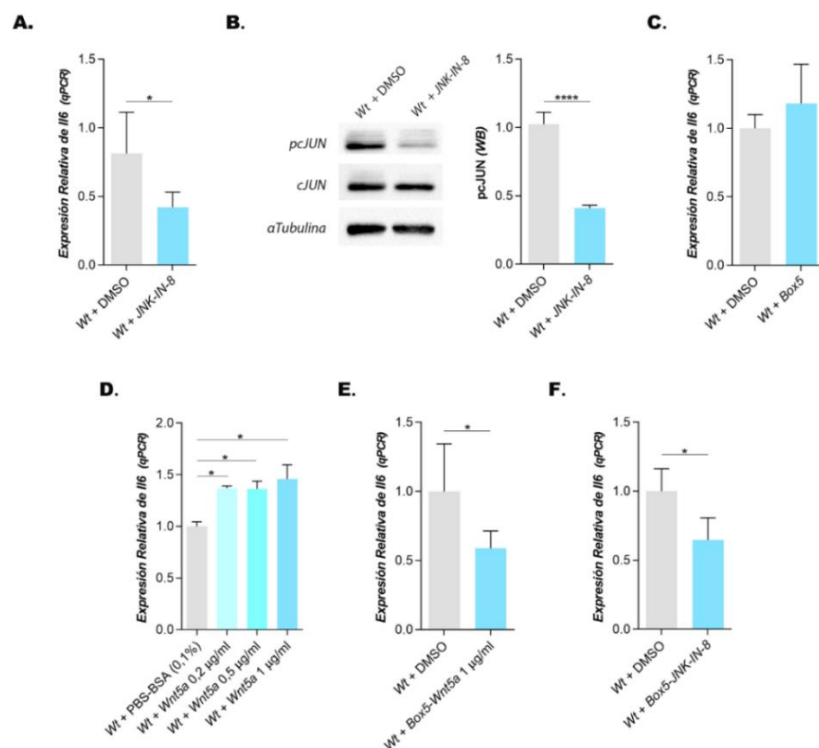
Como se muestra en el panel A de la figura RI.2, el tratamiento con el inhibidor de JNK, JNK-IN-8, disminuyó notablemente los niveles de expresión de *Il6* en comparación con las células no tratadas. El efecto del inhibidor sobre la actividad de JNK se evaluó mediante *western blot* analizando el estado de fosforilación de la proteína cJUN, un sustrato canónico de esta quinasa. Como se puede observar en el panel B de la figura RI.2, JNK-IN-8 fue eficiente bloqueando la fosforilación de cJUN. Estos resultados indicarían una posible relación entre la proteína JNK y los niveles de expresión de *Il6* en los preadipocitos de ratón, tal y como ha sido descrito en el tejido adiposo humano.

Por el contrario, el tratamiento con el antagonista de WNT5a, Box5, no alteró de forma significativa los niveles de ARNm de *Il6* (Figura RI.2C). En base a esto, nos preguntamos si realmente WNT5a participaba en la modulación de los niveles de la citoquina en los preadipocitos de ratón. Para resolver esta cuestión, se decidió tratar las células con varias concentraciones de proteína WNT5a recombinante. En este caso, la adición exógena de WNT5a sí dio lugar a un aumento significativo de los niveles de ARNm de *Il6* (Figura RI.2D). Con el objetivo de evaluar si este incremento en la expresión de *Il6* se debía, efectivamente, a WNT5a, se repitió el mismo experimento, pero pretratando las células con Box5 antes de la adición de dicha proteína al medio de cultivo. Como se observa en el panel E de la figura RI.2 los niveles de expresión de *Il6* descendieron significativamente en las células cotratadas. Estos resultados, por un lado,

sugirían que los niveles endógenos de WNT5a en los preadipocitos son insuficientes para inducir, por sí solos, la expresión de IL6; y, por otro lado, mostrarían una posible implicación de WNT5a en la regulación de los niveles de la citoquina en estos preadipocitos.

Para confirmar, definitivamente, la participación de WNT5a y JNK en la modulación de los niveles de IL6, se cotrató de manera simultánea preadipocitos *Wt* con Box5 y JNK-IN-8 (Figura RI.2F). Dicho tratamiento provocó un notable descenso en los niveles de ARNm de *Il6* en las células tratadas con respecto a las células control.

**Estos resultados demostrarían que la expresión de IL6 en preadipocitos de ratón es dependiente de WNT5a y, además, JNK también participa en la regulación de los niveles de la citoquina.**



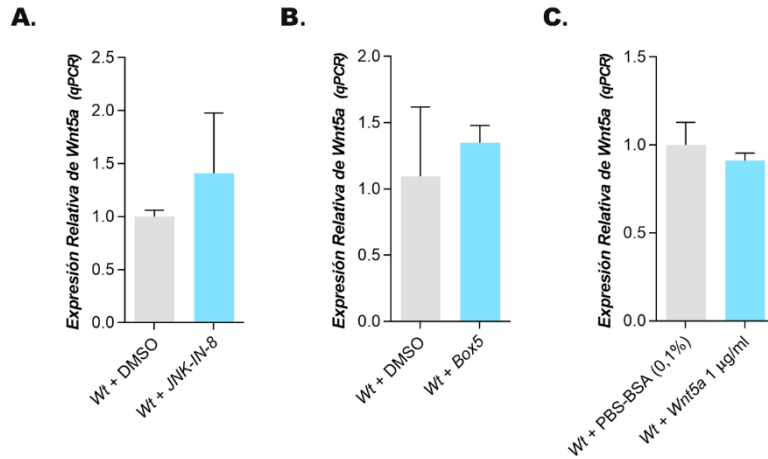
**Figura RI.2: Niveles de expresión de *Il6* en preadipocitos *Wt* de ratón.** (A) Efecto del tratamiento con JNK-IN-8 y DMSO (control) sobre la expresión de *Il6* en preadipocitos *Wt* (n=4). (B) *Western blot* de la proteína cJUN fosforilada (pcJUN) en preadipocitos *Wt* tratados con JNK-IN-8 y DMSO (control). Se utilizaron la proteína total cJUN y el control de carga  $\alpha$ Tubulina para la cuantificación de la proteína fosforilada (n=2). (C) Expresión relativa de *Il6* en preadipocitos *Wt* tratados con Box5 y DMSO (control) (n=4) o (D) tratados con diferentes concentraciones de proteína WNT5a recombinante y PBS-BSA al 0,1% (control) (n=3) o (E) cotratados con Box5/WNT5a recombinante y DMSO (control) (n=4) o (F) cotratados con Box5/JNK-IN-8 y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de ARNm. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \*p < 0,05; \*\*\*\* p < 0,0001.

Una vez confirmada la participación de WNT5a y JNK en la regulación de los niveles de IL6, se analizaron mediante qPCR los niveles de expresión de *Wnt5a* en estos mismos preadipocitos y bajo las mismas condiciones, con el objetivo de evaluar el efecto que tendría el bloqueo tanto de la actividad de JNK con su inhibidor JNK-IN-8, como de la propia proteína WNT5a con su antagonista Box5 sobre la expresión de esta última, y su posible relación con los cambios observados en los niveles de *Il6* en los preadipocitos tratados con estos mismos compuestos.

Por un lado, los niveles de ARNm de *Wnt5a* no se vieron afectados por el tratamiento con JNK-IN-8 (Figura RI.3A), lo que indicaría que el bloqueo de la actividad de JNK afecta directamente a la expresión de la citoquina (Figura RI.2A), sin alterar los niveles de transcritos de *Wnt5a*. Por otro lado, el tratamiento con Box5 (Figura RI.3B) tampoco alteró de manera significativa los niveles de ARNm de *Wnt5a*. Dado que Box5 es un compuesto que antagoniza la actividad biológica de la proteína por unión a su receptor de membrana, los resultados obtenidos estarían en consonancia con lo esperado, viéndose reflejado el efecto del compuesto, directamente, sobre la expresión de *Il6* en las células tratadas (Figura RI.2E).

Además, la adición exógena de proteína recombinante al medio de cultivo tampoco provocó cambios significativos en los niveles de ARNm de *Wnt5a* (Figura RI.3C), afectando a los niveles de expresión de la citoquina (Figura RI.2C).

**Estos resultados confirmarían que la regulación ejercida por WNT5A y JNK sobre IL6 tiene lugar directamente sobre sus niveles de expresión.**



**Figura RI.3: Expresión de *Wnt5a* en preadipocitos *Wt* de ratón.** (A) Niveles de ARNm de *Wnt5a* en preadipocitos *Wt* tratados con JNK-IN-8 y DMSO (control) (n=4), o (B) tratados con Box5 y DMSO (control) (n=4), o (C) tratados con *Wnt5a* recombinante y PBS-BSA al 0,1% (control) (n=2). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control.

## 2. p38MAPKs regulan los niveles de expresión de *Il6* en preadipocitos de ratón

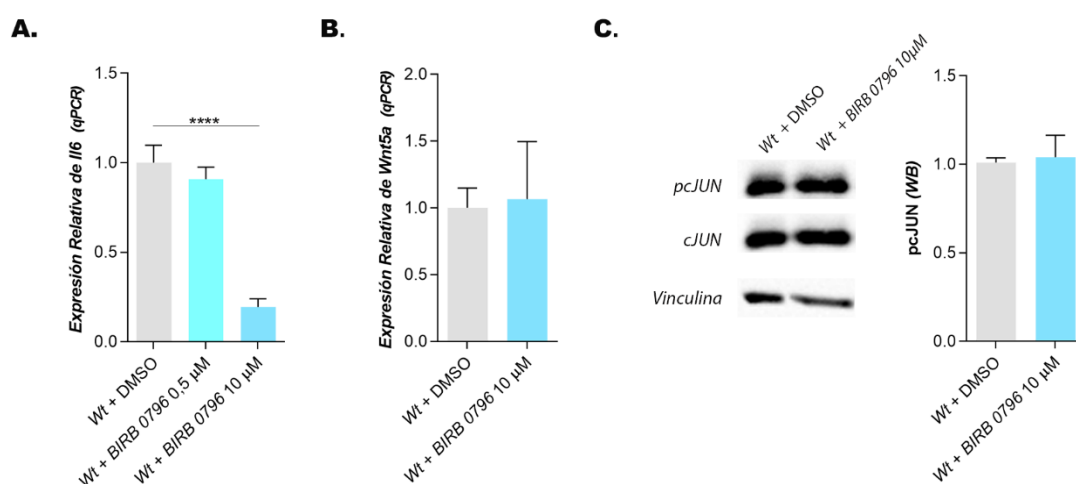
Además de la regulación ejercida por WNT5a/JNK sobre los niveles de expresión de *Il6*, diferentes estudios sitúan a las p38MAPKs como uno de los principales grupos de proteínas que modulan la producción de factores proinflamatorios en diversos tejidos, entre los que se encuentra la citoquina IL6 (Yong et al., 2009; Zur et al., 2015; Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017; García-Hernández et al., 2021).

Por esta razón, se decidió estudiar si estas proteínas podían estar implicadas en la expresión de *Il6* y *Wnt5a* en el tejido adiposo de ratón. Para ello se utilizó, en primer lugar, un inhibidor que impide que las diferentes isoformas de p38MAPK adquieran su conformación activa: BIRB 0796. Se emplearon dos concentraciones distintas de dicho inhibidor puesto que numerosas evidencias experimentales muestran que bajas concentraciones del compuesto (0,5µM) inhiben únicamente a las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que concentraciones elevadas del mismo (10 µM) afectan también a la actividad de las isoformas  $\gamma$  y  $\delta$  de la quinasa (Kuma et al., 2005). De esta manera se podría comenzar a discernir cuáles de ellas participan en la regulación de los niveles de *Il6*.

En el panel A de la figura RI.4 se puede observar que en los preadipocitos *Wt* de ratón, la expresión de *Ilf6* se redujo notablemente cuando los cuatro miembros de la familia p38 se inhibieron con BIRB 0796 (10 $\mu$ M), en cambio, dicha expresión no se vio alterada cuando solo fueron bloqueadas p38 $\alpha$  y  $\beta$  (0,5 $\mu$ M). En lo relativo a *Wnt5a*, la inhibición de los cuatro miembros de la familia p38 no produjo cambios significativos en sus niveles de expresión (Figura RI.4B).

Dado que se ha demostrado que BIRB 0796 a una concentración de 10 $\mu$ M también puede inhibir a JNK y no solo a las cuatro isoformas de p38 (Bain et al., 2007; Kuglstatter et al., 2010), se comprobó si JNK estaba siendo inhibida por BIRB 0796 en los preadipocitos tratados con el compuesto. Como se muestra en la figura RI.4C, la fosforilación de cJUN no se vio afectada por BIRB 0796. Por lo tanto, la disminución de la expresión de *Ilf6* observada en los preadipocitos *Wt* tratados con BIRB 0796 no estaba mediada por la inhibición de la proteína JNK por dicho compuesto.

**En base a los resultados observados, p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  podrían estar regulando la expresión de *Ilf6* en los preadipocitos de ratón.**



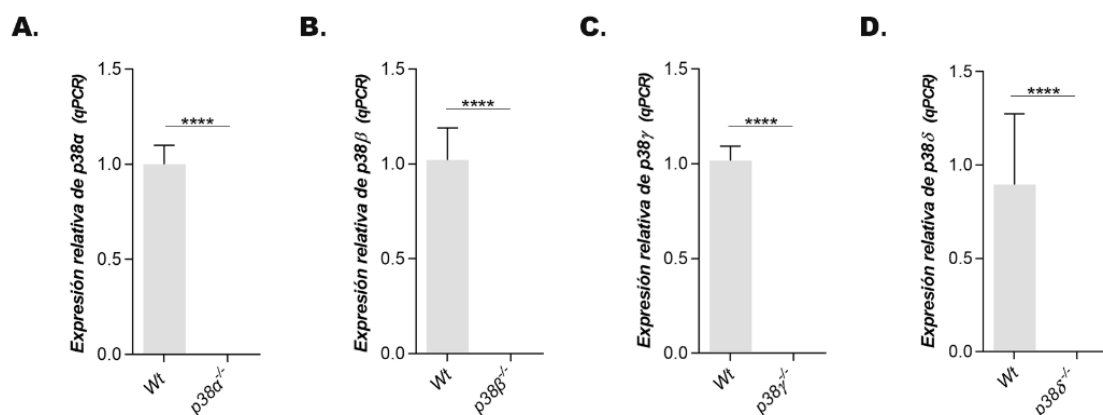
**Figura RI.4: Análisis de la expresión de *Ilf6* y *Wnt5a* y del estado de fosforilación de la proteína cJUN en preadipocitos *Wt* de ratón.** (A-B) Niveles de ARNm de *Ilf6* y *Wnt5a* analizados mediante qPCR en preadipocitos *Wt* tratados con BIRB 0796 y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. (C) Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína cJUN en preadipocitos *Wt* tratados con BIRB 0796 y sin tratar (control). Se utilizaron la proteína total cJUN y el control de carga vinculina para la cuantificación de la proteína fosforilada (n=4). Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \*\*\*\* p<0,0001.



Con el objetivo de discernir el papel que los distintos miembros de la familia p38 podrían ejercer en la regulación de la expresión de *Il6*, se utilizaron líneas celulares inmortalizadas de preadipocitos de ratón en las que se había apagado selectivamente la expresión de los genes individuales que codifican para cada una de las cuatro isoformas de p38MAPK: p38 $\alpha$  (*p38 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*), p38 $\beta$  (*p38 $\beta$ <sup>-/-</sup>*), p38 $\gamma$  (*p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>*) y p38 $\delta$  (*p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>*).

En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de las isoformas en los preadipocitos deficientes para ellas con la finalidad de comprobar el grado de silenciamiento génico. Como se puede observar en la figura RI.5 los niveles de expresión de las distintas isoformas se vieron notablemente reducidos en los preadipocitos *knockout* correspondientes, en comparación con los preadipocitos procedentes de ratones *Wt*.

Por otro lado, los datos obtenidos mediante qPCR reflejaron valores muy bajos en la expresión de las diferentes isoformas en los preadipocitos *Wt*, con ciclos promedios de aparición de 30 para p38 $\alpha$  y p38 $\beta$ . En el caso de las isoformas  $\gamma$  y  $\delta$  los niveles encontrados fueron particularmente bajos, con ciclos promedio de aparición de aproximadamente 40.



**Figura RI.5: Expresión de las distintas isoformas de p38MAPK en preadipocitos de ratón *Wt* y *knockout* carentes de p38 $\alpha$  (*p38 $\alpha$ <sup>-/-</sup>*), p38 $\beta$  (*p38 $\beta$ <sup>-/-</sup>*), p38 $\gamma$  (*p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>*) y p38 $\delta$  (*p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>*).** (A-D) Niveles de ARNm de las distintas isoformas de p38MAPK en preadipocitos *Wt* y *knockout* para cada una de ellas (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \*\*\*\* p < 0,0001.

Una vez validadas las líneas *knockout*, se analizó la expresión de *Il6* y *Wnt5a* en cada una de ellas. Al contrario de lo esperado, dado los resultados obtenidos tras el

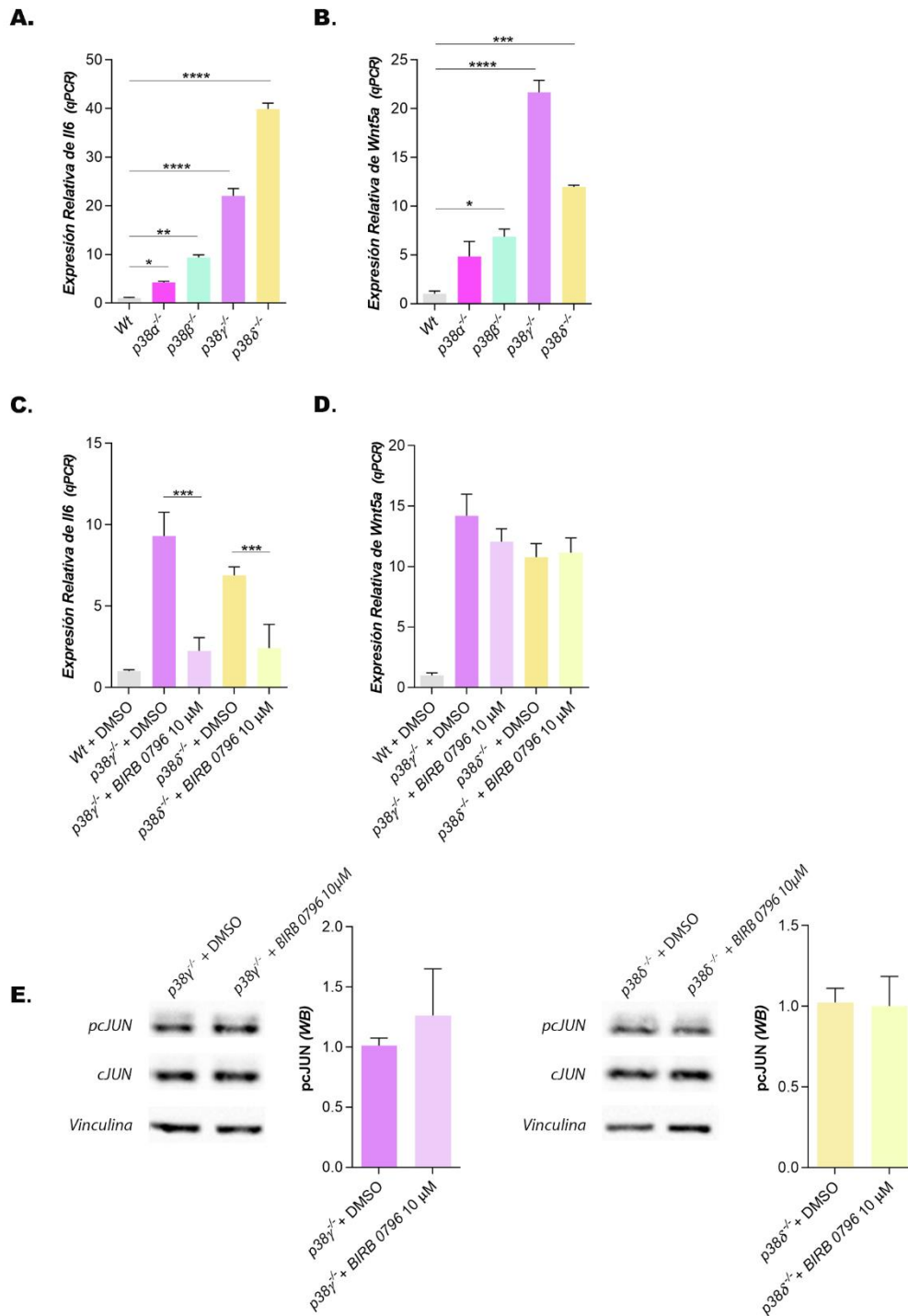
tratamiento con BIRB 0796, los niveles de ARNm de *Il6* fueron significativamente mayores en todos los preadipocitos *knockout*, especialmente en aquellos en los que estaban silenciadas las isoformas  $\gamma$  o  $\delta$  de p38 (Figura RI.6A).

Estos resultados, aparentemente contradictorios a los obtenidos con el uso de BIRB 0796, podrían deberse a que la inhibición farmacológica con el compuesto no fuera eficiente bloqueando la actividad biológica de las isoformas *p38 $\gamma$*  y *p38 $\delta$*  a la concentración utilizada, y el descenso observado en la expresión de IL6 se debiera, realmente, a la inhibición de otra proteína. De esta manera se vería un efecto completamente opuesto al obtenido con el silenciamiento génico de las distintas isoformas de p38, especialmente en las líneas carentes de *p38 $\gamma$*  y *p38 $\delta$* .

En lo relativo a *Wnt5a*, sus niveles de expresión también aumentaron significativamente en las línea *knockout* en comparación con las células *Wt* y más notablemente en los preadipocitos *p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>* y *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>*, coincidiendo con el patrón de expresión observado para *Il6* (Figura RI.6B).

El tratamiento con BIRB 0796 a una concentración de 10 $\mu$ M hizo que el aumento en la expresión de IL6 en los preadipocitos *p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>* o *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>* tratados, respecto a los niveles observados en las células *Wt*, no fuera tan acusado como en las células *p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>* o *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>* sin tratar (Figura RI.6C). Estos resultados apoyarían la hipótesis, ya mencionada, de la posible participación de otra proteína, inhibida por BIRB 0796, en la regulación de los niveles de IL6 en los preadipocitos de ratón. Por el contrario, la expresión de *Wnt5a* no se vio alterada por el tratamiento con BIRB 0796 en los preadipocitos *knockout*, en consonancia con los resultados obtenidos en las células *Wt* (Figura RI.6D). Dado que, probablemente BIRB 0796 estuviera inhibiendo a otra proteína diferente de las p38MAPKs, se comprobó si los efectos observados sobre la expresión de *Il6* en los preadipocitos *p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>* o *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>* tratados con BIRB 0796 se debían a cambios provocados por el inhibidor en la actividad de la proteína JNK. Al igual que ocurría con los preadipocitos *Wt*, el estado de fosforilación de cJUN, el sustrato canónico de JNK, no se vio afectado por el tratamiento con el compuesto (Figura RI.6E).

**Estos resultados sugerirían que la ausencia de *p38 $\gamma$*  o *p38 $\delta$*  incrementa los niveles de expresión de *Wnt5a* e *Il6* en los preadipocitos de ratón.**



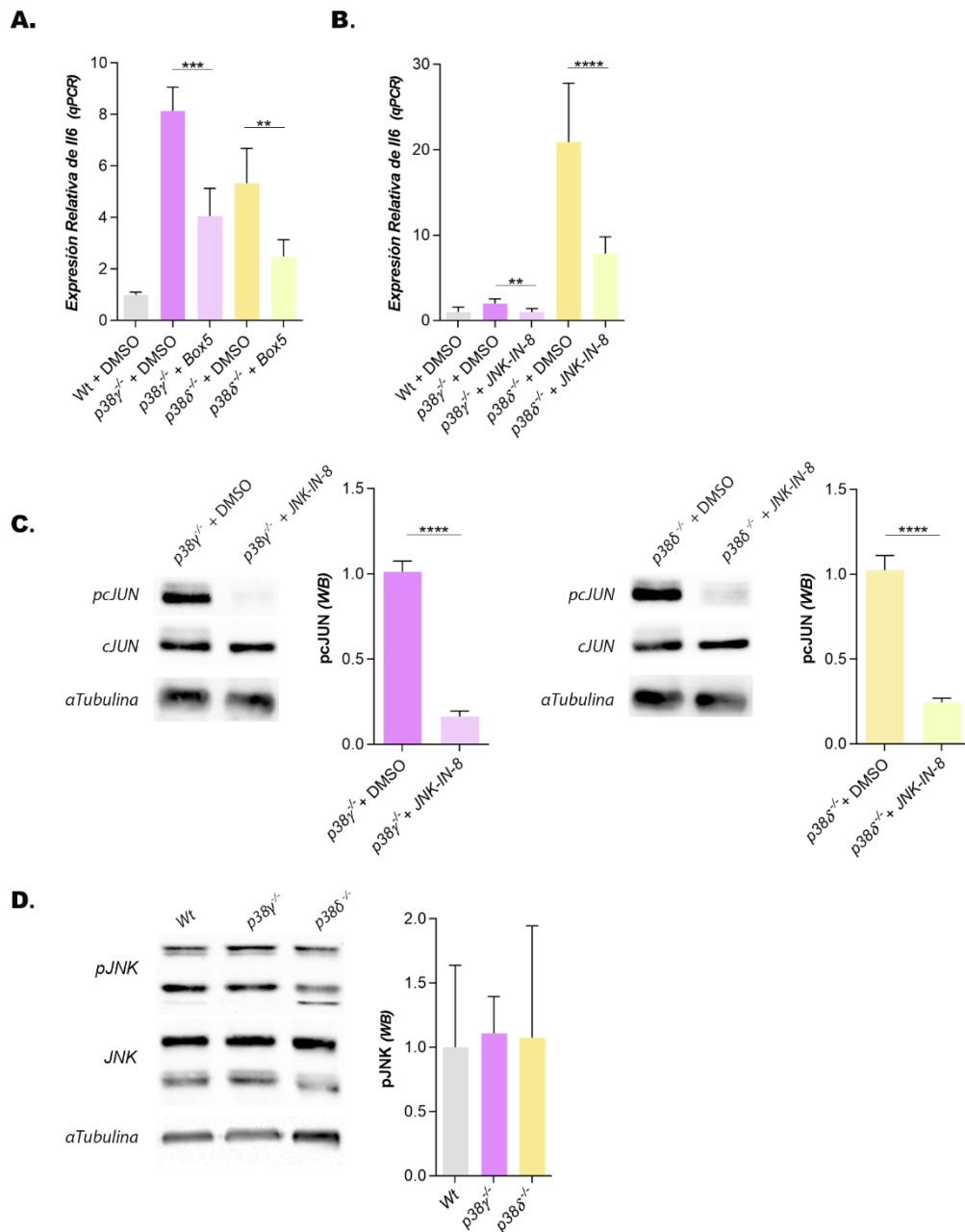
**Figura R1.6: Análisis de la expresión de *Il6* y *Wnt5a* y del estado de fosforilación de la proteína cJUN en preadipocitos *Wt* y *knockout* para las distintas isoformas de p38. (A-B) Niveles de ARNm de *Il6* y *Wnt5a* analizados mediante qPCR en preadipocitos *Wt* y *knockout* para las distintas isoformas de p38 (n=4). (C-D) Niveles de expresión de *Il6* y *Wnt5a* en preadipocitos *Wt* y *knockout* para las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$  de p38 tratados con BIRB 0796 y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. (E) Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína cJUN en preadipocitos *knockout* para las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$  de p38 tratados con BIRB 0796 y DMSO (control) (n=4). Se utilizaron la proteína total cJUN y el control de carga vinculina para la cuantificación de la proteína fosforilada (n=4). Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.**

Puesto que los niveles de *Il6* y *Wnt5a* correlacionaban en los preadipocitos *knockout* nos planteamos si el aumento de los niveles de ARNm de *Wnt5a* observado en estas células era el responsable de la inducción de la expresión de *Il6*. Para estudiar dicha correlación, preadipocitos *p38γ<sup>-/-</sup>* o *p38δ<sup>-/-</sup>* se trataron con el antagonista de WNT5a, Box5 (Figura R.I.7A). Dicho tratamiento redujo significativamente la expresión de la citoquina, lo que confirmaría que WNT5a estaría regulando los niveles de *Il6* en estos preadipocitos.

Como se comentó anteriormente, en los preadipocitos *Wt* la expresión de la citoquina sería dependiente de WNT5 y JNK; una vez demostrada la implicación de la primera de ellas en la modulación de los niveles de *Il6* en estas células *knockout* para *p38γ* y *p38δ*, nos preguntamos si JNK podría estar participando también en dicha regulación. Se decidió, por tanto, estudiar la expresión de la citoquina en preadipocitos *p38γ<sup>-/-</sup>* o *p38δ<sup>-/-</sup>* tratados con el inhibidor peptídico soluble de JNK ya mencionado (JNK-IN-8). Como se muestra en el panel B de la figura RI.7 los niveles de ARNm de *Il6* se redujeron significativamente con respecto a los controles no tratados. El efecto del inhibidor de JNK se evaluó analizando el estado de fosforilación de la proteína cJUN. Como se observa en la figura RI.7C, JNK-IN-8 fue eficiente en el bloqueo de la fosforilación del sustrato canónico de JNK.

Por otro lado, el análisis del estado de fosforilación de JNK en preadipocitos *Wt* y *p38γ<sup>-/-</sup>* o *p38δ<sup>-/-</sup>* no mostró diferencias significativas entre las líneas *knockout* y las células *Wt* (Figura RI.7D). Esto indicaría que, dado que el estado de activación de la proteína no varía en ausencia de *p38γ* o *p38δ*, los cambios ocasionados por dicha delección en la expresión de *Il6* no estarían mediados por JNK, aunque sí sería necesaria para la transcripción de *Il6*, ya que su bloqueo en estas células disminuye la expresión de la citoquina de manera significativa (Figura RI.7B).

**Por lo tanto, en base a los resultados observados, la falta de *p38γ* o *p38δ* aumentaría la expresión de *Wnt5a* en los preadipocitos de ratón, lo que a su vez podría promover una mayor expresión de *Il6*. Se trataría, por tanto, de un proceso mediado por la vía de señalización de p38 y, además, JNK sería necesaria para la transcripción de la citoquina.**

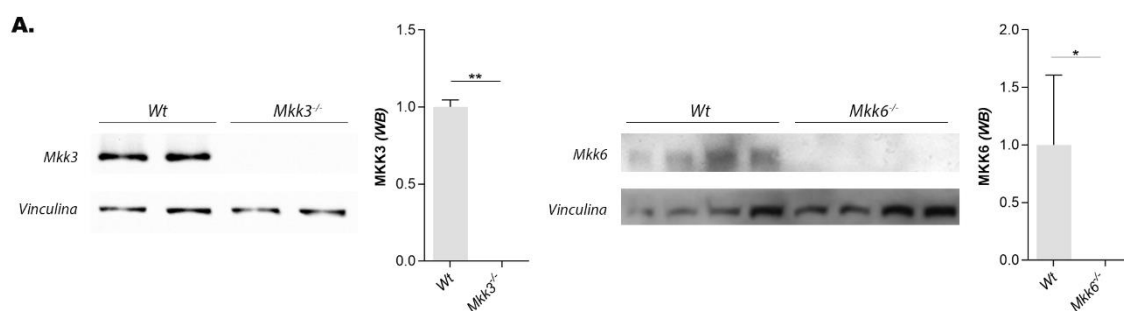


**Figura RI.7: Análisis de la expresión de *I/6* y del estado de fosforilación de las proteínas cJUN y JNK en preadipocitos *Wt* y *knockout* para las isoformas de p38  $\gamma$  y  $\delta$ .** (A) Niveles de ARNm de *I/6* analizados mediante qPCR en preadipocitos *Wt* y p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup> o p38 $\delta$ <sup>-/-</sup> tratados con Box5 y DMSO (control) (n=3) o (B) tratados con JNK-IN-8 y DMSO (control) (n=6). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. (C) Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína cJUN en preadipocitos *knockout* para las isoformas  $\gamma$  o  $\delta$  de p38 tratados con JNK-IN-8 y DMSO (control) (n=2). Se utilizaron la proteína total cJUN y el control de carga  $\alpha$ -Tubulina para la cuantificación de la proteína fosforilada. (D) Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína JNK en preadipocitos *Wt* y *knockout* para las isoformas  $\gamma$  o  $\delta$  de p38 (n=3). Se utilizaron la proteína total JNK y el control de carga  $\alpha$ -Tubulina para la cuantificación de la proteína fosforilada. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

Tras confirmar que las proteínas p38MAPKs, especialmente las isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , participaban en la regulación de los niveles de ARNm de *Wnt5a* e *Il6* en los preadipocitos de ratón, se comprobó si sus activadores canónicos podían estar también implicados en la modulación de los niveles de expresión de la citoquina en estas células.

Como ya se comentó en la introducción, MKK3 y MKK6 son activadores específicos de las proteínas p38MAPKs. MKK3 fosforila y activa principalmente a p38 $\delta$ , aunque p38 $\beta$  y p38 $\gamma$  también son sus dianas. MKK6 fosforila y activa indistinta y preferentemente a p38 $\gamma$  y a p38 $\beta$  (Manieri and Sabio, 2015; Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017). En base a esto se decidió estudiar la expresión de *Wnt5a* e *Il6* en líneas celulares inmortalizadas de preadipocitos de ratón carentes de las quinasas MKK3 (*Mkk3*<sup>-/-</sup>) y MKK6 (*Mkk6*<sup>-/-</sup>).

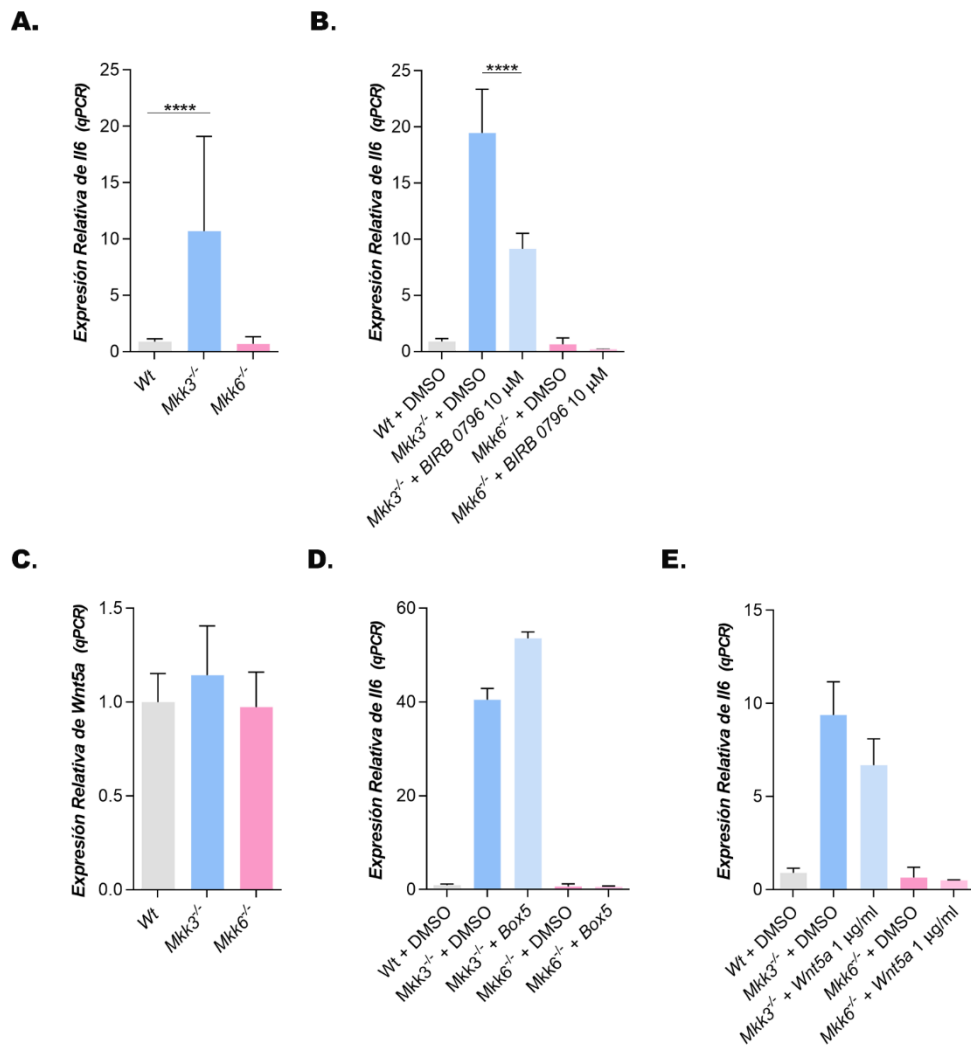
En primer lugar, se analizaron los niveles de proteína MKK3 y MKK6 en los preadipocitos *knockout* para dichas quinasas, con el objetivo de comprobar el grado de silenciamiento génico en estas líneas celulares.



**Figura RI.8: Niveles de proteína MKK3 y MKK6 en preadipocitos de ratón *Wt* y *knockout* para dichas quinasas (*Mkk3*<sup>-/-</sup> y *Mkk6*<sup>-/-</sup>).** Western blot y cuantificación de las proteínas MKK3 (n=2) (A) y MKK6 (n=4) (B) en preadipocitos *Wt* y *Mkk3*<sup>-/-</sup> y *Mkk6*<sup>-/-</sup>. En ambos casos, se utilizó la proteína vinculina como control de carga y las normalizaciones se hicieron relativas al cultivo control. \*p <0,05; \*\* p <0,01.

Tal y como se observa en la Figura RI.8 los niveles de proteína MKK3 y MKK6 fueron significativamente menores en los preadipocitos *knockout* correspondientes, en comparación con los preadipocitos procedentes de ratones *Wt*.

Una vez validadas las líneas *knockout*, se evaluó la expresión de *Il6* y *Wnt5a* en cada una de ellas.



**Figura RI.9: Análisis de la expresión de *I/6* y *Wnt5a* y del estado de fosforilación de la proteína cJUN en preadipocitos *Wt* y *Mkk3*<sup>-/-</sup> y *Mkk6*<sup>-/-</sup>.** (A) Niveles de ARNm de *I/6* analizados mediante qPCR en preadipocitos *Wt* y *knockout* para *Mkk3* o *Mkk6* (n=30). (B) Niveles de ARNm de *I/6* en preadipocitos *Wt* y *knockout* para *Mkk3* o *Mkk6* tratados con BIRB 0796 y DMSO (control) (n=4). (C) Niveles de expresión de *Wnt5a* en preadipocitos *Wt* y *MKK3*<sup>-/-</sup> y *MKK6*<sup>-/-</sup> (n=4). (D) Niveles de expresión de *I/6* en preadipocitos *Wt* y *knockout* para *Mkk3* o *Mkk6* tratados con Box5 y DMSO (control) (n=4) o (E) tratados con proteína WNT5a recombinante y PBS-BSA al 0,1% (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \*\*\*\* p <0,0001.

Como se muestra en el panel A de la figura RI.9, la expresión de *I/6* fue notablemente superior en las células carentes de *Mkk3* en comparación con las células *Wt*. Sin embargo, dicho incremento no se observó en los preadipocitos *Mkk6*<sup>-/-</sup>, en los cuales los niveles de *I/6* se mantuvieron similares a los encontrados en los preadipocitos *Wt*. Estos resultados indicarían que, al igual que las p38MAPKs, MKK3, a diferencia de MKK6, podría estar participando en la modulación de los niveles de *I/6* en los

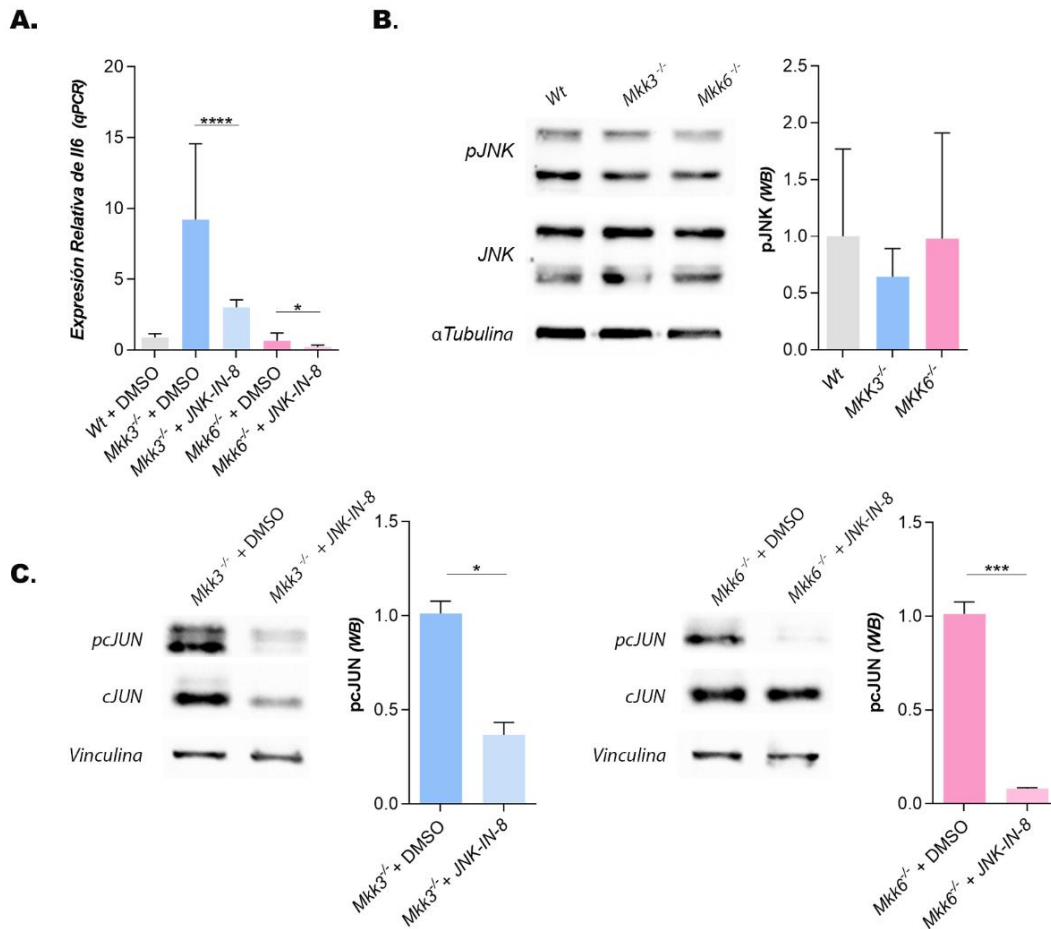
preadipocitos de ratón. Por otro lado, el tratamiento con BIRB 0796 disminuyó significativamente la expresión de *Il6* en los preadipocitos *Mkk3*<sup>-/-</sup>, pero no en los preadipocitos *Mkk6*<sup>-/-</sup> (Figura RI.9B).

Una vez estudiados los niveles de expresión de *Il6*, se comprobó si WNT5a y JNK participaban en la regulación de los niveles de ARNm de la citoquina en estas células. Para ello, en primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de *Wnt5a* en estos preadipocitos (Figura RI.9C). Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los preadipocitos *Wt* y *Mkk3*<sup>-/-</sup> y *Mkk6*<sup>-/-</sup>. Se decidió entonces, tratar dichas células con Box5 (Figura RI.9D) y proteína WNT5a recombinante (Figura RI.9E). Como se muestra en los paneles correspondientes, ninguno de los tratamientos provocó cambios significativos en los niveles de expresión de *Il6* en comparación con las células *Wt*. De esta manera, podría ocurrir que el aumento de la expresión de *Il6* observado en los preadipocitos *Mkk3*<sup>-/-</sup> no estuviera mediado por WNT5a.

Tras estudiar el papel de WNT5a en la modulación de los niveles de *Il6* en estas células, se decidió analizar si JNK estaba participando en dicha regulación. En primer lugar, se comprobó si el tratamiento con el inhibidor de JNK, JNK-IN-8, afectaba a la expresión de la citoquina. Como se puede observar en el panel A de la figura RI.10, los niveles de ARNm de *Il6* descendieron significativamente con el bloqueo de la actividad de JNK, tanto en los preadipocitos *Mkk3*<sup>-/-</sup> como en los *Mkk6*<sup>-/-</sup>. El efecto de JNK-IN-8 se evaluó, como en ocasiones anteriores, analizando el estado de fosforilación de la proteína cJUN. Como se muestra en la figura RI.10C, JNK-IN-8 fue eficiente en el bloqueo de la fosforilación de dicha proteína. Puesto que los resultados obtenidos apuntaban a una posible participación de JNK en la modulación de la expresión de la citoquina, se evaluaron los niveles de fosforilación de JNK en ambas líneas celulares. Como se observa en el panel B de la figura RI.10B, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de fosforilación de la proteína en las líneas *knockout* con respecto a los preadipocitos *Wt*. Estos resultados sugerirían que, dado que el estado de activación de JNK fue similar en los diferentes preadipocitos, el aumento exacerbado de los niveles de ARNm de *Il6* en las células carentes de *Mkk3* no estaría mediado por JNK; no obstante, sería, al menos, necesaria para la expresión de *Il6* en estas células dado que su bloqueo reduce de manera notable la transcripción de la citoquina.



Dado que MKK3 fosforila principalmente a p38 $\delta$ , estos resultados sugerirían un papel central de p38 $\delta$  en la modulación de la expresión de *Il6* en los preadipocitos de ratón.



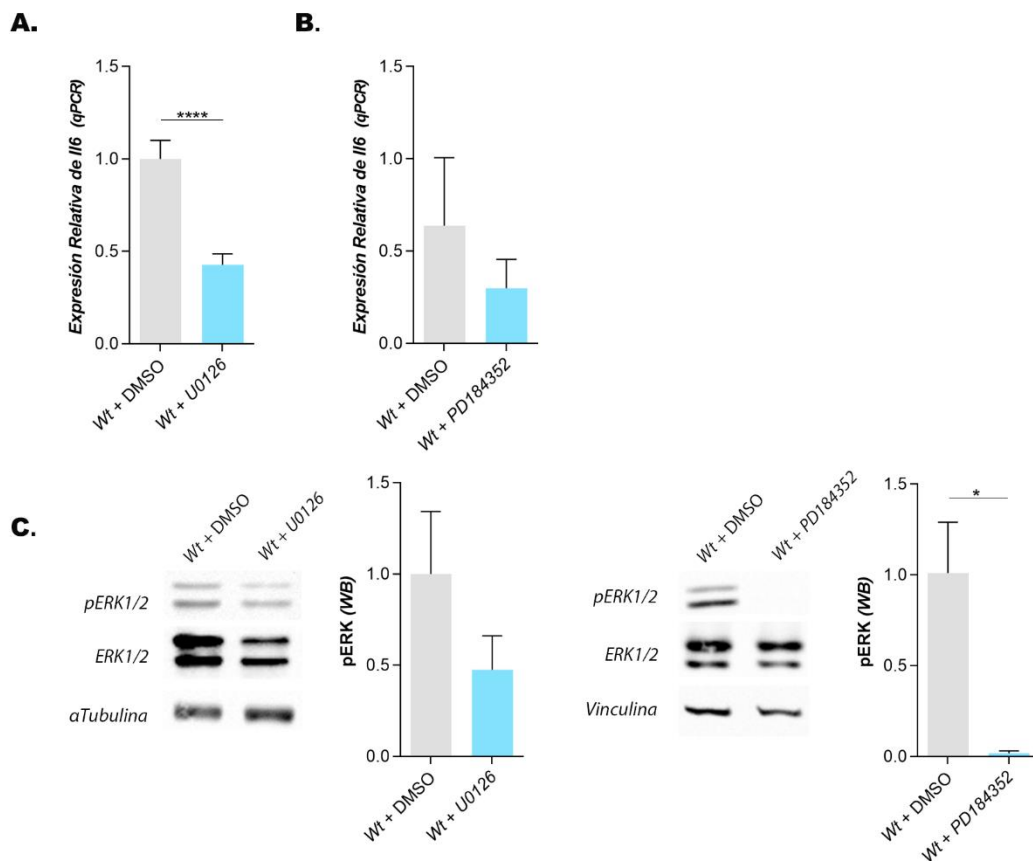
**Figura R1.10: Análisis de la expresión de *Il6* y del estado de fosforilación de las proteínas JNK y cJUN en preadipocitos *Wt* y *Mkk3*<sup>-/-</sup> y *Mkk6*<sup>-/-</sup>.** (A) Niveles de ARNm de *Il6* analizados mediante qPCR en preadipocitos *Wt* y *knockout* para *Mkk3* y *Mkk6* tratados con JNK-IN-8 y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. (B) Western blot y cuantificación de los niveles de fosforilación de la proteína JNK en preadipocitos *Wt* y *Mkk3*<sup>-/-</sup> y *Mkk6*<sup>-/-</sup>. Se utilizaron la proteína total JNK y el control de carga  $\alpha$ -Tubulina para la cuantificación de la proteína fosforilada (n=3). (C) Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína cJUN en preadipocitos *Wt* y *Mkk3*<sup>-/-</sup> y *Mkk6*<sup>-/-</sup> tratados con JNK-IN-8 y DMSO (control). Se utilizaron la proteína total cJUN y el control de carga vinculina para la cuantificación de la proteína fosforilada (n=4). Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

### **3. La vía de señalización MEK/ERK está implicada en la modulación de los niveles de expresión de *Il6* en preadipocitos de ratón**

Numerosas evidencias experimentales han demostrado una estrecha relación entre las vías de señalización de las p38MAPKs y de las proteínas ERK en diferentes tipos celulares (Carter et al., 1999; Hotokezaka et al., 2002; Leaner et al., 2003; Zakrzewska et al., 2019). De esta manera, se ha descrito, por ejemplo, que ambas familias desempeñan un importante papel en la regulación de la producción de factores proinflamatorios durante la respuesta inmunitaria (Risco et al., 2012a). Así mismo numerosos estudios han relacionado la activación de las rutas de señalización mediadas por MEK1/2 y ERK1/2 y la expresión de diversas citoquinas, incluida IL6 (Lee et al., 2019; Feng et al., 2020; Schreiber et al., 2022).

En base a esto, se decidió estudiar si la señalización de ERK1/2 podría estar regulando la expresión de *Il6* y *Wnt5a* en los preadipocitos de ratón. Para ello se utilizaron U0126 y PD184352, dos inhibidores selectivos de MEK1/2, que son las MAPKKs que fosforilan y activan a ERK1/2 (Duncia et al., 1998; Mody et al., 2001; Hotokezaka et al., 2002).

Se comprobó, en primer lugar, si la inhibición de MEK1/2 afectaba a los niveles de *Il6* en los cultivos de preadipocitos *Wt* de ratón. Se analizaron los niveles de expresión de la citoquina mediante qPCR en las células tras su tratamiento con ambos compuestos. La expresión de *Il6* se redujo notablemente en los preadipocitos *Wt* tratados con el inhibidor U0126 (Figura RI.11A), sin embargo, el tratamiento con PD184352 no produjo cambios significativos en los niveles de la citoquina (Figura RI.11B). El efecto de ambos inhibidores sobre la actividad de MEK1/2 se analizó, comprobando mediante *western blot* el estado de fosforilación de su sustrato canónico ERK1/2. Como se muestra en el panel C de la figura RI.11, ambos inhibidores fueron eficientes bloqueando la fosforilación de ERK1/2.

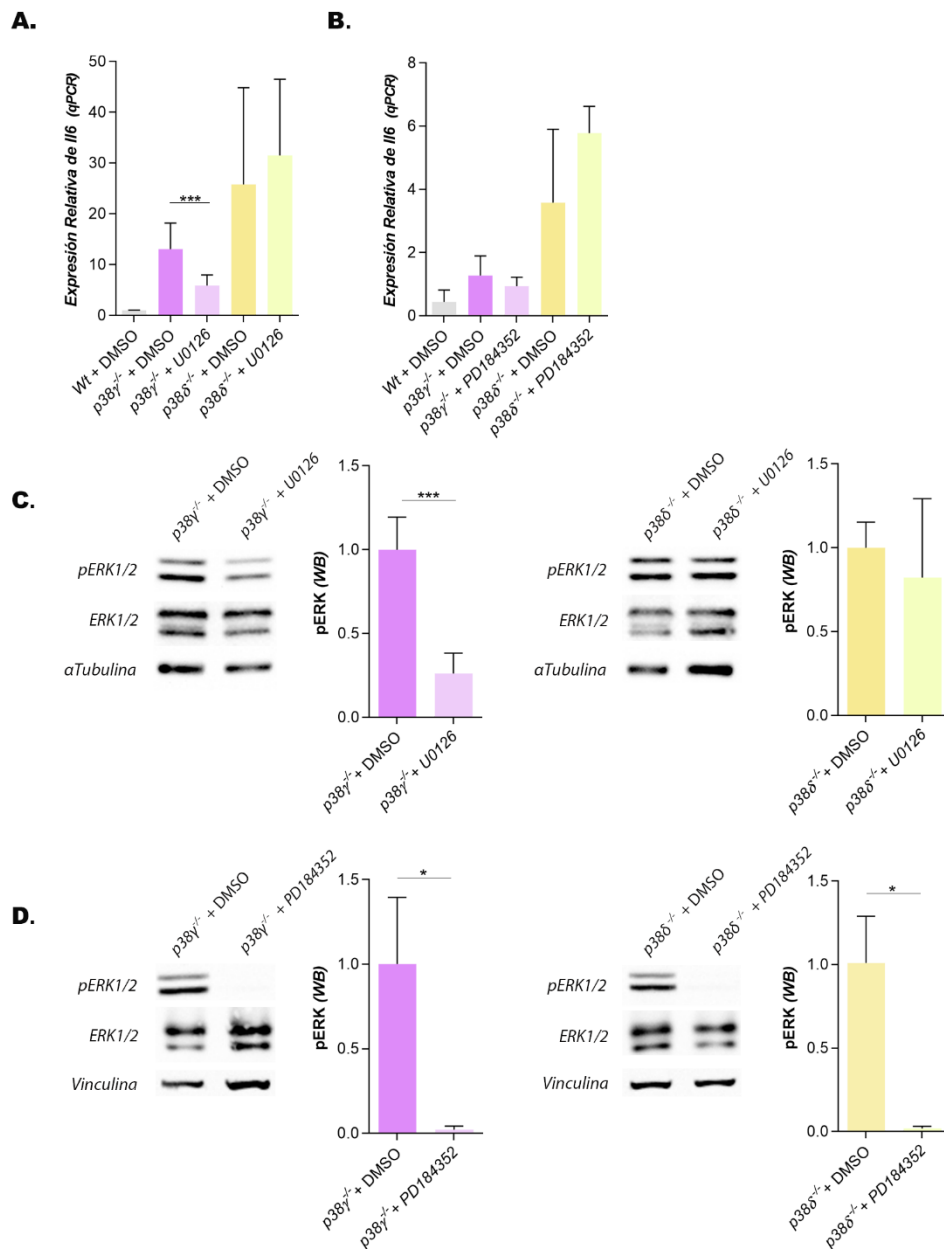


**Figura RI.11: Análisis de la expresión de *I/6* y del estado de fosforilación de la proteína ERK1/2 en preadipocitos *Wt* de ratón.** (A) Niveles de ARNm de *I/6* analizados mediante qPCR en preadipocitos *Wt* tratados con U0126 y DMSO (control) (n=4) o (B) tratados con PD184352 y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. (C) Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína ERK1/2 en preadipocitos *Wt* tratados con U0126 (n=4) o (D) tratados con PD184352 (n=4). Se utilizaron la proteína total ERK1/2 y los controles de carga  $\alpha$ -Tubulina y vinculina (respectivamente) para la cuantificación de la proteína fosforilada. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \*p <0,05; \*\*\*\* p <0,0001.

Los resultados obtenidos con ambos inhibidores en los preadipocitos *Wt* podrían deberse a que otra proteína distinta a ERK1/2, pero inhibida por U0126 estuviera participando en la regulación de los niveles de expresión de *I/6* en estas células.

Se decidió entonces estudiar si las vías de señalización de las p38MAPKs y de las proteínas ERK1/2 podrían estar cooperando en la regulación de los niveles de *I/6*. Para ello, en primer lugar, se trataron preadipocitos de ratón carentes de las isoformas  $\gamma$  y  $\delta$  de p38MAPK con los inhibidores antes mencionados. Tal y como se puede observar en el panel A de la figura RI.12, la expresión de *I/6* se vio reducida significativamente en el caso de los preadipocitos procedentes de ratones *knockout* para *p38 $\gamma$* , tras el

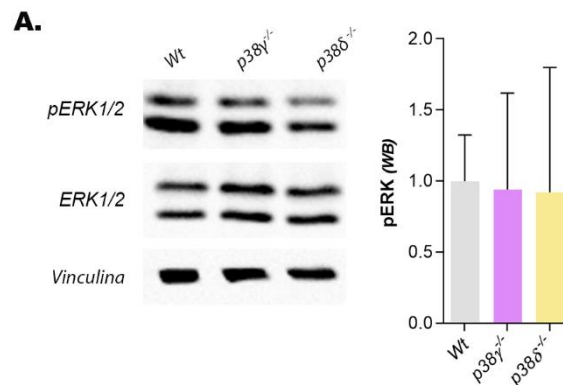
tratamiento con U0126. Por el contrario, los niveles de la citoquina no se vieron afectados por dicho tratamiento en los preadipocitos  $p38\delta^{-/-}$ . Se analizaron, además, mediante *Western blot* el estado de fosforilación de ERK1/2 en estos preadipocitos *knockout* tratados con U0126. Como se muestra en el panel C de la figura RI.12, los niveles de fosforilación de ERK1/2 disminuyeron en las células  $p38\gamma^{-/-}$ , pero no en las  $p38\delta^{-/-}$ . Por otro lado, cuando se utilizó PD184352 para inhibir a MEK1/2 y, por tanto, a ERK1/2, los niveles de expresión de *Il6* no se vieron alterados significativamente ni en los preadipocitos carentes de  $p38\gamma$ , ni en los *knockout* para  $p38\delta$  (Figura RI.12B), a pesar de que los niveles de fosforilación de ERK1/2 se vieron reducidos significativamente por el tratamiento con el inhibidor en ambas líneas celulares (Figura RI.12D).



**Figura RI.12: Análisis de la expresión de *Il6* y del estado de fosforilación de la proteína ERK1/2 en preadipocitos *Wt* y *knockout* para las isoformas de p38 y  $\delta$ .** (A) Niveles de ARNm de *Il6* analizados mediante qPCR en preadipocitos *p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>* o *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>* tratados con U0126 y DMSO (control) (n=4) o (B) tratados con PD184352 y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. (C) Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína ERK1/2 en preadipocitos *p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>* o *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>* tratados con U0126 (n=4) o (D) tratados con PD184352 (n=4). Se utilizaron la proteína total ERK1/2 y los controles de carga  $\alpha$ Tubulina y vinculina (respectivamente) para la cuantificación de la proteína fosforilada. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \* p <0,05; \*\*\* p <0,001.

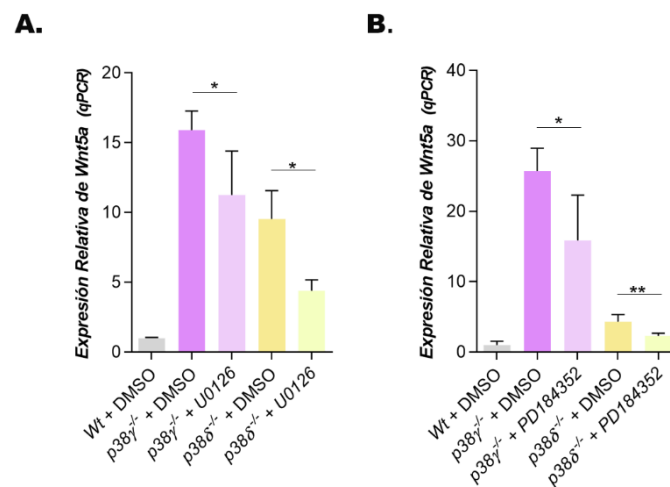
Estos resultados apuntarían, por un lado, a la participación de otra proteína inhibida también por U0126 en la regulación de los niveles de *IL6* en estas células y, por otro lado, a que la inhibición de esta otra proteína por U0126 permitiría que ERK1/2 permaneciera activa en los preadipocitos carentes de la isoforma  $\delta$  de p38.

En base a esto, se decidió también analizar mediante *western blot* los niveles de fosforilación de ERK1/2 en los preadipocitos *p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>* y *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>*, con el objetivo de comprobar su estado de activación en ausencia de dichas isoformas. Como se observa en la figura RI.13 no se encontraron diferencias significativas con respecto a las células *Wt*.



**Figura RI.13: Análisis del estado de fosforilación de la proteína ERK1/2 en preadipocitos *Wt* y *knockout* para las isoformas de p38 y  $\delta$ .** Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína ERK1/2 en preadipocitos *p38 $\gamma$ <sup>-/-</sup>* o *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>*. Se utilizaron la proteína total ERK1/2 y el control de carga vinculina para la cuantificación de la proteína fosforilada (n=4). Las normalización se hizo relativa al cultivo control.

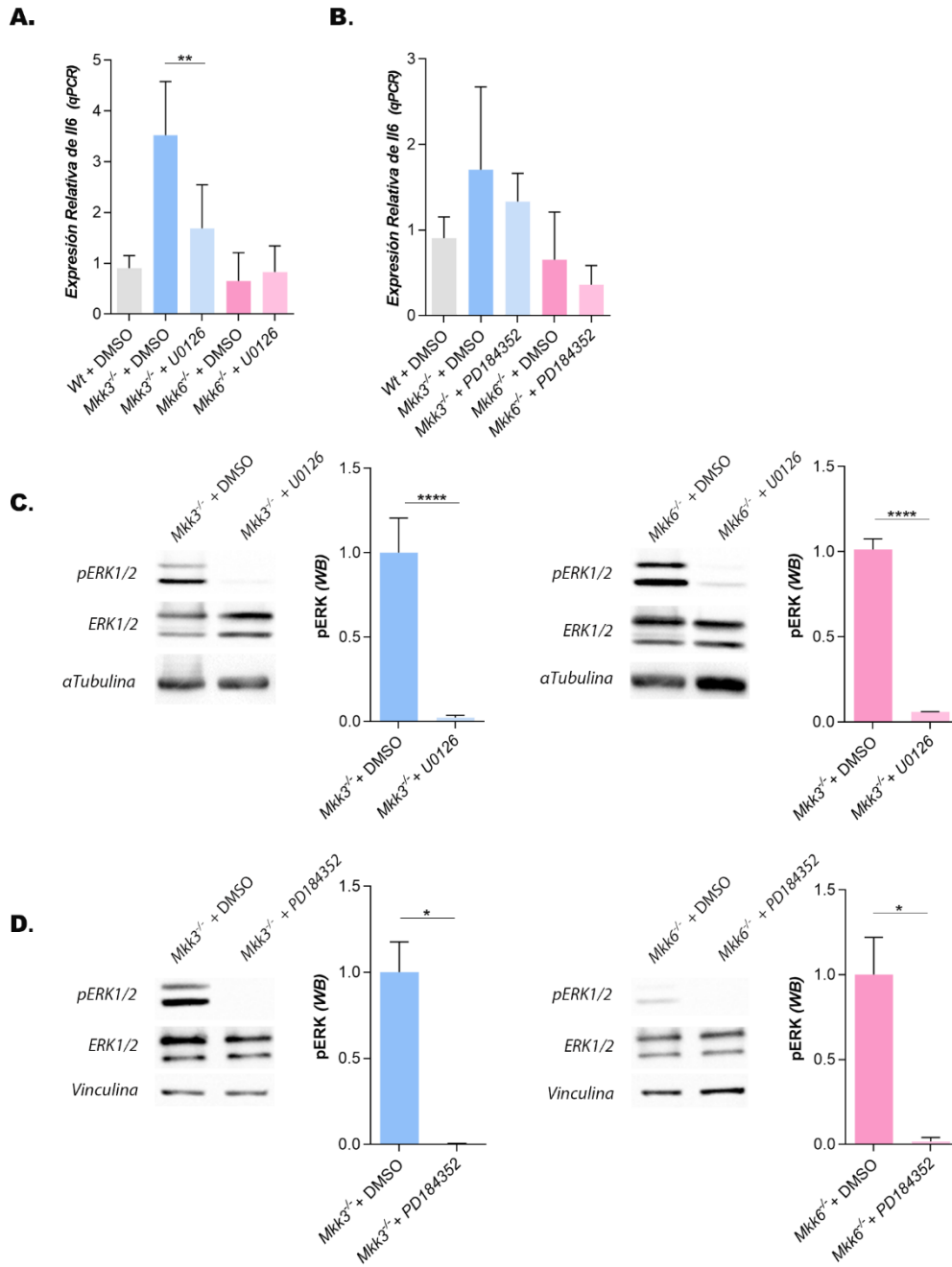
Además, dado el papel que ejerce *Wnt5a* como regulador de los niveles de *Il6* en el tejido adiposo, y tras haber observado que la expresión de ambas proteínas correlacionaba en los preadipocitos de ratón, se analizaron sus niveles de expresión tras tratar las células con ambos inhibidores. Tanto el tratamiento con U0126 (Figura RI.14A) como con PD184352 (Figura RI.14B) produjeron una disminución significativa de la expresión de esta proteína en los preadipocitos *knockout* para ambas isoformas de p38. De esta manera, se encontró que la inhibición de MEK1/2 con el compuesto PD184352 sí reduciría los niveles de expresión de *Wnt5a* en estos preadipocitos, pero dicha disminución no repercutiría en los niveles de *Il6*.



**Figura RI.14: Expresión de *Wnt5a* en preadipocitos *Wt* y *knockout* para las isoformas de p38  $\gamma$  y  $\delta$**  (A) Niveles de ARNm de *Wnt5a* en preadipocitos *p38γ*<sup>-/-</sup> o *p38δ*<sup>-/-</sup> tratados con U0126 y DMSO (control) (n=4), o (B) tratados con PD184352 y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \* p <0,05; \*\* p <0,01.

El hecho de que no se obtuvieran los mismos resultados con ambos compuestos y, principalmente, que U0126 inhibiera la expresión de *Il6*, unido a que se comprobó que los niveles de fosforilación de ERK1/2 eran similares en los preadipocitos *Wt* y *knockout* para *p38γ* y  $\delta$ , sugeriría que la regulación de los niveles de expresión de *Il6* en los preadipocitos podría estar mediado por una proteína distinta a ERK1/2 pero inhibida por U0126, y que dicha inhibición permitiría que ERK1/2 permaneciera fosforilada en los preadipocitos *p38δ*<sup>-/-</sup>.

Por otro lado, el análisis de la participación de ERK1/2 en la regulación de los niveles de *Il6* en ausencia de los activadores canónicos de p38MAPKs, MKK3 y MKK6, mostró resultados similares. El tratamiento con U0126 en preadipocitos *Mkk3*<sup>-/-</sup> disminuyó de manera significativa la expresión de *Il6* (Figura RI.15A), sin embargo, no provocó cambios en los niveles de ARNm de la citoquina en las células *Mkk6*<sup>-/-</sup>. De nuevo, como se puede observar en el panel C de la figura RI.15, los niveles de fosforilación de ERK1/2 se vieron reducidos significativamente por el tratamiento con el inhibidor en ambas líneas celulares. Por el contrario, el tratamiento con PD184352 no redujo de manera significativa los niveles de expresión de *Il6* ni en los preadipocitos *Mkk3*<sup>-/-</sup> ni en los *Mkk6*<sup>-/-</sup> (Figura RI.15B), a pesar de que dicho compuesto sí disminuyó notablemente los niveles de fosforilación de ERK1/2 en ambas líneas celulares (Figura RI.15D). Estos resultados indicarían que al menos en los preadipocitos *Mkk3*<sup>-/-</sup>, la expresión de *Il6* nuevamente dependería de la actividad de una proteína diferente a ERK1/2 pero inhibida por U0126.



**Figura RI.15: Análisis de la expresión de *Il6* y del estado de fosforilación de la proteína ERK1/2 en preadipocitos *Wt* y *knockout* para *Mkk3* y *Mkk6*.** (A) Niveles de ARNm de *Il6* analizados mediante qPCR en preadipocitos *Mkk3*<sup>-/-</sup> y *Mkk6*<sup>-/-</sup> tratados con U0126 y DMSO (control) (n=4) o (B) tratados con PD184352 y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. (C) Western blot y cuantificación del estado de fosforilación de la proteína ERK1/2 en preadipocitos *knockout* para *Mkk3* y *Mkk6* tratados con U0126 (n=4) o (D) tratados con PD184352 (n=4). Se utilizaron la proteína total ERK1/2 y los controles de carga  $\alpha$ Tubulina y vinculina (respectivamente) para la cuantificación de la proteína fosforilada. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001.

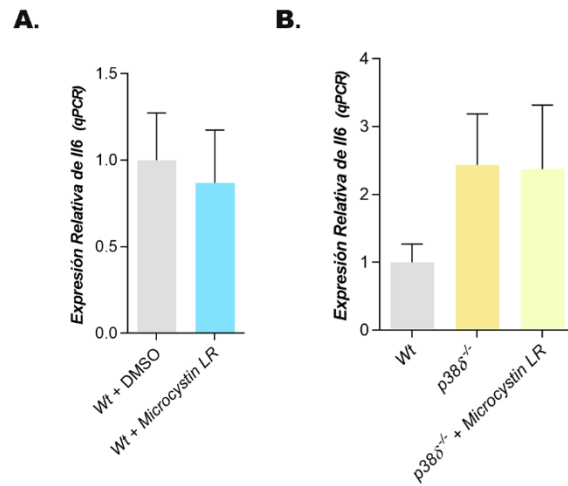


#### 4. p38 $\delta$ podría regular el estado de fosforilación de ERK1/2 en preadipocitos de ratón

Como se ha comentado con anterioridad la expresión de *Il6* en los preadipocitos estaría regulada por el eje de señalización WNT5a/JNK y, además, las proteínas p38MAPKs jugarían un papel destacado en la modulación de sus niveles, especialmente p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , cuya ausencia conlleva un aumento muy significativo de los niveles de ARNm de la citoquina en estas células. Por otro lado, el estudio del papel de ERK1/2 en dicha regulación nos permitió observar que en los preadipocitos carentes de la isoforma  $\delta$  de p38, los niveles de fosforilación de ERK1/2 no disminuían a pesar de la inhibición con U0126 de su activador canónico MEK1/2 (Figuras RI.12C), contrariamente a lo que ocurría con el resto de las líneas celulares (Figura RI.11C; RI.12C; RI.15C). Esto nos hizo plantearnos la posibilidad de que p38 $\delta$  pudiera estar regulando, de alguna manera, el estado de fosforilación de esta proteína de manera independiente a MEK1/2. Una posibilidad que podría explicar estos resultados sería que p38 $\delta$  activara una proteína fosfatasa que desfosforilaría a ERK1/2, de manera que en su ausencia la proteína permaneciera fosforilada.

Para avanzar en este punto, se decidió tratar preadipocitos *Wt* y *p38 $\delta$ <sup>-/-</sup>* con microcistina, un potente inhibidor de las proteínas fosfatasas 1 (PP1) y 2A (PP2A), responsables de la mayor parte de la desfosforilación de las serina/treonina quinasas en las células eucariotas. Como se muestra en la figura RI.16, la expresión de *Il6* no se vio afectada por el tratamiento con el compuesto ni en los preadipocitos *Wt* (Figura RI.16A), ni en los carentes de *p38 $\delta$*  (Figura RI.16B).

Estos resultados sugerirían que, al menos, estas dos fosfatasas, PP1 y PP2A no participarían en la regulación de los niveles de fosforilación de ERK1/2 en los preadipocitos de ratón.



**Figura RI.16: Análisis de la expresión de *Il6* en preadipocitos *Wt* y  $p38\delta^{-/-}$  tratados con microcistina (A) Niveles de ARNm de *Il6* analizados mediante qPCR en preadipocitos *Wt* tratados con microcistina y DMSO (control) (n=4). (B) Niveles de expresión de *Il6* en preadipocitos  $p38\delta^{-/-}$  tratados con microcistina y DMSO (control) (n=4). Se utilizó la expresión de *Gapdh*, *Eif1a* y  $\beta$ -*Actina* para normalizar los niveles de expresión. Las normalizaciones se hicieron, en todos los casos, relativas al cultivo control.**

## **DISCUSIÓN I**



## DISCUSIÓN I

---

IL6 es una citoquina pleiotrópica cuya función resulta esencial en un amplio rango de procesos biológicos tales como la respuesta inmune o la hematopoyesis, así como en la regulación de procesos metabólicos, regenerativos y neuronales (Scheller et al., 2011). Contribuye, además, al correcto funcionamiento de multitud de sistemas, incluidos el sistema inmune, el sistema nervioso, el hepático o el sistema esquelético (Kishimoto, 2010). Se trata, por tanto, de una citoquina que se expresa en multitud de tejidos y bajo condiciones muy diferentes en los que puede exhibir, en función del contexto fisiológico, propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias y activar genes implicados en proliferación, diferenciación o apoptosis celular (Heinrich et al., 2003; Scheller et al., 2011). De esta manera, como ya se ha comentado con anterioridad, se ha visto, por ejemplo, que el ejercicio eleva los niveles de IL6 en el músculo (Fischer, 2006), la señalización de insulina por parte de las neuronas hipotalámicas provoca un aumento de la expresión hepática de IL6 (Könner et al., 2007), o que durante la obesidad aumenta la expresión de esta citoquina en el tejido adiposo (Mohamed-Ali et al., 1997).

La gran variedad de procesos en los que IL6 participa y la versatilidad de acciones que exhibe en función del tejido en el que se exprese y las condiciones bajo las cuales lo haga suponen un verdadero reto a la hora de dilucidar los mecanismos moleculares responsables de su regulación. Sin embargo, es precisamente esta enorme multiplicidad de funciones que puede llevar a cabo lo que pone de manifiesto la necesidad de profundizar en dichos mecanismos y analizar cómo se lleva a cabo la modulación de su expresión. En este sentido, en los últimos años numerosos grupos de investigación han puesto su foco en el estudio de IL6 por su potencial como agente terapéutico en el tratamiento de una gran variedad de desórdenes (Kang et al., 2019, 2020). Las perspectivas de futuro son prometedoras, sin embargo, sigue siendo necesario un estudio más exhaustivo de las vías que son activadas por esta citoquina, así como de los elementos que participan en la regulación de sus niveles en los diferentes sistemas.

En base a esto y, dado que el tejido adiposo es una de las principales fuentes de IL6, que los niveles de esta citoquina en plasma correlacionan positivamente con la

acumulación de grasa y el incremento de masa corporal (Fried et al., 1998) y que numerosos estudios muestran un papel relevante de esta citoquina en el desarrollo de patologías relacionadas con este tejido, tales como la obesidad (Mohamed-Ali et al., 1997; Fried et al., 1998; Bastard et al., 2006; Han et al., 2020), en este primer capítulo de Tesis nos propusimos analizar qué vías de señalización podrían estar participando en la regulación de la expresión de IL6 en el tejido adiposo. Para ello, abordamos el estudio de la participación del eje de señalización WNT5a/JNK y de las proteínas de la familia p38MAPKs en dicho proceso.

### **1. Wnt5a y JNK participan en la regulación de la expresión de IL6 en preadipocitos de ratón**

En los últimos años diferentes trabajos se han centrado en dilucidar cómo la señalización no canónica del ligando WNT5a podría contribuir a la inflamación del tejido adiposo y la disfunción metabólica asociada, en el contexto de la obesidad. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que la expresión de WNT5a es significativamente mayor en el tejido adiposo visceral de individuos con obesidad (Fuster et al., 2015). A su vez, se han encontrado, también, niveles elevados de esta proteína en macrófagos y monocitos CD14 circulantes en individuos con esta misma patología (Bilkovski et al., 2011; Schulte et al., 2012; Catalán et al., 2014). Además, se ha observado que su expresión en ratones es inducida por una dieta con elevado contenido calórico y por un aumento en la masa corporal de los animales (Oh and Olefsky, 2010; Catalán et al., 2014). Dichos niveles de expresión de WNT5a en el tejido adiposo se han correlacionado con un mayor grado de inflamación en este tejido, especialmente en individuos con obesidad. Resultados descritos en la bibliografía muestran que la sobreexpresión de Wnt5a en las células mieloides de ratones con obesidad elevaba, de manera notable, la inflamación del tejido adiposo, con un significativo aumento en la producción de factores proinflamatorios (Fuster et al., 2015). Del mismo modo, estudios llevados a cabo con tejido adiposo visceral humano de individuos con obesidad demostraron también que la señalización no canónica de WNT5a promovía una mayor producción de citoquinas proinflamatorias, entre las que destacaba IL6, y un mayor grado de inflamación en el tejido (Catalán et al., 2014).

En consonancia con lo descrito en la bibliografía, en nuestro trabajo mostramos que Wnt5a tiene un papel relevante en la regulación de los niveles de expresión de *Il6* en el tejido adiposo de ratón. El tratamiento de los preadipocitos con proteína WNT5a recombinante condujo a un aumento significativo de los niveles de expresión de la citoquina. Además, la preincubación de estas células con su antagonista Box5 antes de la adición de proteína recombinante al medio de cultivo provocó un descenso notable de los niveles de *Il6*, confirmando que el incremento antes observado se debía, efectivamente, a la acción de WNT5a. Estos resultados contrastan con los datos obtenidos del bloqueo de la actividad de la proteína WNT5a producida por los propios preadipocitos, en los que no se observó una alteración de los niveles de expresión de *Il6*. Esto podría deberse a que dichos niveles endógenos de WNT5a fueran insuficientes para inducir, por sí solos, la expresión de la citoquina. De esta manera, podría ocurrir que, en el contexto fisiológico, fuera realmente la proteína WNT5a liberada al medio por los diferentes tipos celulares que componen el tejido adiposo la que promoviera la expresión de la citoquina en los preadipocitos. De hecho, se ha comprobado que la proteína WNT5a liberada por los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo desempeña un importante papel en la inflamación del propio tejido al inducir la activación proinflamatoria de los macrófagos y otros tipos celulares presentes en él de manera autocrina/paracrina (Fuster et al., 2015).

De entre las diversas vías de señalización que WNT5a puede activar se ha reportado que JNK es la principal quinasa activada por la vía Wnt en mamíferos (Boutros et al., 1998; Gros et al., 2010). Y, de hecho, diferentes estudios experimentales indican que la señalización de JNK es particularmente relevante en el contexto de la inflamación inducida por la obesidad y la disfunción metabólica asociada (Sabio et al., 2008; Han et al., 2013). En este sentido, se ha observado que WNT5a promueve la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL6 en cultivos de macrófagos de manera dependiente de JNK (Ouchi et al., 2010; Fuster et al., 2015). Por otro lado, trabajos llevados a cabo con tejido adiposo visceral humano de individuos con obesidad demostraron que WNT5a incrementaba los niveles de expresión de *Il6* a través de la activación de la proteína JNK, lo que conducía, a su vez, a un mayor grado de inflamación en el tejido (Zuriaga et al., 2017).

La inhibición farmacológica de JNK en los cultivos de preadipocitos de ratón reflejó la participación de dicha quinasa en la modulación de la expresión de IL6 en nuestro modelo, coincidiendo con lo descrito en la bibliografía. El tratamiento de las células con el inhibidor de JNK, JNK-IN-8, se tradujo en un descenso muy significativo de los niveles de la citoquina. Estos resultados, junto a los obtenidos del análisis de la implicación de WNT5a en la regulación de IL6 sugieren que, al igual que ocurre en el tejido adiposo humano, el eje de señalización WNT5a/JNK contribuiría a la generación de un microambiente inflamatorio de bajo grado en el tejido adiposo de ratón al promover la expresión de IL6.

## **2. p38MAPKs están implicadas en la modulación de los niveles de expresión de IL6 en preadipocitos de ratón**

Las quinasas de la familia p38 son activadas en respuesta a múltiples señales ambientales y de estrés celular como son la hipoxia, la radiación ultravioleta o el estrés oxidativo, así como por factores proinflamatorios como IL1 o TNF $\alpha$  (Roux and Blenis, 2004; Cargnello and Roux, 2011; Lee et al., 2020). Se ha informado ampliamente en la literatura que las p38MAPKs desempeñan un importante papel en la respuesta inmune y su desregulación se relaciona con diversas enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide (Roux and Blenis, 2004; Yong et al., 2009). Y es, precisamente, la búsqueda de posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de este tipo de desórdenes lo que permitió profundizar en el estudio de la participación de esta familia en la producción de factores proinflamatorios. De este modo, existen numerosos estudios que han demostrado su implicación en la regulación de dicho proceso en diversos tipos celulares (Beyaert et al., 1996; Duncia et al., 1998; Amrani et al., 2001; Van Wagoner et al., 2002; Liu et al., 2009; Rasheed et al., 2011). Tradicionalmente la mayoría de los trabajos se habían centrado en comprender la relación existente entre p38 $\alpha$  y determinados factores proinflamatorios, puesto que es la isoforma más abundante y ubicua de la familia, sin embargo, las isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  han cobrado gran relevancia en los últimos años al relacionarse con procesos tan importantes como la regulación de la migración celular, la homeostasis de la glucosa, la expresión génica, la actividad neuronal o el desarrollo tumoral (Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017). Además, una de las funciones más importantes que se ha atribuido a estas quinasas es, precisamente,



modular la producción y actividad de diversos mediadores inflamatorios, como las citoquinas responsables de la inflamación asociada a la respuesta inmune innata, el cáncer o a patologías como la aterosclerosis o la artritis reumatoide (Yong et al., 2009; Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017; García-Hernández et al., 2021). De esta manera, se ha observado, por ejemplo, que en modelos murinos de shock séptico o insuficiencia hepática aguda, la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 en macrófagos deficientes en p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  estimulados con LPS era significativamente menor que en macrófagos *Wt*, mientras que la producción de otros factores como IL12 o IFN $\beta$  era mayor (Risco et al., 2012b; Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017).

Nuestros hallazgos relativos al papel de esta familia de proteínas en la modulación de los niveles de IL6 en el tejido adiposo de ratón, revelaron que las p38MAPKs reprimen la expresión de IL6 en los preadipocitos. La ablación de las distintas isoformas de la proteína indujo la expresión de la citoquina, cuyos niveles fueron especialmente elevados en los preadipocitos carentes de p38 $\gamma$  o p38 $\delta$ . Además, observamos también que las p38MAPKs regulan negativamente la expresión de WNT5a en nuestro modelo, dado que los preadipocitos carentes de las diferentes isoformas de p38 mostraron una mayor expresión de la proteína, correlacionando dichos resultados con una mayor expresión de IL6 en esas mismas células. Dicha relación entre WNT5a e IL6 estaría de acuerdo, de nuevo, con los resultados mostrados en trabajos previos (Zuriaga et al., 2017). De esta manera, los datos obtenidos nos permiten proponer que las p38MAPKs, especialmente p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , reprimen la expresión de WNT5a en los preadipocitos de ratón, lo que se traduce, a su vez, en una bajada de los niveles de expresión de IL6 en estas células. Estos resultados no dejan de ser novedosos ya que a estas quinasas se les atribuye un papel proinflamatorio. Una posible explicación es que su función sobre la producción de factores proinflamatorios dependa del contexto fisiológico, es decir, del tipo celular, del tejido o de las citoquinas sobre las que ejerzan la regulación.

Por otro lado, la inhibición de p38 $\gamma$  y  $\delta$  en los cultivos de preadipocitos *Wt* con el inhibidor BIRB0796 a una concentración de 10 $\mu$ M mostró una disminución en la expresión de IL6, resultado contrario al obtenido con las líneas *knockout* para dichas isoformas. Dado que se ha demostrado que a esa concentración BIRB0796 puede inhibir

tanto a p38 $\gamma$  y  $\delta$  humanas como a JNK (Kuma et al., 2005) se comprobó si dichos resultados podrían deberse al bloqueo de JNK con este compuesto. Esta posibilidad quedó descartada al confirmar que el tratamiento con BIRB0796 no modificaba el estado de fosforilación del sustrato canónico de JNK, cJUN (Figura RI.6E). Nos planteamos, en tal caso, la posibilidad de que BIRB0796 no estuviera siendo eficiente en el bloqueo de p38 $\gamma$  y  $\delta$  en las células de ratón. Se decidió entonces analizar cuáles serían las dianas proteicas más probables para BIRB0796 en ratón, con el objetivo de comprobar si este compuesto podía estar o no inhibiendo a p38 $\gamma$  y  $\delta$  en nuestro modelo. Para ello se utilizó la herramienta bioinformática *Protein Target Prediction* (Daina et al., 2019). Los resultados obtenidos mostraron que, en ratón, BIRB0796 sería un ligando de p38 $\alpha$ ,  $\beta$ , JNK2 y ERK1/2 (Tabla DI.1). De esta manera, las diferencias encontradas entre la inhibición génica y la inhibición farmacológica con BIRB0796 podrían deberse a que, en preadipocitos de ratón, este compuesto no estuviera inhibiendo a las isoformas p38 $\gamma$  y  $\delta$ , o al menos no de manera eficiente, y el descenso observado en la expresión de IL6 se debiera al bloqueo de la actividad de otra proteína quinasa.

**Tabla DI.1: Probabilidad de interacción entre el ligando BIRB0796 y las proteínas de ratón obtenidas con la aplicación *Protein Target Prediction*.** Los datos que hacen referencia a p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  y JNK2 se resaltan en rojo y los datos que hacen referencia a ERK2 aparecen resaltados en verde. Si bien aparecían más posibles proteínas diana, hemos restringido la tabla cuando la probabilidad de unión disminuyó drásticamente. p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  no aparecen en la lista obtenida en la predicción.

Proteína diana	Nombre común	ID	Clase	Probabilidad de interacción
<b>MAP Kinase p38 alpha</b>	Mapk14	P47811 ChEMBL2336	Kinase	<b>0.806139984034</b>
Tyrosine-protein Kinase ABL (by homology)	Abl1	P00520 ChEMBL3099	Kinase	0.708600275424
Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor (by homology)	Csf1r	P09581 ChEMBL5570	Kinase	0.699816427534
<b>MAP Kinase ERK2 (by homology)</b>	Mapk1	P63085 ChEMBL2207	Kinase	<b>0.699816427534</b>
Mast/stem cell growth factor receptor Kit (by homology)	Kit	P05532 ChEMBL2034798	Kinase	0.656056327825

Serine/threonine-protein kinase B-raf (by homology)	Braf	P28028 ChEMBL2331061	Kinase	0.656056327825
<b>Mitogen-activated protein Kinase 9 (by homology)</b>	Mapk9	Q9WTU6 ChEMBL2034797	Kinase	<b>0.656056327825</b>
Protein Kinase C delta (by homology)	Prkcd	P28867 ChEMBL2560	Kinase	0.647335168236
Vascular endothelial growth factor receptor 1 (by homology)	Flt1	P35969 ChEMBL3516	Kinase	0.647335168236
Epidermal growth factor receptor erbB1 (by homology)	Egfr	Q01279 ChEMBL3608	Kinase	0.647335168236
RAF proto-oncogene serine/threonine-protein Kinase (by homology)	Raf1	Q99N57 ChEMBL3804748	Kinase	0.647335168236
Proto-oncogene tyrosine-protein Kinase receptor Ret (by homology)	Ret	P35546 ChEMBL2034799	Kinase	0.647335168236
Tyrosine-protein Kinase BLK (by homology)	Blk	P16277 ChEMBL3343	Kinase	0.647335168236
Tyrosine-protein Kinase LCK (by homology)	Lck	P06240 ChEMBL2480	Kinase	0.647335168236
Tyrosine-protein Kinase Lyn (by homology)	Lyn	P25911 ChEMBL2258	Kinase	0.647335168236
<b>MAP Kinase p38 beta (by homology)</b>	Mapk11	Q9WUI1 ChEMBL4335	Kinase	<b>0.647335168236</b>
Fibroblast growth factor receptor 4 (by homology)	Fgfr4	Q03142 ChEMBL3839	Kinase	0.647335168236
STE20-like serine/ threonine-protein kinase(by homology)	Slk	O54988 ChEMBL2176844	Kinase	0.647335168236
Tyrosine-protein Kinase Fgr (by homology)	Fgr	P14234 ChEMBL2034795	Kinase	0.647335168236
Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1 (by homology)	Tie1	Q06806 ChEMBL2034800	Kinase	0.647335168236

Protein-tyrosine kinase 2-beta	Ptk2b	Q9QVP9 ChEMBL1075289	Kinase	0.0956237870388
--------------------------------	-------	-------------------------	--------	-----------------

Nuestros resultados mostraron, además, un importante papel de Mkk3, activador canónico de las p38MAPKs, en la regulación de los niveles de ARNm de IL6 en los preadipocitos de ratón. Dado que MKK3 activa preferentemente a p38 $\delta$ , pero también a p38 $\gamma$  y p38 $\beta$  (Manieri and Sabio, 2015; Cuenda and Sanz-Ezquerro, 2017), el aumento exacerbado de expresión observado tanto en los preadipocitos p38 $\gamma^{-/-}$  como en los p38 $\delta^{-/-}$ , correlacionarían perfectamente con los obtenidos en los *knockout* para Mkk3.

### 3. La familia ERK podría participar en la regulación de los niveles de expresión de IL6 en preadipocitos de ratón

En los últimos años diferentes trabajos han demostrado una estrecha relación entre la activación de la vía de señalización MEK/ERK y la expresión de diversas citoquinas. En este sentido, se ha observado que, en pacientes con isquemia cerebral, la vía MEK/ERK participa en la regulación de los niveles de ARNm de IL1 $\beta$ . De este modo, ratones con isquemia cerebral tratados con el inhibidor de MEK, U0126, exhibían niveles significativamente reducidos de esta citoquina (Wang et al., 2004). A su vez, estudios recientes han demostrado que la infección por SarsCoV2 activa esta vía de señalización durante la fase de infección muy temprana, y que el uso de ATR-002, un inhibidor de MEK1/2, reducía la expresión de diferentes citoquinas proinflamatorias, disminuyendo, en parte, la hiperinflamación asociada a la COVID-19 (Schreiber et al., 2022). Además, trabajos llevados a cabo en tejido adiposo (Lee et al., 2019; Feng et al., 2020), macrófagos (Budai et al., 2013), pulmón (Huang et al., 2018) o tejido óseo (Hu et al., 2020) también han mostrado que la señalización MEK/ERK está implicada en la producción de diversas citoquinas, entre ellas IL6.

Coincidiendo con lo descrito en la bibliografía, nuestros resultados sugieren que la vía de señalización MEK/ERK participaría en la regulación de los niveles de expresión de IL6 en los preadipocitos de ratón. La inhibición farmacológica de MEK con dos inhibidores selectivos arrojó diferentes resultados en cuanto a los niveles de ARNm de

IL6, a pesar de que ambos bloquearon de manera eficiente la fosforilación de ERK1/2. Mientras que el compuesto U0126 disminuyó de manera significativa la expresión de la citoquina en preadipocitos *Wt* y *knockout* para *p38γ* y *Mkk3*, el tratamiento con el inhibidor PD184352 no provocó cambios significativos en los niveles de IL6. Estos resultados, aparentemente contradictorios, podrían deberse a la especificidad del compuesto por las diferentes isoformas de la familia MEK. Algunos trabajos publicados parecen indicar que mientras que el compuesto U0126 utilizado a una concentración de 10μM puede inhibir tanto a MEK1/2 como a MEK5, bloqueando la fosforilación de sus respectivos sustratos ERK1/2 y ERK5, el inhibidor PD184352 utilizado a una concentración de 2μM inhibe únicamente a MEK1/2, y por tanto, solo bloquea la fosforilación de su diana ERK1/2 (Mody et al., 2001).

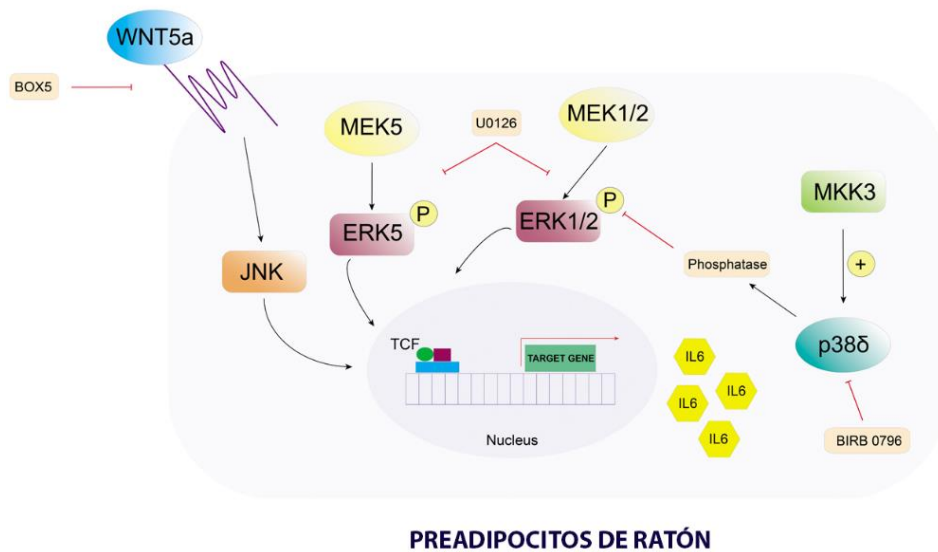
Dichos resultados, junto a que el análisis de los niveles de fosforilación de ERK1/2 en preadipocitos *Wt*, *p38γ<sup>-/-</sup>* y *p38δ<sup>-/-</sup>* no mostró diferencias significativas, sugiere que ERK5 podría estar participando en la regulación de los niveles de expresión de IL6 en los preadipocitos de ratón. Estos datos estarían en consonancia con estudios recientes en los que se demostró que ERK5 se requiere para la producción de IL6 en células tumorales. De hecho, se observó que la inhibición de ERK5 o su agotamiento impedía la producción de IL6 en estas células (Riegel et al., 2021).

#### **4. *p38δ* podría regular el estado de fosforilación de ERK1/2**

Mientras que la fosforilación de ERK1/2 es dependiente de MEK1/2 en los preadipocitos *Wt* y carentes de *p38γ*, *Mkk3* y *Mkk6* tal y como se puede observar en el análisis del estado de fosforilación de la proteína tras el tratamiento con los dos inhibidores de MEK, U0126 y PD184352, en las células *p38δ<sup>-/-</sup>* la fosforilación de ERK1/2 no fue inhibida con U0126. Dado que, como se ha comentado con anterioridad, U0126 puede también inhibir MEK5, esto podría deberse a que la inhibición de esta proteína permitiera que ERK1/2 permaneciera fosforilada en las células *p38δ<sup>-/-</sup>*. Además, podría ocurrir que *p38δ* estuviera regulando, en parte, el estado de fosforilación de ERK1/2 de manera independiente a MEK1/2. Estudios recientes han demostrado que la curcumina activa a *p38* y a la fosfatasa PP2A, induciendo la desfosforilación de ERK1/2 (Hsiao et al., 2020). Usando microcistina como inhibidor, descartamos que las fosfatasas involucradas

podrían ser PP1 y PP2A. Aunque es un resultado negativo, otras fosfatasa podrían estar siendo reguladas por p38δ en los preadipocitos, y que ellas modularan el nivel de fosforilación de ERK1/2.

A modo de resumen, se esquematiza el modelo propuesto para la regulación de la expresión de la citoquina IL6 en los preadipocitos de ratón:



**Figura DI.1: Representación esquemática del modelo propuesto para la regulación de la expresión de la citoquina IL6 en los preadipocitos de ratón.** La expresión de IL6 sería dependiente de Wnt5a, y JNK también participaría en la regulación de los niveles de la citoquina. Además, en preadipocitos de ratón encontramos que p38δ podría regular los niveles de fosforilación de ERK1/2, de forma que la falta de esta isoforma favorecería que ERK1/2 permaneciera activo, lo que podría deberse a que p38δ activara a una proteína fosfatasa ERK. Esta vía de señalización puede ser bloqueada por U0126, que también puede inhibir ERK5. Así mismo, nuestros resultados sugieren que ERK5 también podría participar en la regulación de la expresión de IL6.

# CONCLUSIONES I





## CONCLUSIONES I

---

1. La activación de la señalización Wnt no canónica a través de su ligando WNT5a promueve la expresión de la citoquina IL6 en preadipocitos de ratón.
2. p38MAPKs, principalmente las isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , participan en la regulación de los niveles de IL6 en los preadipocitos de ratón, reprimiendo su expresión.
3. p38MAPKs modulan la expresión de WNT5a en los preadipocitos de ratón, cuyos niveles correlacionan con los de IL6 en estas mismas células.
4. La vía de señalización MEK/ERK está implicada en la modulación de los niveles de expresión de IL6 en los preadipocitos de ratón.
5. p38MPAKs regularían los niveles de expresión de IL6, modulando el estado de fosforilación de ERK en preadipocitos de ratón.
6. La ablación de p38 $\delta$  podría promover una mayor fosforilación de ERK1/2 de manera independiente a su activador canónico MEK1/2.



## ***CAPÍTULO 2***

### ***Función fisiológica de IL6 en el epitelio respiratorio***



El equilibrio entre las diferentes poblaciones que conforman el epitelio de las vías respiratorias es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del tejido. Para que esto ocurra el proceso de diferenciación de las células basales en células secretoras y multiciliadas debe llevarse a cabo de manera correcta y bajo un estricto control. En los últimos años, el papel de IL6 en este tejido ha cobrado gran relevancia por su implicación en este proceso de renovación del epitelio. Además, se ha observado que la desregulación en su señalización está relacionada con el desarrollo de patologías como la EPOC o el asma. Es por esta razón que comprender en profundidad cuál es el papel de IL6 en este tejido resulta de vital importancia.

En este segundo capítulo de tesis, hemos obtenido y caracterizado una línea de células madre basales humanas aisladas de las vías respiratorias, a través de la expresión de hTERT. Esta línea celular inmortalizada, BROCC2, deriva de una sola célula parental y durante las condiciones de expansión y diferenciación del cultivo conserva el marcador p63, característico de este tipo celular del epitelio respiratorio. Utilizando como modelo dicha línea celular, hemos estudiado el papel de IL6 en la modulación de la diferenciación de las células madre basales a células multiciliadas. Hemos demostrado que el tratamiento de las células basales (nuestra línea inmortalizada) con proteína IL6 recombinante induce la expresión del factor de transcripción FOXJ1, así como de proteínas que forman parte de la estructura del cilio, tales como cenexina, centriolina,  $\gamma$ -tubulina o tubulina acetilada. Además, también hemos observado que IL6 promueve la pseudoestratificación de la monocapa de células madre basales durante su diferenciación.



## **OBJETIVOS II**





## OBJETIVOS II

---

El epitelio pseudoestratificado que tapiza las vías respiratorias está constituido por diversos tipos celulares, cuyas poblaciones se encuentran en una proporción equilibrada. Cuando estas células se dañan son reemplazadas a través de la diferenciación de las células madre basales, proceso que resulta fundamental para el mantenimiento de la integridad del tejido. Sin embargo, a pesar de su relevancia, las rutas moleculares implicadas en la proliferación de estas células madre basales durante la regeneración del epitelio siguen estando poco esclarecidas.

En los últimos años el papel de IL6 en este tejido ha suscitado un gran interés, precisamente, por su participación en los procesos de reparación y renovación de este (Tadokoro et al., 2014), así como por su relación con el desarrollo de patologías crónicas de tipo inflamatorio vinculadas a él, como son la EPOC, el asma o la fibrosis pulmonar (Atamas et al., 2013; Wei et al., 2015; Garth et al., 2018; Dawson et al., 2021).

Dado que el epitelio que tapiza las vías respiratorias constituye una barrera muy importante frente a la infección por patógenos y partículas contaminantes, y que el desequilibrio en la proporción de los diferentes tipos celulares que lo componen se relaciona con algunas de las enfermedades antes mencionadas, analizar cómo la señalización de IL6 modula la capacidad de diferenciación de las células basales en este tejido es de vital importancia a la hora de comprender el origen de estas patologías y desarrollar estrategias que permitan asegurar la homeostasis del tejido.

En base a esto, en este segundo capítulo de tesis nos propusimos **estudiar el papel que IL6 desempeña en el epitelio de las vías respiratorias humanas**. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Generar una línea inmortalizada de células basales derivadas del epitelio de las vías respiratorias humanas.
2. Caracterizar el papel de IL6 en la diferenciación de las células madre basales de las vías respiratorias humanas.



## **RESULTADOS II**



### **1. Generación de una línea de células madre basales derivadas del epitelio de las vías respiratorias humanas**

El epitelio que recubre las vías respiratorias humanas es una capa multicelular pseudoestratificada, como ya se mencionó con anterioridad, y se compone mayoritariamente de tres tipos diferentes de células, células basales, células secretoras y células multiciliadas. Las células basales, conforman la población celular más próxima a la lámina basal que rodea al epitelio respiratorio y se encuentran en contacto con el mesénquima (Mercer et al., 1994). En las vías respiratorias superiores, dichas células basales forman una monocapa continua en contacto con la lámina propia del tejido circundante, y en regiones más distales se localizan individualmente o formando clústeres (Nakajima et al., 1998). Constituyen, además, la población progenitora que se encarga de reemplazar al resto de poblaciones de células diferenciadas de las vías respiratorias durante la reparación y renovación del epitelio (Walters et al., 2013). Se trata, por tanto, de una población de células fundamental para el mantenimiento de la integridad y de la homeostasis del tejido respiratorio.

En cultivo primario, estas células basales solo se dividen un número limitado de veces antes de que su ciclo celular se detenga de manera permanente y entren en estado de senescencia. A lo largo de los sucesivos subcultivos es notoria la pérdida de su potencial de diferenciación, así como la aparición de alteraciones morfológicas asociadas a su envejecimiento, por lo tanto, es imposible llevar a cabo cultivos a largo plazo en los que se conserven las características de las células parentales (Walters et al., 2013). En consecuencia, el estudio de la biología, fisiología y fisiopatología de las vías respiratorias humanas requiere, en la actualidad, el uso continuo de nuevas preparaciones de células epiteliales primarias de las vías respiratorias o sujetos humanos. Como resultado, la investigación en esta importante área se basa en la utilización constante de tejido fresco de donantes, disponible en biobancos o en empresas privadas, lo que dificulta y encarece el trabajo.

Es por esta razón que se planteó el desarrollo de una línea celular inmortalizada de células basales de las vías respiratorias humanas con capacidad para dar lugar al resto

de tipos celulares del tejido a largo plazo y que conservara las características del cultivo primario original.

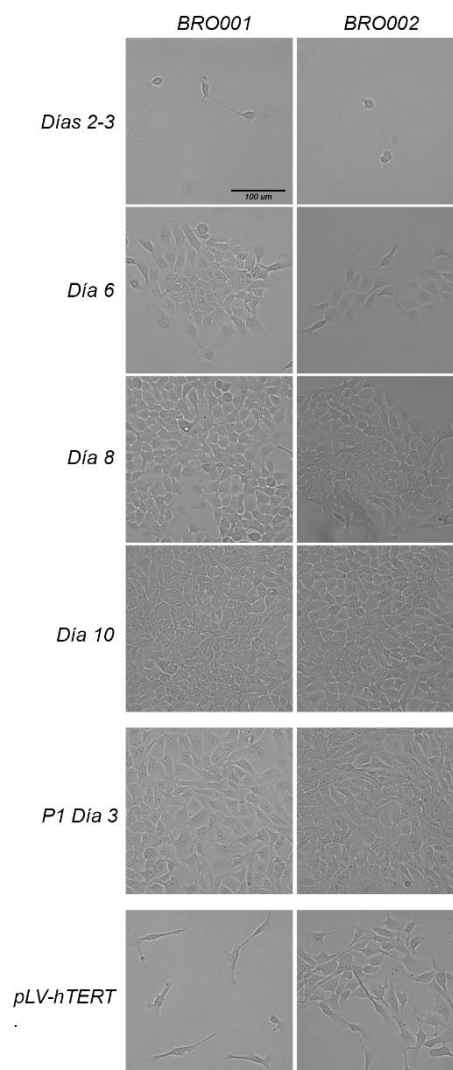
### **1.1 Inmortalización de células basales progenitoras procedentes de las vías respiratorias humanas**

Para obtener una línea celular inmortalizada de células basales de las vías respiratorias humanas, se utilizaron dos muestras procedentes de biopsias de bronquio de donantes sanos, BRO001 y BRO002, obtenidas a través del Biobanco del Área de Salud de Badajoz.

Uno de los métodos más utilizados para la obtención de líneas celulares inmortalizadas es la sobreexpresión o expresión exógena del gen que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT). Esto se debe a que esta enzima es la encargada del mantenimiento de la longitud de los telómeros cromosómicos durante la etapa proliferativa de las células. De hecho, se ha demostrado que, en las células germinales que presentan actividad telomerasa, la longitud de sus telómeros se mantiene estable durante toda su etapa proliferativa, mientras que, en las células somáticas adultas, que no poseen actividad de dicha enzima, la longitud de sus telómeros disminuye a medida que proliferan. De esta manera, existen numerosos trabajos en la bibliografía en los que mediante la transducción del gen *hTERT* a diferentes líneas celulares se conseguía alargar la esperanza de vida de las mismas *in vitro* y, además, conservar sus características fenotípicas y funcionales originales (Lee et al., 2004; Ramirez et al., 2004; Piao et al., 2005; Walters et al., 2013; Balducci et al., 2014).

En base a esto se decidió utilizar esta metodología para la inmortalización de las células madre basales. Para ello, en primer lugar, se iniciaron los cultivos celulares disgregando el tejido de origen mediante procesos enzimáticos y mecánicos según el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos. Tras el procesamiento inicial, las células obtenidas se expandieron en placas de cultivo convencionales y se mantuvieron en cultivo continuo durante diez días, monitorizando sus características morfológicas en el microscopio de contraste de fases (Figura RII.1). Una vez los cultivos alcanzaron una confluencia del 70-80% se les realizó un primer pase y se expandieron

durante siete días más. Transcurrido este tiempo, ambos cultivos se inmortalizaron mediante transducción lentiviral con vectores lentivirales producidos por células HEK293T cotransfectadas con un plásmido pLV que contenía la región codificante de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) y los vectores pMD2.G y psPAX2 (protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos). Tras la infección con las partículas lentivirales, los cultivos celulares se seleccionaron mediante el tratamiento con el antibiótico higromicina. Dado que la construcción empleada, además de portar el gen *hTERT*, contenía un gen que confería resistencia a dicho antibiótico, las células que sobrevivieron tras el periodo de selección y presentaban, además, características fenotípicas similares a las de las células parentales se mantuvieron en cultivo para su caracterización posterior.



**Figura RII.1: Aislamiento y generación de líneas inmortalizadas de células basales de las vías respiratorias humanas.** Imágenes de microscopía de contraste de fases de las células basales procedentes de biopsias de bronquio humano a lo largo de su cultivo y expansión y tras su inmortalización mediante transducción lentiviral. La barra de escala representa 100µm.

## **1.2 Obtención de clones aislados a partir de las células basales seleccionadas**

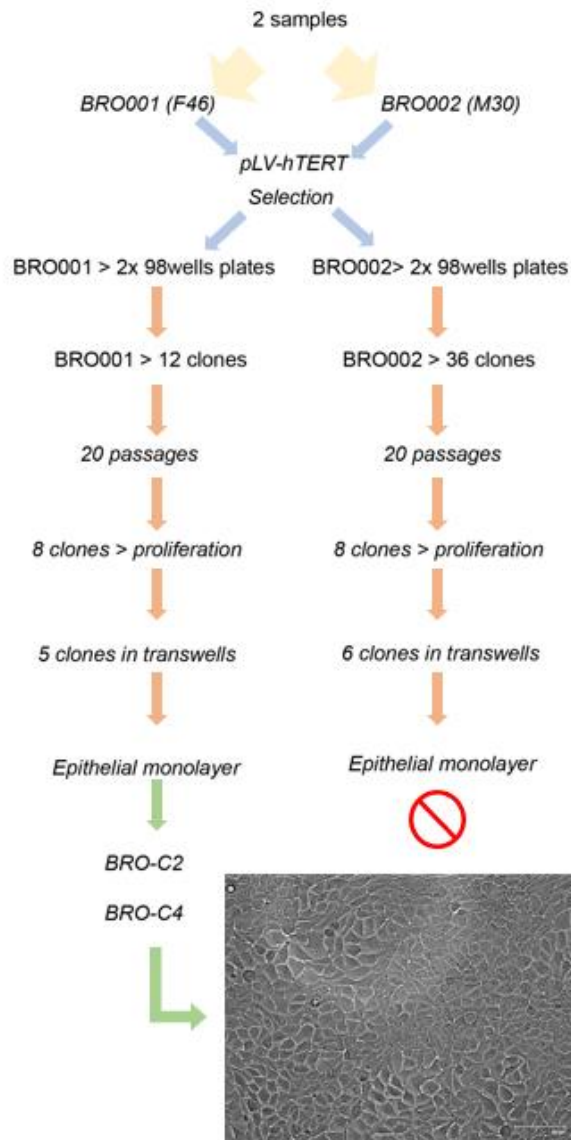
Para caracterizar las propiedades funcionales de las células basales tras su inmortalización y selección, se procedió, en primer lugar, al aislamiento de colonias discretas provenientes de una única célula inicial. Mediante la técnica de la dilución límite se sembraron dos placas de 96 pocillos para la muestra BRO001 y dos para la muestra BRO002 y se confirmó el origen clonal de cada colonia, en cada uno de los pocillos, mediante su observación al microscopio.

Las colonias obtenidas, además de un origen clonal, debían cumplir una serie de requisitos iniciales para poder llevar a cabo su caracterización posterior. De este modo, las células debían conservar su potencial de proliferación, características fenotípicas similares a las de las células progenitoras originales y, además, conseguir formar una monocapa celular perfecta tras su cultivo sobre transwells empleando el sistema ALI (procedimiento detallado en el apartado de materiales y métodos).

Tras la obtención de colonias aisladas, se evaluó, en primer lugar, su capacidad de división y expansión a lo largo de diferentes subcultivos. Aquellas colonias con un crecimiento anormalmente lento o con características fenotípicas aberrantes fueron descartadas. Tras esta primera selección, se procedió a su cultivo en sistema ALI y se evaluó su capacidad para formar una monocapa celular similar a la observada en el epitelio de las vías respiratorias.

Como se muestra en la figura RII.2, procedentes de las células inmortalizadas de la muestra original BRO001 se obtuvieron 12 clones inicialmente, de los cuales solo dos, BRO-C2 y BRO-C4, reunieron, finalmente, las características deseadas para su caracterización posterior. Con respecto a los clones obtenidos a partir de las células inmortalizadas BRO002, ninguno de ellos consiguió formar una monocapa celular que tapizara por completo la membrana porosa de los transwells sobre los que habían sido sembrados, quedando todos ellos descartados.





**Figura RII.2: Esquema de las colonias individuales obtenidas a partir de las células basales inmortalizadas y seleccionadas.** Imagen de microscopía de contraste de fases de la monocapa de células que forman los clones BRO-C2 y C4.

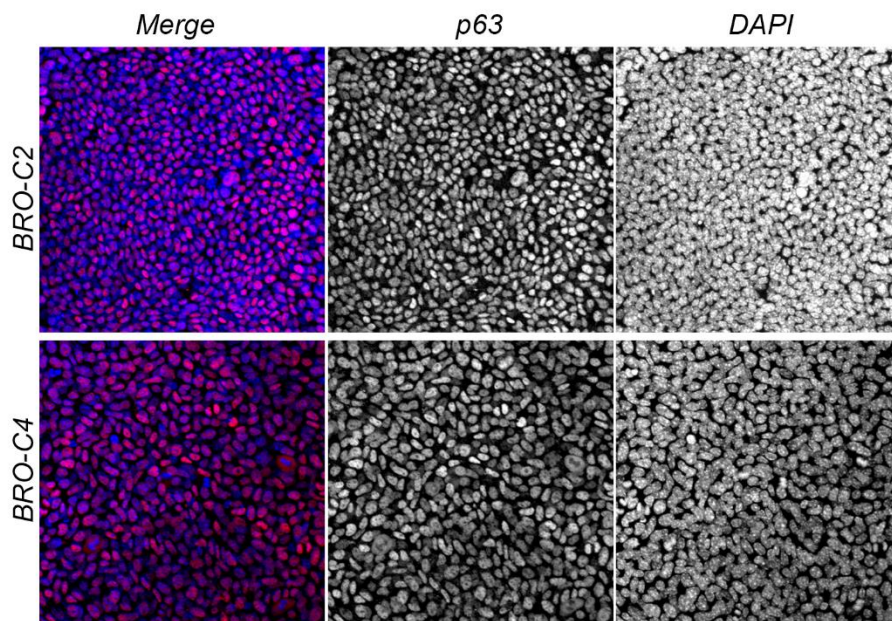
## 2. Caracterización del potencial de diferenciación de la línea celular a lo largo de diferentes subcultivos

Una vez obtenidas las dos líneas celulares tras ese primer cribaje, se procedió a su caracterización en condiciones de expansión y al estudio de la capacidad de diferenciación de ambas.

Una de las principales características de las células basales de las vías respiratorias son sus altos niveles de expresión de la proteína p63. Dicha proteína forma

parte de la familia de factores de transcripción de p53, estrechamente relacionados con procesos como el control del ciclo celular, la reparación de daños en el ADN o la apoptosis celular (Stiewe, 2007; Pietsch et al., 2008). En humanos es codificada por el gen *Tp63* y resulta fundamental para el desarrollo y mantenimiento de las células basales de multitud de tejidos epiteliales (Yang et al., 1999). De esta manera, se ha visto que ratones mutantes para esta proteína carecen de células basales en el epitelio pseudoestratificado de la tráquea (Daniely et al., 2004).

En base a esto, se decidió analizar, en primer lugar, la expresión de dicho marcador mediante inmunofluorescencia en las dos líneas celulares, en condiciones de expansión y una vez habían alcanzado la confluencia sobre los soportes tipo transwell. Como se muestra en la figura RII.3, los resultados obtenidos en el marcaje de inmunofluorescencia confirmaron la presencia de células p63 positivas en los cultivos inmortalizados.



**Figura RII.3: Niveles de la proteína p63 en las líneas inmortalizadas BRO-C2 y BRO-C4 en condiciones de expansión.** Imágenes de inmunofluorescencia de las células basales en las líneas inmortalizadas BRO-C2 y BRO-C4. En rojo aparece la señal correspondiente al marcador de células basales p63, y en azul el marcaje de los núcleos celulares con DAPI.

Tras confirmar que las células basales inmortalizadas eran positivas para el marcador p63, se procedió a evaluar el efecto del cultivo continuo sobre el potencial proliferativo y de diferenciación de las células inmortalizadas.

Para ello, se realizaron numerosos subcultivos de las células basales tanto de la línea BRO-C2 como de la línea BRO-C4, a lo largo de los cuales se estudiaron diferentes parámetros en condiciones de expansión y de diferenciación.

Con el objetivo de estudiar el estado proliferativo de las células basales de ambas líneas, se decidió monitorizar el tiempo en el cual un número determinado de células se duplicaba, parámetro conocido como *doubling time*. Para ello, los cultivos inmortalizados se mantuvieron durante tres semanas, cuantificando el número de células colectadas en cada uno de los pases realizados. En un experimento paralelo, se comprobó el *doubling time* en las células basales primarias no inmortalizadas para comparar sus tiempos de duplicación.

Así mismo, para evaluar el estado proliferativo de las células se analizó, también, su capacidad para formar cultivos tridimensionales denominados organoides, que consisten en esferas procedentes de una única célula basal. Para realizar estos experimentos, se individualizaron los cultivos de las células basales inmortalizadas y se hicieron crecer en una matriz extracelular, como se detalla en el apartado de materiales y métodos, durante 21 días, a lo largo de los cuales se tomaron diversas imágenes de microscopía de contraste de fases.

Para comprobar si las células basales inmortalizadas y cultivadas *in vitro* tenían la capacidad de diferenciarse en las distintas poblaciones celulares que componen el epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias, a lo largo de los sucesivos subcultivos, se expandieron en placas de cultivo convencionales, y posteriormente se sembraron sobre soportes tipo *transwell*, como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Una vez confluentes, el medio de la parte superior del *transwell* se retiró, y el de la cámara inferior fue sustituido por medio ALI (*Air Liquid Interface*), que promueve la diferenciación de las células progenitoras del sistema respiratorio. En humanos, este proceso de diferenciación del epitelio respiratorio, *in vitro*, se completa tras 21 días en medio ALI. Transcurrido este tiempo, se analizó mediante inmunofluorescencia la

expresión de marcadores característicos de las poblaciones de células basales y multiciliadas del epitelio respiratorio. Para la localización de las células basales se emplearon anticuerpos frente a la proteína p63, ya mencionada con anterioridad. Para el marcaje de las células multiciliadas se utilizó el factor de transcripción FOXJ1, esencial para la formación de los cilios al promover el anclaje de los cuerpos basales y la formación de los axonemas (Gomperts et al., 2004).

Por otro lado, para evaluar la integridad de la monocapa celular formada por las células epiteliales, se midió la resistencia eléctrica transepitelial (*Transepithelial Electrical Resistance, TEER*) a lo largo de la diferenciación de estas células, en los diferentes subcultivos. Para ello, se emplearon dos electrodos, uno colocado en la cámara inferior del pocillo *transwell*, y otro en la cámara apical o superior, y posteriormente se aplicó una corriente eléctrica para comprobar la resistencia que ofrecía el cultivo al paso de esta.

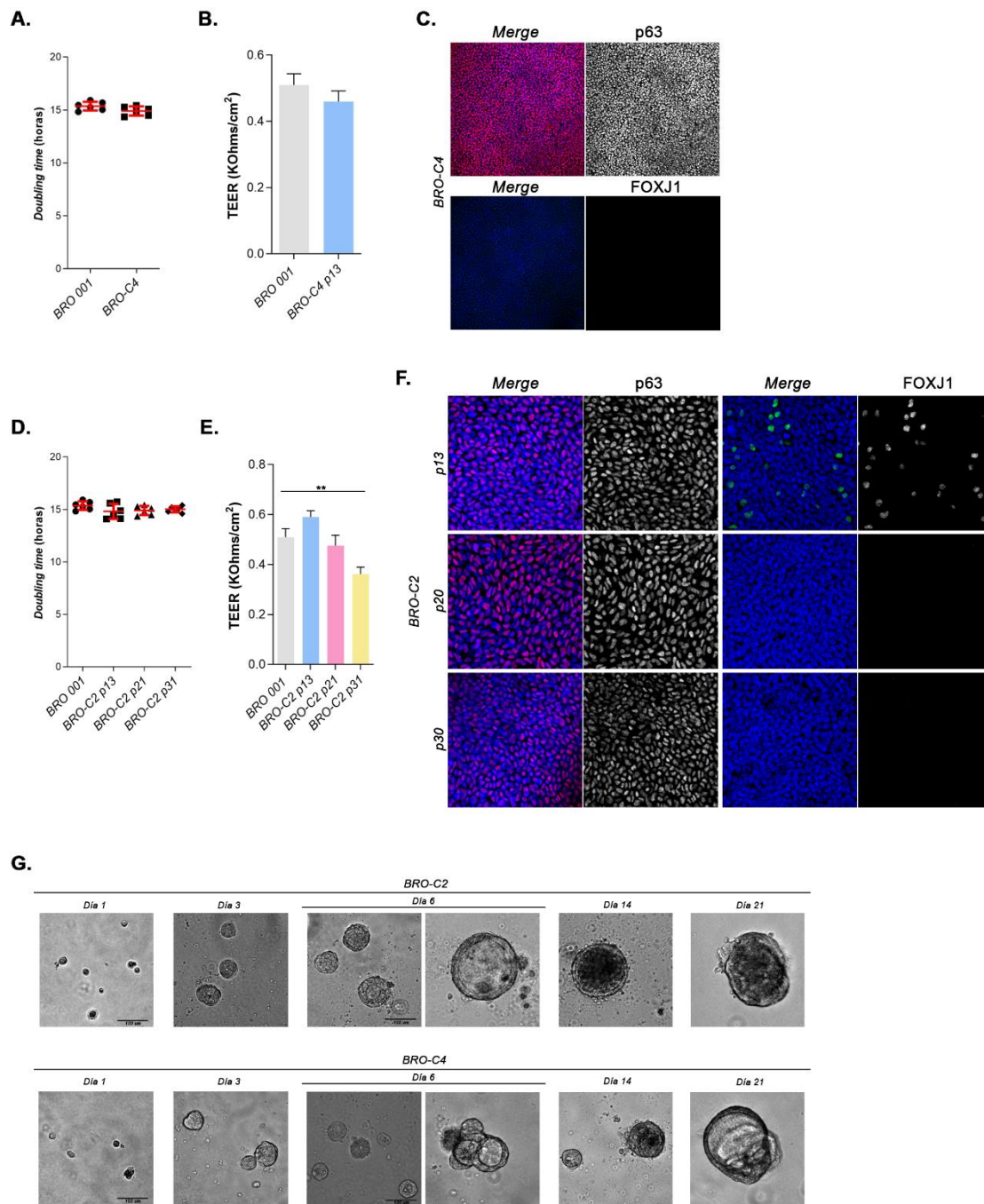
Como se recoge en la figura RII.4, tras los primeros 13 pases se decidió continuar, únicamente, con la caracterización de la línea BRO-C2. Se tomó esta decisión al observar que, mientras que las células de la línea BRO-C2 conservaban su capacidad de diferenciación a células multiciliadas en dicho pase, en paralelo, los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia para la línea BRO-C4 no revelaron presencia alguna de células positivas para FOXJ1 (Figura RII.4C). No obstante, el análisis del tiempo de duplicación de las células de esta línea no mostró diferencias significativas con respecto a los datos obtenidos para las células basales progenitoras no inmortalizadas (Figura RII.4A). Esto sugeriría que, a pesar de no conservar su potencial de diferenciación, las células BRO-C4 mantendrían su capacidad proliferativa, dividiéndose y expandiéndose a un ritmo similar al de las células basales parentales. De igual modo, los valores de resistencia transepitelial obtenidos para esta línea fueron muy similares a los encontrados en las células BRO 001 (Figura RII.4B).

Respecto a la línea BRO-C2, como se puede observar en la figura RII.4D, el análisis del *doubling time* no reveló diferencias significativas entre los diferentes pases, ni con respecto a las células basales progenitoras no inmortalizadas. Estos resultados, al igual que ocurría con las células BRO-C4, indicarían que la tasa de proliferación celular de esta línea no se vería afectada por los sucesivos subcultivos celulares.

En cuanto al análisis de los datos de resistencia transepitelial, como se puede observar en el panel E de la figura RII.4, se produjo una bajada paulatina de los valores de TEER a lo largo de los diferentes subcultivos, siendo significativa la diferencia encontrada entre los valores obtenidos para las células basales no inmortalizadas y las células inmortalizadas en pase 30 (BRO-C2 p30). Esto sugeriría una disminución de la integridad de la monocapa celular a medida que se incrementa el número de pases celulares.

Con relación a su capacidad de diferenciación, como se ha comentado con anterioridad, a diferencia de lo observado en la línea BRO-C4, el marcaje de inmunofluorescencia de estas células BRO-C2 en pase 13 confirmó la presencia, aunque en baja proporción, de células multiciliadas. Por el contrario, el análisis del marcador FOXJ1 no mostró diferenciación a células multiciliadas ni en las células del subcultivo número 20, ni en las que se encontraban en pase 30 (Figura RII.F). Los resultados obtenidos indicarían una pérdida paulatina del potencial de diferenciación de estas células BRO-C2 conforme aumenta el número de subcultivos celulares.

Además, como aparece reflejado en el panel G de la figura RII.4, se consiguieron obtener organoides procedentes de las células aisladas e individualizadas tanto de la línea BRO-C2 como de la BRO-C4, reflejo del potencial proliferativo de las células de ambas líneas.



**Figura RII.4: Caracterización del potencial proliferativo y de la capacidad de diferenciación de las líneas inmortalizadas BRO-C2 y BRO-C4 a lo largo de sucesivos subcultivos celulares.** (A) cuantificación del tiempo de duplicación o *doubling time* de las células basales de la línea inmortalizada BRO-C4. (B) Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medida en ALI 21 en los cultivos BRO-C4. (C) Imágenes de microscopía confocal para el marcaje de células basales (p63, en rojo), de células multiciliadas (FOXJ1 en verde) y núcleos (DAPI, azul) en los cultivos BRO-C4. (D) tiempo de duplicación o *doubling time* de las células basales de la línea inmortalizada BRO-C2. (E) Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medida en ALI 21 en los cultivos BRO-C2. (F) Análisis de inmunofluorescencia de las poblaciones de células basales (p63, en rojo) y multiciliadas (FOXJ1 en verde) del epitelio respiratorio en los cultivos BRO-C2. (G) Imágenes de microscopía de campo claro representativas de organoides cultivados a partir de las células inmortalizadas BRO-C2 y BRO-C4. \*\* p < 0,01.

## 2.1 IL6 promueve la diferenciación de las células basales a células multiciliadas

Numerosos estudios han demostrado una importante labor de IL6 en el mantenimiento de la homeostasis en el tejido respiratorio, al favorecer su mantenimiento y reparación. Existen diversas evidencias de que esta citoquina influye en el patrón de diferenciación de las células basales del epitelio de las vías respiratorias. De este modo, se ha visto que la activación de la señalización IL6/JAK/STAT favorece la ciliogénesis al promover la expresión de genes implicados en dicho proceso como son *Mcidas* o *FoxJ1* e inhibir la vía de señalización de Notch (Tadokoro et al., 2014; Dawson et al., 2021).

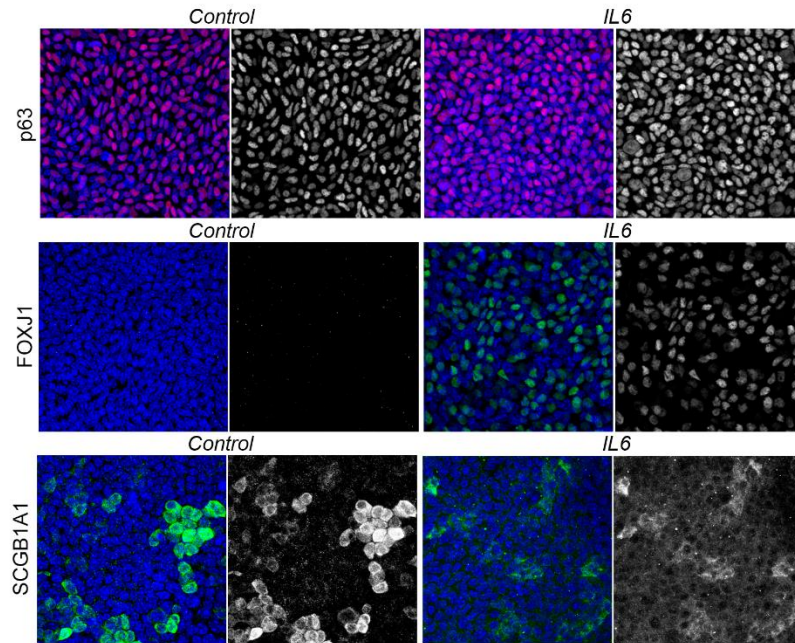
En base a esto se procedió a estudiar el papel de IL6 en la diferenciación de las células basales BRO-C2, tanto en los subcultivos que se encontraban en pase 13, como en los que estaban en pase 21. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a los subcultivos en pase 21.

Se realizó el tratamiento de las células con IL6 recombinante humana durante todo el proceso de diferenciación, y se caracterizó la abundancia y distribución de las diferentes poblaciones de células características del epitelio de las vías respiratorias en el cultivo *in vitro*, mediante el marcaje de inmunofluorescencia de las proteínas p63 y FOXJ1, ya mencionadas con anterioridad, y SCGB1a1, marcador característico de la población de células secretoras, con el objetivo de comparar los resultados con los cultivos no tratados con la proteína (control).

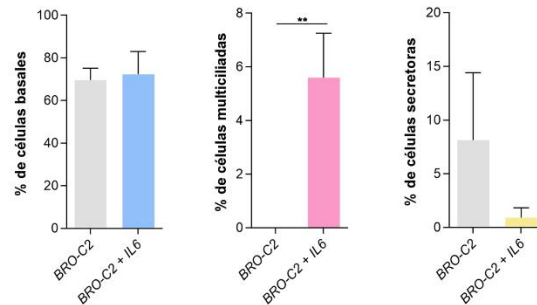
Como se puede observar en la figura RII.5A y B, la cuantificación de las imágenes de inmunofluorescencia de células positivas para p63 no mostró diferencias significativas en la población de células basales entre los cultivos tratados con proteína IL6 y los cultivos no tratados. En lo relativo a las células multiciliadas, el tratamiento con esta citoquina provocó un incremento muy significativo en el número de células multiciliadas diferenciadas, en consonancia con lo descrito en la bibliografía. En cuanto a las células secretoras, el tratamiento con IL6 redujo notablemente su población con respecto a los cultivos no tratados.

Estos resultados demostrarían que el tratamiento con proteína IL6 recombinante promueve la diferenciación de las células progenitoras basales de las vías respiratorias humanas a células multiciliadas.

A.



B.



**Figura RII.5: Abundancia relativa de las poblaciones celulares del epitelio respiratorio en cultivos tratados y no tratados con proteína IL6 recombinante que se encontraban en fase 21.** (A) Imágenes de inmunofluorescencia de los marcadores para células basales (p63), multiciliadas (FOXJ1) y secretoras (SCGB1A1) en cultivos diferenciados tratados con IL6 y sin tratar (control). (B) Cuantificación de la abundancia relativa de células basales, multiciliadas y secretoras en las imágenes obtenidas por microscopía confocal. \*\*  $p < 0,01$ .

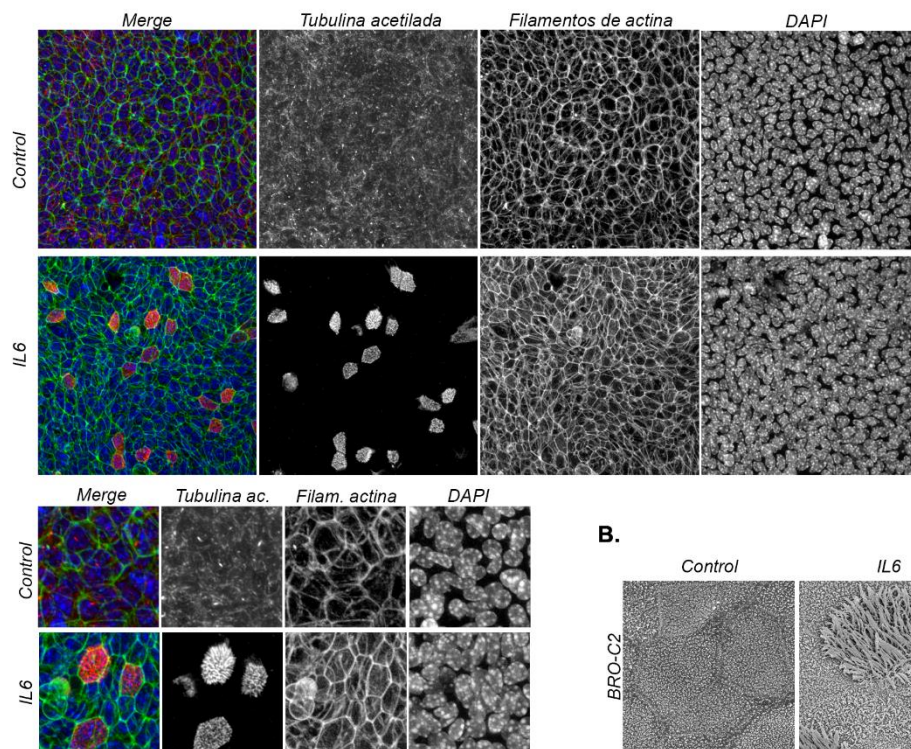
Dado los resultados obtenidos, se decidió caracterizar los cilios de las células multiciliadas que habían conseguido diferenciarse en presencia de IL6. Para ello, se analizó su morfología mediante marcaje de inmunofluorescencia para tubulina acetilada, componente estructural del axonema del cilio. El contorno celular se delimitó



con el marcaje de filamentos de actina mediante el uso de faloidina conjugada con fluoróforos. Y, además, se adquirieron imágenes de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron microscopy, SEM*) de estos cultivos.

Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias (figura RII.6A), revelaron que los cilios de las células multiciliadas diferenciadas en presencia de IL6, presentaban la distribución y abundancia características de esta población celular. Así mismo, se observó. que en ausencia de IL6 había señal de tubulina acetilada, probablemente correspondiente al centriolo, sin embargo, no encontramos diferenciación a células ciliadas. Por el contrario, el tratamiento con IL6 sí promovió que una fracción de las células basales se diferenciaron en células ciliadas, tal y como lo demuestra la presencia de multitud de marca de tubulina acetilada en una célula que correspondería a los cuerpos basales de cada cilio. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido permitieron estudiar en más detalle la morfología de dichos cilios, no encontrándose aberraciones en ellos (figura RII.6B). Por otro lado, en consonancia con los resultados obtenidos del marcaje de FOXJ1 (figura RII.5) y de la tubulina acetilada en las muestras control, el análisis por microscopía electrónica de barrido no reveló presencia de células multiciliadas en los cultivos no tratados con proteína IL6.

**A.**



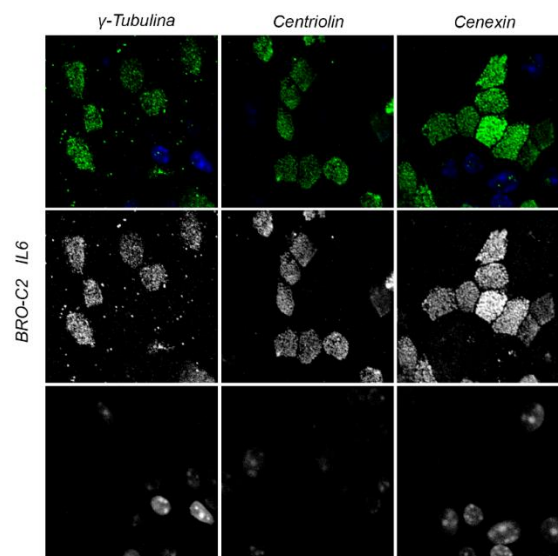
**Figura RII.6: Marcaje de inmunofluorescencia para la detección de células multiciliadas y análisis de la morfología de los cilios en células diferenciadas en presencia de IL6. (A)** Imágenes de microscopía confocal de células multiciliadas mediante el marcaje de Tubulina acetilada (rojo) y actina (verde) en cultivos diferenciados in vitro tratados y no tratados (control) con IL6 recombinante humana. En verde marcaje de actina y en rojo marcaje de tubulina acetilada. (B) Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de la morfología de los cilios.

Tras el estudio morfológico de los cilios de las células multiciliadas diferenciadas en presencia de IL6, se procedió a evaluar su funcionalidad. Se analizó, mediante inmunofluorescencia, la expresión de proteínas estructurales implicadas en el ensamblaje y motilidad de los cilios. De este modo, se emplearon anticuerpos específicos frente a  $\gamma$ -tubulina, presente en los centrosomas y cuerpos basales, centriolina, localizada en los centrosomas y esencial para la maduración y el correcto funcionamiento de los cilios y cenexina, implicada en el posicionamiento y orientación de los centrosomas.

Además, se midió la frecuencia de batido de los cilios, lo que se conoce como *cilia beating*, empleando para ello un software específico desarrollado en el laboratorio.

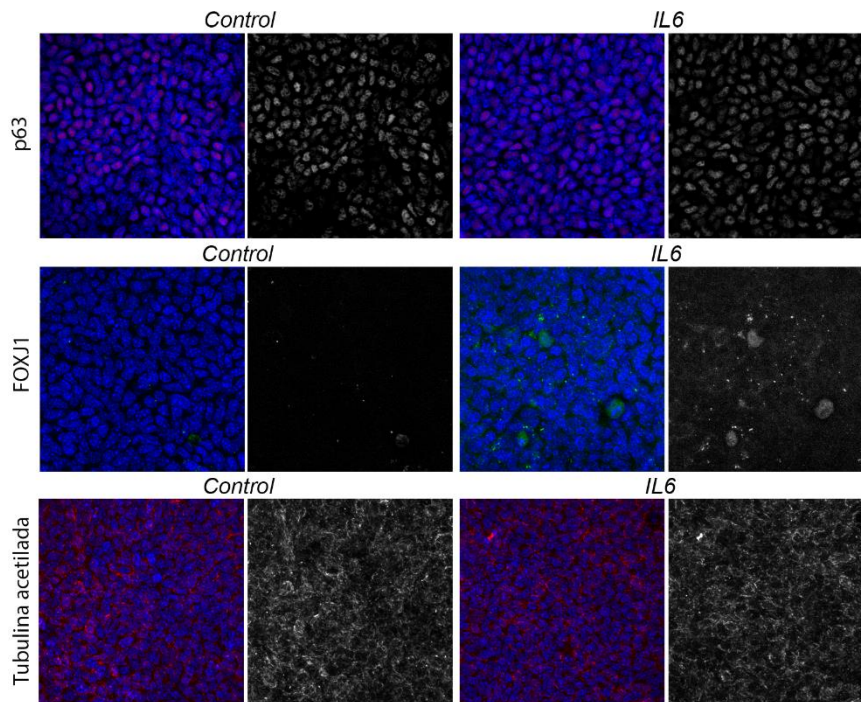
Como se muestra en la figura RII.7, las imágenes de inmunofluorescencia reflejaron la presencia de células multiciliadas positivas para las proteínas estructurales antes mencionadas,  $\gamma$ -tubulina, centriolina y cenexina, en los cultivos tratados con proteína IL6 recombinante. Sin embargo, el análisis de la frecuencia de batido de los cilios en estos cultivos no permitió detectar movilidad en ellos.

**Esto indicaría que, a pesar de que IL6 induce la diferenciación de las células basales inmortalizadas, los cilios de las células multiciliadas diferenciadas no conservan su funcionalidad.**



**Figura RII.7: Marcaje de inmunofluorescencia para el análisis de la funcionalidad de los cilios en células diferenciadas en presencia de IL6.** Imágenes de microscopía confocal de las inmunofluorescencias para  $\gamma$ -tubulina, centriolina y cenexina en cultivos diferenciados in vitro tratados con IL6 recombinante humana.

Dado que IL6 promovía la diferenciación de las células basales a células multiciliadas en los cultivos en fase 21, se decidió estudiar si en subcultivos posteriores dicha citoquina podía también inducir ciliogénesis. Para ello, se procedió de la misma forma que con los subcultivos con menor número de pases. Las células se diferenciaron en presencia de proteína IL6 recombinante y transcurrido este periodo de diferenciación, se analizaron mediante inmunofluorescencia los marcadores específicos, ya mencionados, de las poblaciones de células basales (p63) y de células multiciliadas (FOXJ1 y tubulina acetilada).



**Figura RII.8: Abundancia relativa de las poblaciones de células basales y multiciliadas del epitelio respiratorio en cultivos en fase 31, diferenciados en presencia de proteína IL6 recombinante.** Imágenes de inmunofluorescencia de los marcadores para células basales (p63) y multiciliadas (FOXJ1 y tubulina acetilada) en cultivos tratados con IL6 y sin tratar (control). En rojo aparece la señal correspondiente al marcador de células basales p63, y a la tubulina acetilada, en verde la correspondiente a FOXJ1 y en azul, el marcaje de los núcleos celulares con DAPI.

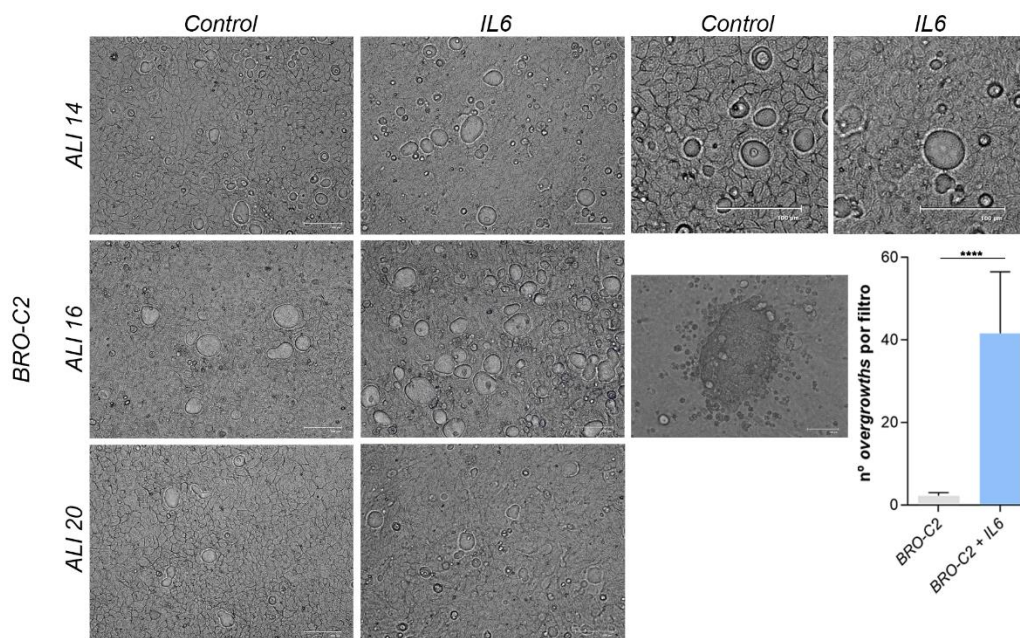
Como se puede observar en la figura RII.8, el tratamiento con IL6 no alteró la abundancia relativa de células basales, atendiendo al marcador p63. Por otro lado, al contrario de lo esperado, los resultados obtenidos en el marcaje de inmunofluorescencia de FOXJ1 no reveló la presencia de células multiciliadas en los cultivos, ni en las muestras control ni en las muestras diferenciadas en presencia de proteína IL6 recombinante. Resultado que fue confirmado con el marcaje de la de tubulina acetilada en estas mismas muestras.

**Estos resultados reflejarían, por tanto, que el tratamiento con IL6 promueve la diferenciación de las células basales a células multiciliadas en la línea inmortalizada pero solo en subcultivos tempranos.**

## 2.2 IL6 promueve la pseudoestratificación del epitelio de las vías respiratorias humanas

A pesar de que el tratamiento con proteína IL6 recombinante no fue suficiente para inducir la diferenciación de las células basales hacia células multiciliadas en los subcultivos con elevado número de pases, la caracterización fenotípica de estos permitió observar diferencias en cuanto a la proliferación celular, al comparar los cultivos tratados con la citoquina y los cultivos no tratados. El análisis de las imágenes de microscopía de contraste de fases adquiridas a lo largo de la diferenciación de las células mostró que el tratamiento con IL6 recombinante inducía, en mayor medida, el sobrecrecimiento celular en forma de agregados o domos (figura RII.9).

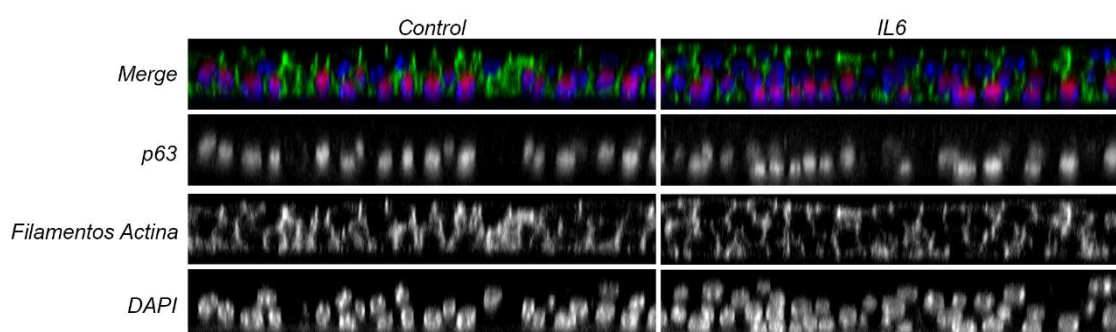
**Los resultados obtenidos sugerirían que el tratamiento con proteína IL6 recombinante podría promover una mayor actividad proliferativa de las células, al menos, en subcultivos con elevado número de pases.**



**Figura RII.9: Caracterización fenotípica de cultivos de células basales del epitelio respiratorio durante su diferenciación.** Imágenes de microscopía de contraste de fases de los cultivos de células basales tratados con IL6 y sin tratar (control) durante su proceso de diferenciación, y cuantificación del número de agregados celulares o domos encontrados en dichos cultivos.

Además, el análisis detallado de las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas de los marcajes de los núcleos con DAPI y de las células basales con p63, reveló que el tratamiento con proteína IL6 recombinante promovía la pseudoestratificación de la monocapa celular, encontrándose mayor número de núcleos celulares a diferentes alturas en los cultivos tratados con la citoquina, al ser comparados con los cultivos controles no tratados (figura RII.10).

**Estos resultados sugerirían que el tratamiento con IL6 induce una mayor proliferación celular y favorece la pseudoestratificación del epitelio respiratorio.**



**Figura RII.10: Análisis de la pseudoestratificación del epitelio en cultivos diferenciados en presencia de proteína IL6 recombinante.** Imágenes de inmunofluorescencia obtenidas de los marcajes de los núcleos con DAPI y de las células basales con p63.

### **2.3 El bloqueo de la ruta de Notch no promueve la diferenciación de las células basales inmortalizadas en subcultivos tardíos**

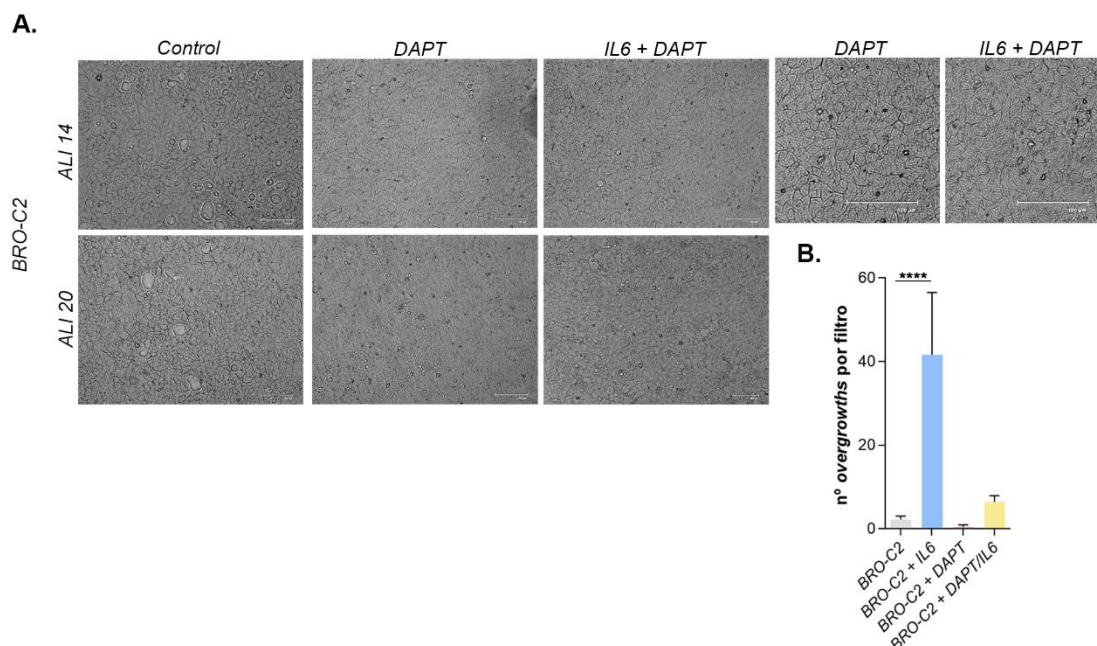
Como se describió en la introducción, diversos estudios muestran que la ruta de Notch desempeña un importante papel en el equilibrio entre las poblaciones de células multiciliadas y secretoras que se originan a partir de los precursores basales p63+/KRT5+ (Rock et al., 2011). De esta manera, se ha visto que niveles elevados de Notch promueven la diferenciación hacia células secretoras, mientras que niveles más bajos favorecen la diferenciación de células multiciliadas (Tsao et al., 2009). En el epitelio que tapiza las vías respiratorias, la regulación de la activación de la ruta de Notch modula el balance entre los diferentes tipos celulares. Cuando la ruta se encuentra inhibida, la población de células multiciliadas se expande a expensas del linaje secretor, por el contrario, la sobreactivación de dicha vía de señalización provoca una

sobrerrepresentación de células secretoras en el epitelio, en detrimento de las células multiciliadas (Guseh et al., 2009; Morimoto et al., 2010). Además, se ha demostrado que las células basales mantienen el equilibrio entre las poblaciones de células multiciliadas y secretoras a través de la secreción constante de ligandos de la ruta de Notch. Regulación que puede ser modulada mediante la inhibición farmacológica de la ruta, utilizando inhibidores como DAPT, que promueven la diferenciación de las células multiciliadas (Konishi et al., 2016).

En base a esto, y dado que el tratamiento con IL6 no fue suficiente para promover la diferenciación de las células basales en los subcultivos tardíos, se decidió comprobar si el bloqueo de la ruta de Notch podría favorecer la diferenciación de las células basales inmortalizadas hacia células multiciliadas, en estos cultivos con elevado número de pases. Para ello, las células fueron tratadas durante todo el proceso de diferenciación con el inhibidor DAPT o con la combinación de este inhibidor de la ruta de Notch y proteína IL6 recombinante, con el objetivo de comparar estos resultados con los obtenidos del tratamiento de las células con la citoquina (Figuras RII.9 y 10).

A lo largo de todo el tratamiento con dichos compuestos se tomaron imágenes de microscopía de contraste de fases para evaluar el crecimiento de las células y, finalizado el proceso de diferenciación, se realizaron marcajes de inmunofluorescencia para caracterizar la abundancia relativa de las poblaciones de células basales y multiciliadas.

Como se puede observar en la figura RII.11A, la caracterización fenotípica del cultivo durante su diferenciación mostró que el tratamiento de las células con DAPT bloqueaba por completo el crecimiento celular en domos observado en los cultivos tratados con proteína IL6 recombinante (Figura RII.9). Además, el tratamiento combinado de los cultivos celulares con DAPT e IL6 consiguió revertir, notablemente, el efecto provocado por el tratamiento con dicha citoquina en la proliferación de las células. De esta manera, el número de agregados celulares encontrados en los cultivos tratados con DAPT fue similar al observado en los cultivos controles no tratados. Así mismo, el cotratamiento con DAPT e IL6 redujo de manera significativa el número de agregados celulares con respecto a los hallados en los cultivos tratados únicamente con proteína IL6 recombinante (figura RII.11B).



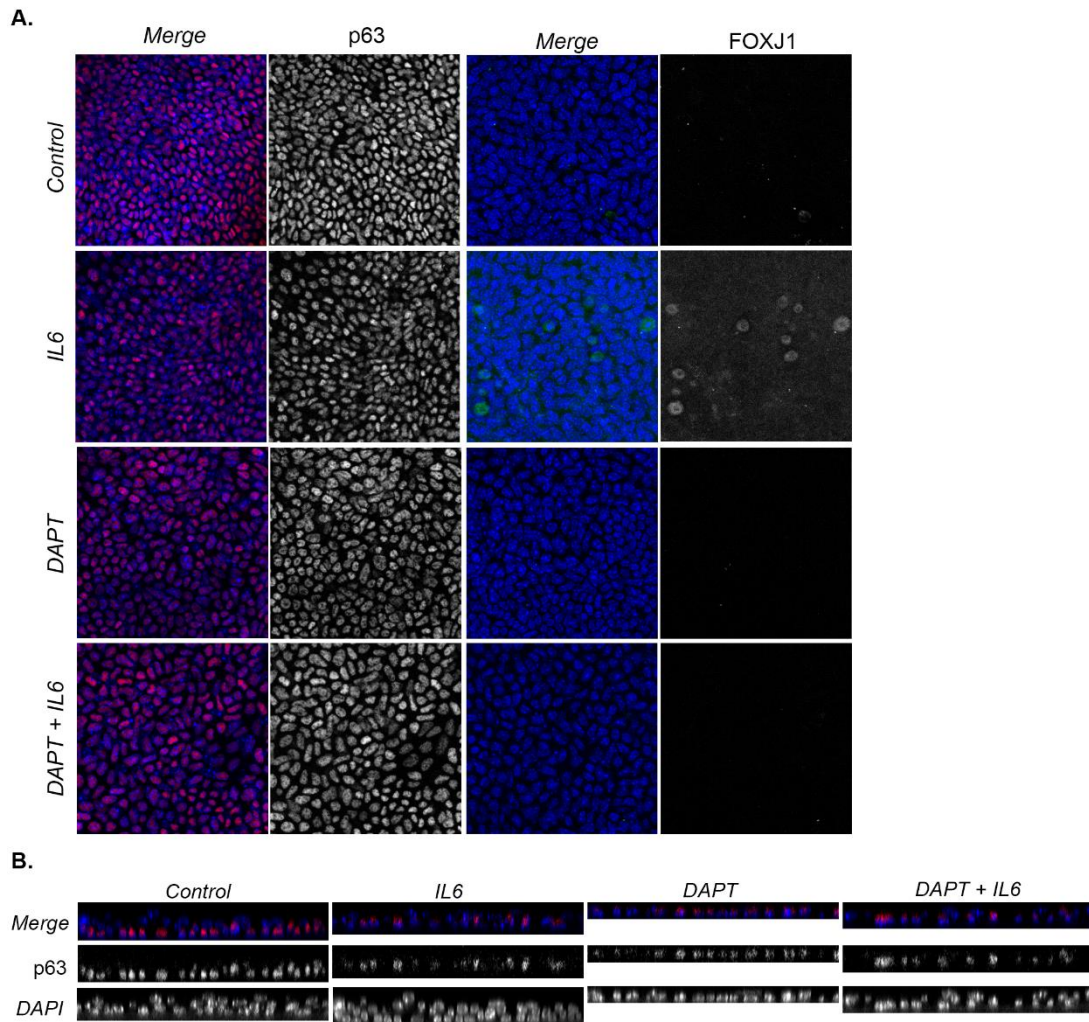
**Figura RII.11: Caracterización fenotípica de cultivos de células basales del epitelio respiratorio durante su diferenciación.** (A) Imágenes de microscopía de contraste de fases de cultivos de células basales durante su diferenciación en presencia de DAPT o DAPT/IL6. (B) Cuantificación del número de domos celulares encontrados en los cultivos celulares diferenciados tratados con IL6, DAPT o DAPT/IL6 o sin tratar (control).

El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia no mostró diferencias significativas en cuanto a la población de células basales entre las diferentes condiciones. Por otro lado, los resultados obtenidos del marcaje de inmunofluorescencia de FOXJ1 no revelaron la presencia de células multiciliadas, ni en las muestras control ni en las muestras diferenciadas en presencia de DAPT o de DAPT e IL6 combinados (Figura RII.12A). Estos resultados indican, por tanto, que el bloqueo de la ruta de Notch no fue suficiente, tampoco, para promover la diferenciación de las células basales inmortalizadas hacia células multiciliadas.

Respecto al efecto del bloqueo de la ruta de Notch sobre la pseudoestratificación del epitelio, se observó que el tratamiento con el inhibidor DAPT provocó un notable descenso en el número de núcleos encontrados a diferentes alturas, en comparación con los cultivos controles y los diferenciados en presencia de proteína IL6 recombinante. De hecho, la combinación de ambos compuestos, DAPT e IL6, consiguió revertir, en parte, la pseudoestratificación promovida por el tratamiento con la citoquina (Figura



R11.12B). Estos resultados indicarían que el bloqueo de la ruta de Notch tiene un efecto negativo sobre la pseudoestratificación del epitelio respiratorio.



**Figura R11.12: Efecto del tratamiento con IL6, DAPT o DAPT/IL6 sobre la abundancia relativa de las poblaciones de células basales y multiciliadas, y sobre la pseudoestratificación del epitelio respiratorio.** (A) Imágenes de inmunofluorescencia de los marcadores para células basales (p63) y multiciliadas (FOXJ1) en cultivos diferenciados tratados con IL6, DAPT o DAPT/IL6 o sin tratar (control). (B) Análisis de la pseudoestratificación del epitelio en las condiciones experimentales indicadas.



## **DISCUSIÓN II**



De entre la multitud de funciones fisiológicas que la citoquina IL6 desempeña, su papel en el tejido respiratorio ha cobrado gran relevancia en los últimos años. La alta prevalencia en la población mundial de patologías relacionadas con dicho sistema, así como la aparición de otras nuevas como la COVID-19, han puesto de manifiesto la necesidad de profundizar en el conocimiento acerca de los factores que participan en el mantenimiento de la homeostasis de este tejido.

### **1. IL6 promueve la diferenciación de las células basales a células multiciliadas**

Existen numerosas evidencias de la importante labor de la citoquina IL6 en la regeneración y diferenciación del epitelio que tapiza las vías respiratorias. En vertebrados, este epitelio constituye una barrera fundamental frente a la entrada de patógenos, partículas inhaladas o contaminantes, y el mantenimiento de su integridad resulta esencial para la limpieza mucociliar de las vías respiratorias y la eliminación de la mucosidad y los patógenos y partículas atrapadas (Tadokoro et al., 2014). Como ya se ha comentado con anterioridad, el epitelio pseudoestratificado que reviste las vías respiratoria está constituido, fundamentalmente, por células basales, secretoras y multiciliadas, dispuestas en agrupaciones a modo de mosaico. Para que este epitelio lleve a cabo de manera correcta su función fisiológica es necesario que estas poblaciones celulares que lo componen se mantengan balanceadas. De este modo, numerosos estudios han demostrado que alteraciones en el equilibrio entre los diferentes tipos celulares que forman parte de él pueden provocar infecciones agudas, y dar lugar a la aparición de diversas patologías como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la fibrosis quística (Cardoso, 2001; Hogan et al., 2014).

La regeneración de este complejo epitelio conlleva una respuesta celular coordinada por parte de las células basales progenitoras que lo componen. Estas células tienen capacidad para autorrenovarse y diferenciarse en el resto de los tipos celulares presentes en el epitelio, restaurando así su funcionalidad (Parekh et al., 2020; Dawson et al., 2021). Dichas actividades regenerativas se encuentran estrechamente moduladas por una amplia red de vías de señalización, cuya desregulación está asociada a

patologías pulmonares como el cáncer o el asma (Leeman et al., 2014; Dawson et al., 2021).

De entre las diferentes vías de señalización implicadas en la regulación del proceso de diferenciación del linaje de células basales progenitoras se ha visto, precisamente, que la señalización de STAT3 mediada por IL6 favorece la generación de células multiciliadas sobre la población de células secretoras (Tadokoro et al., 2014). Trabajos llevados a cabo con células progenitoras de la tráquea de ratón han demostrado que la delección condicional en las células basales de SOC3, regulador negativo de la vía de señalización de STAT3, da lugar a un aumento significativo de las células multiciliadas en el epitelio, a expensas del resto de tipos celulares que lo componen (Tadokoro et al., 2014). Por otro lado, el uso de ratones defectivos para *IL6* ha mostrado una menor diferenciación de las células basales del epitelio respiratorio hacia células multiciliadas, tras producirse una lesión pulmonar. Así mismo, resultados descritos en la bibliografía reflejan que la activación de la señalización IL6/STAT3 promueve la ciliogénesis en cultivos de células basales procedentes de tejido respiratorio de ratón. De esta manera, se ha descrito que la unión de IL6 a su receptor de membrana IL6-R $\alpha$  y a su correceptor transmembrana gp130 permite la activación de proteínas JAK y la fosforilación y traslocación al núcleo de STAT3. Una vez fosforilada, dicha proteína se une a la región promotora de genes implicados directamente en la regeneración del epitelio y la multiciliogénesis, tales como *NOTCH1*, *MCIDAS* y *FOXJ1* regulando su expresión y promoviendo la diferenciación de las células basales hacia células multiciliadas, a expensas del linaje secretor (Tadokoro et al., 2014). Coincidiendo con los resultados obtenidos de estos trabajos, se demostró que la expresión de Stat3 y gp130 desempeña una importante labor en el mantenimiento de la homeostasis epitelial (Hokuto et al., 2004; Kida et al., 2008). Experimentos con ratones en los que se habían eliminado selectivamente de las células epiteliales respiratorias los genes que codifican para STAT3 o gp130 mostraron una restauración incompleta del epitelio respiratorio, tras la inducción de daño pulmonar mediante la administración de naftaleno; resultados que contrastaban con lo observado en los ratones control, en los cuales la restauración de las poblaciones de células ciliadas y no ciliadas tenía lugar

inmediatamente después de que se produjeran las lesiones en el epitelio respiratorio (Kida et al., 2008).

Todos estos hallazgos ponen de manifiesto, por tanto, que la citoquina IL6 y sus vías de señalización asociadas juegan un papel determinante en el desarrollo de las vías respiratorias, regulando la composición celular del epitelio pseudoestratificado que las reviste.

Coincidiendo con lo descrito en la bibliografía, nuestros resultados muestran que la citoquina IL6 es capaz de promover la diferenciación de las células basales de las vías respiratorias humanas. En este segundo capítulo de tesis se generó una línea inmortalizada de células basales procedentes de muestras de bronquio humano, con el objetivo de estudiar el papel fisiológico de la citoquina IL6 en el epitelio pseudoestratificado que reviste las vías respiratorias humanas. La caracterización de las propiedades funcionales de la línea celular tras su inmortalización y selección mostró que las células basales conservaban su capacidad proliferativa a largo plazo, obteniéndose tiempos de duplicación celular en los diferentes subcultivos similares a los observados en las células basales progenitoras no inmortalizadas. Sin embargo, el análisis de su potencial de diferenciación reflejó una pérdida paulatina de la capacidad de diferenciación de las células basales inmortalizadas a medida que se incrementaba el número de pases celulares realizados. La adición exógena de proteína IL6 recombinante a los cultivos celulares durante su proceso de diferenciación consiguió amortiguar, parcialmente, esa disminución del potencial de diferenciación de las células basales. De este modo, se observó que el tratamiento con la citoquina estimulaba la generación de células ciliadas frente a células secretoras a partir de las células basales. El análisis detallado de los marcadores de las diferentes poblaciones celulares del epitelio respiratorio mediante inmunofluorescencia reveló un aumento muy significativo en el número de células multiciliadas diferenciadas, atendiendo a la expresión de la proteína FOXJ1, utilizada como marcador de esta población celular, en aquellos cultivos diferenciados en presencia de proteína IL6. De forma similar a los resultados descritos en la bibliografía, junto con este incremento en la población de células multiciliadas se observó un descenso notable en el número de células secretoras en estos mismos cultivos. Sin embargo, el análisis morfológico y funcional de las células multiciliadas

diferenciadas en presencia de la citoquina IL6 mostró que, a pesar de que dichas células expresaban proteínas estructurales implicadas en el correcto ensamblaje y motilidad de los cilios tales como tubulina acetilada,  $\gamma$ -tubulina, centriolina y cenexina, dichos cilios carecían de funcionalidad.

Por otro lado, se observó que, en subcultivos con elevado número de pases el tratamiento con proteína IL6 recombinante no fue suficiente para promover la diferenciación de las células basales. El análisis mediante inmunofluorescencia de las proteínas FOXJ1 y tubulina acetilada en los cultivos tratados con la citoquina no mostró presencia alguna de células multiciliadas en ellos. Dado los resultados obtenidos se decidió tratar esos mismos cultivos con el compuesto DAPT, inhibidor de la ruta de Notch. En vertebrados, esta ruta tiene un papel clave en la regulación del destino celular durante el desarrollo embrionario, y también durante la etapa adulta (van Es et al., 2005; Giuranno et al., 2019). En este sentido, se ha visto que en el tejido respiratorio de ratones tanto adultos como en desarrollo, así como en el epitelio de las vías respiratorias humanas, la activación constitutiva de Notch inhibe la diferenciación de las células multiciliadas y promueve la de las células secretoras (Guseh et al., 2009; Tsao et al., 2009; Morimoto et al., 2010; Rock et al., 2011; Tadokoro et al., 2014). No obstante, a pesar del importante papel que esta vía de señalización desempeña en la regulación del balance entre los distintos linajes celulares, los resultados obtenidos del bloqueo de dicha ruta, incluso del cotratamiento de las células con el inhibidor DAPT y proteína IL6 recombinante, no mostraron diferenciación de las células basales inmortalizadas hacia células multiciliadas en los cultivos con elevado número de pases.

El hecho de que, en dichos subcultivos, ni la activación de la ruta de STAT3 mediante la administración exógena de citoquina IL6, ni la inhibición de la ruta de Notch mediante el tratamiento con DAPT fuera suficiente para promover la diferenciación de las células basales hacia células multiciliadas podría deberse a una pérdida total de la capacidad multipotente de dichas células basales tras un elevado número de pases celulares. Esta pérdida de la capacidad de diferenciación de las células basales a lo largo de los diferentes subcultivos podría estar relacionado con la estrategia de inmortalización elegida, así como con las condiciones de cultivo utilizadas para caracterizar el potencial de diferenciación de las células, o con el propio origen de las



células basales primarias empleadas. A este respecto, se han observado diferencias en la capacidad de diferenciación entre diversas líneas celulares obtenidas a partir de tejido bronquial humano e inmortalizadas con estrategias metodológicas distintas (Walters et al., 2013). De esta manera, algunas de estas líneas celulares conservan únicamente su capacidad de diferenciación en células multiciliadas (Halldorsson et al., 2007), mientras que otras conservan su potencial multipotente, dando lugar a un epitelio pseudoestratificado con células basales, ciliadas y secretoras (Zabner et al., 2003; Fulcher et al., 2009; Delgado et al., 2011; Walters et al., 2013).

## **2. IL6 promueve la pseudoestratificación del epitelio de las vías respiratorias humanas**

Además de su participación en la diferenciación de las células basales, como ya se ha comentado con anterioridad, la vía de señalización de STAT3 desempeña una importante labor en la regeneración y el mantenimiento de la integridad del epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias. Numerosos estudios han demostrado que, aunque dicha señalización no es esencial para el desarrollo del tejido respiratorio, si es necesaria para su reparación y renovación tras producirse una lesión (Hokuto et al., 2004; Kida et al., 2008). Del mismo modo, se ha visto que la citoquina IL6 producida por las células mesenquimales del estroma respiratorio, en respuesta a daño tisular, tiene un papel clave al promover la reparación del epitelio a partir de las células progenitoras (Tadokoro et al., 2014).

Nuestros hallazgos relativos al papel de IL6 en la regeneración de las vías respiratorias revelaron que el tratamiento de los cultivos de células basales inmortalizadas durante su proceso de diferenciación con esta citoquina promovía el sobrecrecimiento celular en forma de agregados o “domos” y la pseudoestratificación del epitelio. El análisis mediante microscopía confocal del marcaje de los núcleos celulares con DAPI mostró mayor número de núcleos p63- a diferentes alturas a lo largo del epitelio, en aquellos cultivos diferenciados en presencia de proteína IL6 recombinante. Estos resultados estarían en consonancia con lo observado durante la reparación del epitelio de la tráquea de ratones adultos, tras la exposición a SO<sub>2</sub>. En este modelo, tras producirse el daño tisular, las células luminales murieron y las células basales p63+ supervivientes se expandieron para cubrir por completo la lámina basal del epitelio, y proliferaron y dieron lugar a una población de células progenitoras

indiferenciadas p63-, FOXJ1- y SCGB1A1- y con capacidad para diferenciarse en el resto de los tipos celulares del epitelio pseudoestratificado. Además, el análisis de la expresión de IL6 reflejó un aumento muy significativo de los niveles de la citoquina en el estroma bajo el epitelio inmediatamente después de producirse la lesión, correlacionando dicha expresión, a su vez, con mayores niveles de p-STAT3 en las células basales p63+ y en los progenitores indiferenciados (Tadokoro et al., 2014).

Por otro lado, los datos obtenidos de la inhibición de la ruta de Notch con el compuesto DAPT sugieren que dicha vía de señalización desempeña una importante labor en la pseudoestratificación del epitelio de las vías respiratorias humanas, puesto que su bloqueo disminuyó notablemente el número de núcleos celulares p63- encontrados a diferentes alturas, e incluso el tratamiento combinado de las células con DAPT y proteína IL6 recombinante consiguió revertir, parcialmente, los efectos observados en aquellos cultivos tratados únicamente con la citoquina. En este sentido, un estudio llevado a cabo con tejido respiratorio de ratón mostró que la activación endógena de la señalización Notch3 modulaba la población de células progenitoras indiferenciadas p63- que posteriormente darían lugar al resto de tipos celulares. Además, la desregulación de dicha señalización daba lugar a una expansión aberrante de las células basales y a una pseudoestratificación alterada del epitelio de las vías respiratorias superiores (Mori et al., 2015). Así mismo, estudios realizados con células basales diferenciadas apoyarían estos resultados, mostrando que la señalización de Notch favorecería la generación de una población de progenitores p63-, con capacidad multipotente (Rock et al., 2011).

Los resultados obtenidos en este capítulo ponen de manifiesto el importante papel fisiológico de la citoquina IL6 en el tejido respiratorio. El aumento de los niveles de esta proteína en individuos con trastornos respiratorios como la EPOC o el asma se ha relacionado con el propio origen de estas patologías. Sin embargo, como se ha podido comprobar a lo largo de este trabajo, IL6 desempeña también una labor muy positiva en el mantenimiento de la homeostasis del tejido respiratorio promoviendo la ciliogénesis y la regeneración y pseudoestratificación epitelial en las vías respiratorias. Por tanto, tener en cuenta el contexto en el que esta citoquina actúa es sumamente importante a

la hora de diseñar terapias específicas para el tratamiento de los desórdenes ya mencionados, que estén enfocadas en la regulación de los niveles de expresión de IL6.



## **CONCLUSIONES II**



## CONCLUSIONES II

---

1. La citoquina IL6 induce la diferenciación de las células basales procedentes de biopsias de bronquio humano hacia células multiciliadas, promoviendo la expresión de genes implicados en la ciliogénesis, tales como *FoxJ1*.
2. La citoquina IL6 promueve la expansión de progenitores indiferenciados p63- y la pseudoestratificación del epitelio respiratorio constituido a partir de células basales procedentes de biopsias de bronquio humano.
3. La ruta de Notch participa en la modulación de la población de células progenitoras indiferenciadas p63- y en la pseudoestratificación del epitelio respiratorio humano.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abroun, S., Saki, N., Ahmadvand, M., Asghari, F., Salari, F., and Rahim, F. (2015). STATs: An Old Story, Yet Mesmerizing. *Cell J.* 17, 395–411. doi:10.22074/cellj.2015.1.
- Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2008). Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol. Endocrinol.* 22, 1023–1031. doi:10.1210/me.2007-0529.
- Akerstrom, T. C. A., Krogh-Madsen, R., Petersen, A. M. W., and Pedersen, B. K. (2009). Glucose ingestion during endurance training in men attenuates expression of myokine receptor. *Exp. Physiol.* 94, 1124–1131. doi:10.1113/expphysiol.2009.048983.
- Akira, S., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J.* 4, 2860–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199284>.
- Akira, S., and Kishimoto, T. (1992). IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol. Rev.* 127, 25–50. doi:10.1111/j.1600-065x.1992.tb01407.x.
- Allen, L. F., Sebolt-Leopold, J., and Meyer, M. B. (2003). CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). *Semin. Oncol.* 30, 105–116. doi:10.1053/j.seminoncol.2003.08.012.
- Amrani, Y., Ammit, A. J., and Panettieri, R. A. (2001). Tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1, but not TNFR2, mediates tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 and RANTES in human airway smooth muscle cells: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Mol. Pharmacol.* 60, 646–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562425>.
- Anderson, P. (2010). Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 24–35. doi:10.1038/nri2685.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2008). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends*

*Biochem. Sci.* 33, 141–150. doi:10.1016/j.tibs.2007.12.003.

Anerillas, C., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2020). Regulation of senescence traits by MAPKs. *GeroScience* 42, 397–408. doi:10.1007/s11357-020-00183-3.

Astaldi, G. C., Janssen, M. C., Lansdorp, P., Willems, C., Zeijlemaker, W. P., and Oosterhof, F. (1980). Human endothelial culture supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas. *J. Immunol.* 125, 1411–1414.

Atamas, S. P., Chapoval, S. P., and Keegan, A. D. (2013). Cytokines in chronic respiratory diseases. *F1000 Biol. Rep.* 5, 3. doi:10.3410/B5-3.

Awazawa, M., Ueki, K., Inabe, K., Yamauchi, T., Kubota, N., Kaneko, K., et al. (2011). Adiponectin Enhances Insulin Sensitivity by Increasing Hepatic IRS-2 Expression via a Macrophage-Derived IL-6-Dependent Pathway. *Cell Metab.* 13, 401–412. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.010.

Baier, P. C., May, U., Scheller, J., Rose-John, S., and Schifflholz, T. (2009). Impaired hippocampus-dependent and -independent learning in IL-6 deficient mice. *Behav. Brain Res.* 200, 192–196. doi:10.1016/j.bbr.2009.01.013.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., Mclauchlan, H., et al. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315. doi:10.1042/BJ20070797.

Balducci, L., Blasi, A., Saldarelli, M., Soleti, A., Pessina, A., Bonomi, A., et al. (2014). Immortalization of human adipose-derived stromal cells: production of cell lines with high growth rate, mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 63. doi:10.1186/scrt452.

Balestra, F. R., and Gönczy, P. (2014). Multiciliogenesis: multicilin directs transcriptional activation of centriole formation. *Curr. Biol.* 24, R746-9. doi:10.1016/j.cub.2014.07.006.

- Balschun, D., Wetzel, W., Del Rey, A., Pitossi, F., Schneider, H., Zuschratter, W., et al. (2004). Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1788–1790. doi:10.1096/fj.04-1625fje.
- Bastard, J.-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M. J., Caron, M., Vidal, H., et al. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur. Cytokine Netw.* 17, 4–12.
- Bertalanffy, F. D., and Leblond, C. P. (1955). STRUCTURE OF RESPIRATORY TISSUE. *Lancet* 266, 1365–1368. doi:10.1016/S0140-6736(55)93164-0.
- Bethin, K. E., Vogt, S. K., and Muglia, L. J. (2000). Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9317–9322. doi:10.1073/pnas.97.16.9317.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., et al. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238. doi:10.1038/nature04753.
- Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Lee, J. C., Haegeman, G., et al. (1996). The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 15, 1914–1923. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00542.x.
- Bilkovski, R., Schulte, D. M., Oberhauser, F., Mauer, J., Hampel, B., Gutschow, C., et al. (2011). Adipose tissue macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans. *Int. J. Obes. (Lond).* 35, 1450–1454. doi:10.1038/ijo.2011.6.
- Blüher, M. (2013). Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 163–177. doi:10.1016/j.beem.2013.02.005.

- Blüher, M., and Mantzoros, C. S. (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism* 64, 131–145. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.016.
- Bolin, L. M., Strycharska-Orczyk, I., Murray, R., Langston, J. W., and Di Monte, D. (2002). Increased vulnerability of dopaminergic neurons in MPTP-lesioned interleukin-6 deficient mice. *J. Neurochem.* 83, 167–175. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01131.x.
- Bolin, L. M., Zhaung, A., Strychkarska-Orczyk, I., Nelson, E., Huang, I., Malit, M., et al. (2005). Differential inflammatory activation of IL-6 (-/-) astrocytes. *Cytokine* 30, 47–55. doi:10.1016/j.cyto.2004.11.007.
- Boulanger, M. J., Chow, D., Brevnova, E. E., and Garcia, K. C. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300, 2101–2104. doi:10.1126/science.1083901.
- Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I., and Mlodzik, M. (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 94, 109–118. doi:10.1016/s0092-8674(00)81226-x.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999.
- Brocker, C., Thompson, D., Matsumoto, A., Nebert, D. W., and Vasiliou, V. (2010). Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum. Genomics* 5, 30–55. doi:10.1186/1479-7364-5-1-30.
- Brooks, E. R., and Wallingford, J. B. (2014). Multiciliated cells. *Curr. Biol.* 24, R973-82. doi:10.1016/j.cub.2014.08.047.
- Budai, M. M., Varga, A., Milesz, S., Tózsér, J., and Benkő, S. (2013). Aloe vera downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production and expression of

- NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Mol. Immunol.* 56, 471–479. doi:10.1016/j.molimm.2013.05.005.
- Burhans, M. S., Hagman, D. K., Kuzma, J. N., Schmidt, K. A., and Kratz, M. (2018). Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Compr. Physiol.* 9, 1–58. doi:10.1002/cphy.c170040.
- Cardoso, W. V (2001). Molecular Regulation of Lung Development. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 471–494. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.471.
- Cargnello, M., and Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 50–83. doi:10.1128/MMBR.00031-10.
- Carter, A. B., Monick, M. M., and Hunninghake, G. W. (1999). Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20, 751–758. doi:10.1165/ajrcmb.20.4.3420.
- Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Pérez-Hernández, A. I., Gurbindo, J., Ramírez, B., et al. (2014). Activation of noncanonical Wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E1407-17. doi:10.1210/jc.2014-1191.
- Chai, Z., Gatti, S., Toniatti, C., Poli, V., and Bartfai, T. (1996). Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183, 311–316. doi:10.1084/jem.183.1.311.
- Chait, A., and den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 7, 22. doi:10.3389/fcvm.2020.00022.
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S., and Scheller, J. (2011). The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur. J. Cell*

*Biol.* 90, 484–494. doi:10.1016/j.ejcb.2010.10.007.

Chen, C.-Y. A., Chang, J. T., Ho, Y.-F., and Shyu, A.-B. (2016). MiR-26 down-regulates TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signalling and IL-6 expression by silencing HMGA1 and MALT1. *Nucleic Acids Res.* 44, 3772–3787. doi:10.1093/nar/gkw205.

Choy, E. (2004). Clinical experience with inhibition of interleukin-6. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 30, 405–15, viii. doi:10.1016/j.rdc.2004.01.008.

Content, J., De Wit, L., Poupart, P., Opdenakker, G., Van Damme, J., and Billiau, A. (1985). Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor. *Eur. J. Biochem.* 152, 253–257. doi:10.1111/j.1432-1033.1985.tb09191.x.

Cuenda, A., and Sanz-Ezquerro, J. J. (2017). p38 $\gamma$  and p38 $\delta$ : From Spectators to Key Physiological Players. *Trends Biochem. Sci.* 42, 431–442. doi:10.1016/j.tibs.2017.02.008.

Daina, A., Michielin, O., and Zoete, V. (2019). SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res.* 47, W357–W364. doi:10.1093/nar/gkz382.

Daniely, Y., Liao, G., Dixon, D., Linnoila, R. I., Lori, A., Randell, S. H., et al. (2004). Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C171-81. doi:10.1152/ajpcell.00226.2003.

Dawson, R. E., Jenkins, B. J., and Saad, M. I. (2021). IL-6 family cytokines in respiratory health and disease. *Cytokine* 143, 155520. doi:10.1016/j.cyto.2021.155520.

Del Reino, P., Alsina-Beauchamp, D., Escós, A., Cerezo-Guisado, M. I., Risco, A., Aparicio, N., et al. (2014). Pro-oncogenic role of alternative p38 mitogen-activated protein kinases p38 $\gamma$  and p38 $\delta$ , linking inflammation and cancer in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res.* 74, 6150–6160. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0870.



- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., et al. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32048–32054. doi:10.1074/jbc.274.45.32048.
- Delgado, O., Kaisani, A. A., Spinola, M., Xie, X.-J., Batten, K. G., Minna, J. D., et al. (2011). Multipotent capacity of immortalized human bronchial epithelial cells. *PLoS One* 6, e22023. doi:10.1371/journal.pone.0022023.
- Dethlefsen, C., Højfeldt, G., and Hojman, P. (2013). The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 138, 657–664. doi:10.1007/s10549-013-2488-z.
- Deverman, B. E., and Patterson, P. H. (2009). Cytokines and CNS development. *Neuron* 64, 61–78. doi:10.1016/j.neuron.2009.09.002.
- Didon, L., Zwick, R. K., Chao, I. W., Walters, M. S., Wang, R., Hackett, N. R., et al. (2013). RFX3 Modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium. *Respir. Res.* 14, 70. doi:10.1186/1465-9921-14-70.
- Dittrich, E., Haft, C. R., Muys, L., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1996). A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 5487–5494. doi:10.1074/jbc.271.10.5487.
- Dittrich, E., Rose-John, S., Gerhartz, C., Müllberg, J., Stoyan, T., Yasukawa, K., et al. (1994). Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 19014–19020.
- Doumanov, J. A., Daubrawa, M., Uden, H., and Graeve, L. (2006). Identification of a basolateral sorting signal within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal

- transducer gp130. *Cell. Signal.* 18, 1140–1146. doi:10.1016/j.cellsig.2005.09.006.
- Doyle, W. J., Casselbrant, M. L., Li-Korotky, H.-S., Cullen Doyle, A. P., Lo, C.-Y., Turner, R., et al. (2010). The Interleukin 6 –174 C/C Genotype Predicts Greater Rhinovirus Illness. *J. Infect. Dis.* 201, 199–206. doi:10.1086/649559.
- Duncia, J. V., Santella, J. B., Higley, C. A., Pitts, W. J., Wityak, J., Fietze, W. E., et al. (1998). MEK inhibitors: The chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 2839–2844. doi:10.1016/S0960-894X(98)00522-8.
- Eder, K., Baffy, N., Falus, A., and Fulop, A. K. (2009). The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. ... [et al.]* 58, 727–736. doi:10.1007/s00011-009-0060-4.
- Ekdahl, C. T., Claassen, J.-H., Bonde, S., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13632–13637. doi:10.1073/pnas.2234031100.
- Ellingsgaard, H., Ehses, J. A., Hammar, E. B., Van Lommel, L., Quintens, R., Martens, G., et al. (2008). Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13163–13168. doi:10.1073/pnas.0801059105.
- Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Sawka-Verhelle, D., Hilton, D., and Van Obberghen, E. (2000). SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 15985–15991. doi:10.1074/jbc.275.21.15985.
- Erta, M., Quintana, A., and Hidalgo, J. (2012). Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 1254–1266. doi:10.7150/ijbs.4679.
- Esposito, K., Pontillo, A., Di Palo, C., Giugliano, G., Masella, M., Marfella, R., et al. (2003). Effect of Weight Loss and Lifestyle Changes on Vascular Inflammatory Markers in Obese Women. *JAMA* 289, 1799. doi:10.1001/jama.289.14.1799.

- Eulendorf, R., Dittrich, A., Khouri, C., Müller, P. J., Mütze, B., Wolf, A., et al. (2012). Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 486–495. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.09.010>.
- Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015a). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 461–470. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014>.
- Fasshauer, M., and Blüher, M. (2015b). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 461–470. doi:10.1016/j.tips.2015.04.014.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feese, W. S., et al. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 18623–18632. doi:10.1074/jbc.273.29.18623.
- Febbraio, M. A. (2007). gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity. *J. Clin. Invest.* 117, 841–849. doi:10.1172/JCI30453.
- Febbraio, M. A., Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Nielsen, H. B., Krstrup, P., et al. (2003). Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J. Physiol.* 549, 607–612. doi:10.1113/jphysiol.2003.042374.
- Feng, B., Zhu, Y., Yan, L., Yan, H., Huang, X., Jiang, D., et al. (2020). Ursolic acid induces the production of IL6 and chemokines in both adipocytes and adipose tissue. *Adipocyte* 9, 523–534. doi:10.1080/21623945.2020.1814545.
- Ferguson, B. S., Nam, H., and Morrison, R. F. (2019). Dual-specificity phosphatases regulate mitogen-activated protein kinase signaling in adipocytes in response to inflammatory stress. *Cell. Signal.* 53, 234–245. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.10.011>.
- Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc. Immunol. Rev.* 12, 6–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201070>.

- Fisher, J., Mizrahi, T., Schori, H., Yoles, E., Levkovitch-Verbin, H., Haggiag, S., et al. (2001). Increased post-traumatic survival of neurons in IL-6-knockout mice on a background of EAE susceptibility. *J. Neuroimmunol.* 119, 1–9. doi:10.1016/s0165-5728(01)00342-3.
- Fried, S. K., Bunkin, D. A., and Greenberg, A. S. (1998). Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 847–850. doi:10.1210/jcem.83.3.4660.
- Fulcher, M. L., Gabriel, S. E., Olsen, J. C., Tatreau, J. R., Gentsch, M., Livanos, E., et al. (2009). Novel human bronchial epithelial cell lines for cystic fibrosis research. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296, L82-91. doi:10.1152/ajplung.90314.2008.
- Fuster, J. J., Zuriaga, M. A., Ngo, D. T.-M., Farb, M. G., Aprahamian, T., Yamaguchi, T. P., et al. (2015). Noncanonical Wnt Signaling Promotes Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Metabolic Dysfunction Independent of Adipose Tissue Expansion. *Diabetes* 64, 1235–1248. doi:10.2337/db14-1164.
- Galic, S., Oakhill, J. S., and Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316, 129–139. doi:10.1016/j.mce.2009.08.018.
- Garbers, C., Hermanns, H. M., Schaper, F., Müller-Newen, G., Grötzinger, J., Rose-John, S., et al. (2012). Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 23, 85–97. doi:https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.04.001.
- García-Hernández, L., García-Ortega, M. B., Ruiz-Alcalá, G., Carrillo, E., Marchal, J. A., and García, M. Á. (2021). The p38 MAPK Components and Modulators as Biomarkers and Molecular Targets in Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 23. doi:10.3390/ijms23010370.
- Garth, J., Barnes, J. W., and Krick, S. (2018). Targeting Cytokines as Evolving Treatment Strategies in Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19113402.

- Gillies, N., Pendharkar, S. A., Asrani, V. M., Mathew, J., Windsor, J. A., and Petrov, M. S. (2016). Interleukin-6 is associated with chronic hyperglycemia and insulin resistance in patients after acute pancreatitis. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. ... [et al.]* 16, 748–755. doi:10.1016/j.pan.2016.06.661.
- Giuranno, L., Wansleben, C., Iannone, R., Arathoon, L., Hounjet, J., Groot, A. J., et al. (2019). NOTCH signaling promotes the survival of irradiated basal airway stem cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 317, L414–L423. doi:10.1152/ajplung.00197.2019.
- Gomasca, M., Banfi, G., and Lombardi, G. (2020). Myokines: The endocrine coupling of skeletal muscle and bone. *Adv. Clin. Chem.* 94, 155–218. doi:10.1016/bs.acc.2019.07.010.
- Gomperts, B. N., Gong-Cooper, X., and Hackett, B. P. (2004). Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117, 1329–1337.
- González-Terán, B., Matesanz, N., Nikolic, I., Verdugo, M. A., Sreeramkumar, V., Hernández-Cosido, L., et al. (2016). p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  reprogram liver metabolism by modulating neutrophil infiltration. *EMBO J.* 35, 536–552. doi:10.15252/emj.201591857.
- Gros, J., Hu, J. K.-H., Vinegoni, C., Feruglio, P. F., Weissleder, R., and Tabin, C. J. (2010). WNT5A/JNK and FGF/MAPK pathways regulate the cellular events shaping the vertebrate limb bud. *Curr. Biol.* 20, 1993–2002. doi:10.1016/j.cub.2010.09.063.
- Grötzinger, J., Kernebeck, T., Kallen, K. J., and Rose-John, S. (1999). IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biol. Chem.* 380, 803–813. doi:10.1515/BC.1999.100.
- Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y., and Hu, L.-L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp. Ther. Med.* 19, 1997–2007.

doi:10.3892/etm.2020.8454.

Guseh, J. S., Bores, S. A., Stanger, B. Z., Zhou, Q., Anderson, W. J., Melton, D. A., et al. (2009). Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development* 136, 1751–1759. doi:10.1242/dev.029249.

Haan, C., Kreis, S., Margue, C., and Behrmann, I. (2006). Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1538–1546. doi:10.1016/j.bcp.2006.04.013.

Halldorsson, S., Asgrimsson, V., Axelsson, I., Gudmundsson, G. H., Steinarsdottir, M., Baldursson, O., et al. (2007). Differentiation potential of a basal epithelial cell line established from human bronchial explant. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 43, 283–289. doi:10.1007/s11626-007-9050-4.

Hallstrand, T. S., Hackett, T. L., Altemeier, W. A., Matute-Bello, G., Hansbro, P. M., and Knight, D. A. (2014). Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clin. Immunol.* 151, 1–15. doi:https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.12.003.

Hammerich, L., and Tacke, F. (2014). Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7, 297–306. doi:10.2147/CEG.S43737.

Han, M. S., Jung, D. Y., Morel, C., Lakhani, S. A., Kim, J. K., Flavell, R. A., et al. (2013). JNK Expression by Macrophages Promotes Obesity-Induced Insulin Resistance and Inflammation. *Science* (80-. ). 339, 218–222. doi:10.1126/science.1227568.

Han, M. S., White, A., Perry, R. J., Camporez, J.-P., Hidalgo, J., Shulman, G. I., et al. (2020). Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 2751–2760. doi:10.1073/pnas.1920004117.

Harwood, H. J. J. (2012). The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 63, 57–75.

doi:10.1016/j.neuropharm.2011.12.010.

Heinrich, P. C., BEHRMANN, I., HAAN, S., HERMANN, H. M., MÜLLER-NEWEN, G., and SCHAPER, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374, 1–20. doi:10.1042/bj20030407.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334 ( Pt 2, 297–314. doi:10.1042/bj3340297.

Herriges, M., and Morrisey, E. E. (2014). Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development* 141, 502–513. doi:10.1242/dev.098186.

Heyser, C. J., Masliah, E., Samimi, A., Campbell, I. L., and Gold, L. H. (1997). Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1500–1505. doi:10.1073/pnas.94.4.1500.

Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., et al. (1985). Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5490–5494. doi:10.1073/pnas.82.16.5490.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., et al. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73–76. doi:10.1038/324073a0.

Hirota, H., Kiyama, H., Kishimoto, T., and Taga, T. (1996). Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J. Exp. Med.* 183, 2627–2634. doi:10.1084/jem.183.6.2627.

Hogan, B. L. M., Barkauskas, C. E., Chapman, H. A., Epstein, J. A., Jain, R., Hsia, C. C. W.,

- et al. (2014). Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell* 15, 123–138. doi:10.1016/j.stem.2014.07.012.
- Hokuto, I., Ikegami, M., Yoshida, M., Takeda, K., Akira, S., Perl, A.-K. T., et al. (2004). Stat-3 is required for pulmonary homeostasis during hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 113, 28–37. doi:10.1172/JCI19491.
- Honkanen, R. E., Zwiller, J., Moore, R. E., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M., et al. (1990). Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 265, 19401–19404.
- Hotokezaka, H., Sakai, E., Kanaoka, K., Saito, K., Matsuo, K., Kitaura, H., et al. (2002). U0126 and PD98059, Specific Inhibitors of MEK, Accelerate Differentiation of RAW264.7 Cells into Osteoclast-like Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 47366–47372. doi:10.1074/jbc.M208284200.
- Hsiao, P.-C., Chang, J.-H., Lee, W.-J., Ku, C.-C., Tsai, M.-Y., Yang, S.-F., et al. (2020). The Curcumin Analogue, EF-24, Triggers p38 MAPK-Mediated Apoptotic Cell Death via Inducing PP2A-Modulated ERK Deactivation in Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Cancers (Basel)*. 12, 2163. doi:10.3390/cancers12082163.
- Hu, S.-L., Huang, C.-C., Tzeng, T.-T., Liu, S.-C., Tsai, C.-H., Fong, Y.-C., et al. (2020). S1P promotes IL-6 expression in osteoblasts through the PI3K, MEK/ERK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Int. J. Med. Sci.* 17, 1207–1214. doi:10.7150/ijms.44612.
- Huang, Q., Zhang, Z., Liao, Y., Liu, C., Fan, S., Wei, X., et al. (2018). 17 $\beta$ -estradiol upregulates IL6 expression through the ER $\beta$  pathway to promote lung adenocarcinoma progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 133. doi:10.1186/s13046-018-0804-5.
- Hüll, M., Strauss, S., Berger, M., Volk, B., and Bauer, J. (1996). The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's



- disease. *Behav. Brain Res.* 78, 37–41. doi:10.1016/0166-4328(95)00213-8.
- Hunter, C. A., and Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* 16, 448–457. doi:10.1038/ni.3153.
- Ishimoto, K., Iwata, T., Taniguchi, H., Mizusawa, N., Tanaka, E., and Yoshimoto, K. (2012). d-Dopachrome tautomerase promotes IL-6 expression and inhibits adipogenesis in preadipocytes. *Cytokine* 60, 772–777. doi:https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.07.037.
- Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsén, B., Lahti, K., Nissén, M., et al. (2001). Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 24, 683–689. doi:10.2337/diacare.24.4.683.
- Jones, S. A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 175, 3463–3468. doi:10.4049/jimmunol.175.6.3463.
- Jostock, T., Müllberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., et al. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.* 268, 160–167. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x.
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Kamiyama, M., Yanagimoto, T., Nakajima, M., and Maeda, S. (2005). Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 505–510. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.007.
- Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., and Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *J. Exp. Med.* 217. doi:10.1084/jem.20190347.
- Kang, S., Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2019). Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity* 50, 1007–1023. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.026.
- Kawai, M., Mushiake, S., Bessho, K., Murakami, M., Namba, N., Kokubu, C., et al. (2007). Wnt/Lrp/ $\beta$ -catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual

- activation of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 276–282. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.088.
- Keller, C., Steensberg, A., Hansen, A. K., Fischer, C. P., Plomgaard, P., and Pedersen, B. K. (2005). Effect of exercise, training, and glycogen availability on IL-6 receptor expression in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 99, 2075–2079. doi:10.1152/jappphysiol.00590.2005.
- Kershaw, E. E., and Flier, J. S. (2004). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556. doi:10.1210/jc.2004-0395.
- Kida, H., Mucenski, M. L., Thitoff, A. R., Le Cras, T. D., Park, K.-S., Ikegami, M., et al. (2008). GP130-STAT3 Regulates Epithelial Cell Migration and Is Required for Repair of the Bronchiolar Epithelium. *Am. J. Pathol.* 172, 1542–1554. doi:https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071052.
- Kim, H.-J., Higashimori, T., Park, S.-Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y.-J., et al. (2004). Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53, 1060–1067. doi:10.2337/diabetes.53.4.1060.
- Kishimoto, T. (2006). Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther.* 8 Suppl 2, S2. doi:10.1186/ar1916.
- Kishimoto, T. (2010). IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* 22, 347–352. doi:10.1093/intimm/dxq030.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., and Taga, T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243–1254.
- Klötting, N., and Blüher, M. (2014). Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 15, 277–287. doi:10.1007/s11154-014-9301-0.
- Klover, P. J., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., and Mooney, R. A. (2003). Chronic exposure

- to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes* 52, 2784–2789. doi:10.2337/diabetes.52.11.2784.
- Konishi, S., Gotoh, S., Tateishi, K., Yamamoto, Y., Korogi, Y., Nagasaki, T., et al. (2016). Directed Induction of Functional Multi-ciliated Cells in Proximal Airway Epithelial Spheroids from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem cell reports* 6, 18–25. doi:10.1016/j.stemcr.2015.11.010.
- Könner, A. C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S. D., Rother, E., Ma, X., et al. (2007). Insulin Action in AgRP-Expressing Neurons Is Required for Suppression of Hepatic Glucose Production. *Cell Metab.* 5, 438–449. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.004.
- Kopf, M., Bachmann, M. F., and Marsland, B. J. (2010). Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 703–718. doi:10.1038/nrd2805.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., et al. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339–342. doi:10.1038/368339a0.
- Kuglstatler, A., Ghate, M., Tsing, S., Villaseñor, A. G., Shaw, D., Barnett, J. W., et al. (2010). X-ray crystal structure of JNK2 complexed with the p38 $\alpha$  inhibitor BIRB796: Insights into the rational design of DFG-out binding MAP kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 5217–5220. doi:10.1016/j.bmcl.2010.06.157.
- Kuma, Y., Sabio, G., Bain, J., Shpiro, N., Márquez, R., and Cuenda, A. (2005). BIRB796 Inhibits All p38 MAPK Isoforms in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 19472–19479. doi:10.1074/jbc.M414221200.
- Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A., and Bhatt, A. N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 37, 11553–11572. doi:10.1007/s13277-016-5098-7.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0.
- Lafkas, D., Shelton, A., Chiu, C., de Leon Boenig, G., Chen, Y., Stawicki, S. S., et al. (2015). Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung. *Nature* 528, 127–131. doi:10.1038/nature15715.
- Lagathu, C., Bastard, J.-P., Auclair, M., Maachi, M., Capeau, J., and Caron, M. (2003). Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 372–379. doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.013.
- Lauder, S. N., Jones, E., Smart, K., Bloom, A., Williams, A. S., Hindley, J. P., et al. (2013). Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology. *Eur. J. Immunol.* 43, 2613–2625. doi:10.1002/eji.201243018.
- Leaner, V., Birrer, M. J., Rana, A., Shen, Y. H., Godlewski, J., Zhu, J., et al. (2003). Cross-talk between JNK/SAPK and ERK/MAPK Pathways. *J. Biol. Chem.* 278, 26715–26721. doi:10.1074/jbc.M303264200.
- Lee, K. M., Choi, K. H., and Ouellette, M. M. (2004). Use of exogenous hTERT to immortalize primary human cells. *Cytotechnology* 45, 33–38. doi:10.1007/10.1007/s10616-004-5123-3.
- Lee, M., Sorn, S. R., Lee, Y., and Kang, I. (2019). Salt Induces Adipogenesis/Lipogenesis and Inflammatory Adipocytokines Secretion in Adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 160. doi:10.3390/ijms20010160.
- Lee, S., Rauch, J., and Kolch, W. (2020). Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* 21. doi:10.3390/ijms21031102.
- Leeman, K. T., Fillmore, C. M., and Kim, C. F. (2014). “Chapter Eight - Lung Stem and Progenitor Cells in Tissue Homeostasis and Disease,” in *Stem Cells in Development and Disease*, ed. M. B. T.-C. T. in D. B. Rendl (Academic Press), 207–233.

doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416022-4.00008-1>.

- Leon, L. R. (2002). Invited review: cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. *J. Appl. Physiol.* 92, 2648–2655. doi:10.1152/jappphysiol.01005.2001.
- LeRoith, D., Novosyadlyy, R., Gallagher, E., Lann, D., Vijayakumar, A., and Yakar, S. (2008). Obesity and Type 2 Diabetes are Associated with an Increased Risk of Developing Cancer and a Worse Prognosis; Epidemiological and Mechanistic Evidence. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 116, S4–S6. doi:10.1055/s-2008-1081488.
- Liongue, C., and Ward, A. C. (2007). Evolution of Class I cytokine receptors. *BMC Evol. Biol.* 7, 120. doi:10.1186/1471-2148-7-120.
- Liu, H.-T., Li, W.-M., Li, X.-Y., Xu, Q.-S., Liu, Q.-S., Bai, X.-F., et al. (2009). Chitosan Oligosaccharides Inhibit the Expression of Interleukin-6 in Lipopolysaccharide-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells Through p38 and ERK1/2 Protein Kinases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00493.x.
- Lombardi, G., Sanchis-Gomar, F., Perego, S., Sansoni, V., and Banfi, G. (2016). Implications of exercise-induced adipo-myokines in bone metabolism. *Endocrine* 54, 284–305. doi:10.1007/s12020-015-0834-0.
- Ma, L., Quigley, I., Omran, H., and Kintner, C. (2014). Multicilin drives centriole biogenesis via E2f proteins. *Genes Dev.* 28, 1461–1471. doi:10.1101/gad.243832.114.
- Maimone, D., Guazzi, G. C., and Annunziata, P. (1997). IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J. Neurol. Sci.* 146, 59–65. doi:10.1016/s0022-510x(96)00283-3.
- Malagón, M. M., Díaz-Ruiz, A., Guzmán-Ruiz, R., Jiménez-Gómez, Y., Moreno, N. R., García-Navarro, S., et al. (2013). Adipobiology for novel therapeutic approaches in metabolic syndrome. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 11, 954–967. doi:10.2174/15701611113116660170.

- Malmeström, C., Andersson, B. A., Haghghi, S., and Lycke, J. (2006). IL-6 and CCL2 levels in CSF are associated with the clinical course of MS: implications for their possible immunopathogenic roles. *J. Neuroimmunol.* 175, 176–182. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.03.004.
- Manieri, E., Herrera-Melle, L., Mora, A., Tomás-Loba, A., Leiva-Vega, L., Fernández, D. I., et al. (2019). Adiponectin accounts for gender differences in hepatocellular carcinoma incidence. *J. Exp. Med.* 216, 1108–1119. doi:10.1084/jem.20181288.
- Manieri, E., and Sabio, G. (2015). Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance. *J. Mol. Endocrinol.* 55, R11–R22. doi:10.1530/JME-15-0146.
- Martens, A. S., Bode, J. G., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (2000). The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 2, 3593–3602.
- März, P., Cheng, J. G., Gadiant, R. A., Patterson, P. H., Stoyan, T., Otten, U., et al. (1998). Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3251–3256. doi:10.1073/pnas.95.6.3251.
- Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi, M., et al. (2018). The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 108, 1415–1424. doi:10.1016/j.biopha.2018.09.177.
- McElvaney, O. J., Curley, G. F., Rose-John, S., and McElvaney, N. G. (2021). Interleukin-6: obstacles to targeting a complex cytokine in critical illness. *Lancet. Respir. Med.* 9, 643–654. doi:10.1016/S2213-2600(21)00103-X.
- McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A., and Bridgewood, C. (2020). The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun. Rev.* 19, 102537. doi:10.1016/j.autrev.2020.102537.

- Memoli, B., Procino, A., Calabrò, P., Esposito, P., Grandaliano, G., Pertosa, G., et al. (2007). Inflammation may modulate IL-6 and C-reactive protein gene expression in the adipose tissue: the role of IL-6 cell membrane receptor. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E1030-5. doi:10.1152/ajpendo.00697.2006.
- Mercer, R. R., Russell, M. L., Roggli, V. L., and Crapo, J. D. (1994). Cell number and distribution in human and rat airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 613–624. doi:10.1165/ajrcmb.10.6.8003339.
- Meyer, T., and Vinkemeier, U. (2007). STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention. *Expert Opin. Ther. Targets* 11, 1355–1365. doi:10.1517/14728222.11.10.1355.
- Michailidou, Z., Gomez-Salazar, M., and Alexaki, V. I. (2022). Innate Immune Cells in the Adipose Tissue in Health and Metabolic Disease. *J. Innate Immun.* 14, 4–30. doi:10.1159/000515117.
- Mihara, M., Hashizume, M., Yoshida, H., Suzuki, M., and Shiina, M. (2011). IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin. Sci.* 122, 143–159. doi:10.1042/CS20110340.
- Mino, T., and Takeuchi, O. (2018). Post-transcriptional regulation of immune responses by RNA binding proteins. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 94, 248–258. doi:10.2183/pjab.94.017.
- Mock, B. A., Nordan, R. P., Justice, M. J., Kozak, C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., et al. (1989). The murine Il-6 gene maps to the proximal region of chromosome 5. *J. Immunol.* 142, 1372–1376.
- Mody, N., Leitch, J., Armstrong, C., Dixon, J., and Cohen, P. (2001). Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett.* 502, 21–24. doi:https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02651-5.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., et al.

- (1997). Subcutaneous Adipose Tissue Releases Interleukin-6, But Not Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , in Vivo 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4196–4200. doi:10.1210/jcem.82.12.4450.
- Monje, M. L., Toda, H., and Palmer, T. D. (2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302, 1760–1765. doi:10.1126/science.1088417.
- Mori, M., Mahoney, J. E., Stupnikov, M. R., Paez-Cortez, J. R., Szymaniak, A. D., Varelas, X., et al. (2015). Notch3-Jagged signaling controls the pool of undifferentiated airway progenitors. *Development* 142, 258–267. doi:10.1242/dev.116855.
- Morimoto, M., Liu, Z., Cheng, H.-T., Winters, N., Bader, D., and Kopan, R. (2010). Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. *J. Cell Sci.* 123, 213–224. doi:10.1242/jcs.058669.
- Morrow, J. D., and Opp, M. R. (2005). Sleep-wake behavior and responses of interleukin-6-deficient mice to sleep deprivation. *Brain. Behav. Immun.* 19, 28–39. doi:10.1016/j.bbi.2004.02.003.
- Motz, G. T., and Coukos, G. (2013). Deciphering and reversing tumor immune suppression. *Immunity* 39, 61–73. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.005.
- Müller-Newen, G. (2003). The cytokine receptor gp130: faithfully promiscuous. *Sci. STKE* 2003, PE40. doi:10.1126/stke.2003.201.pe40.
- Murphy, P. G., Ramer, M. S., Borthwick, L., Gauldie, J., Richardson, P. M., and Bisby, M. A. (1999). Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2243–2253. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00641.x.
- Nakajima, M., Kawanami, O., Jin, E., Ghazizadeh, M., Honda, M., Asano, G., et al. (1998). Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and



bronchiolar cuboidal cells in normal human airways. *Pathol. Int.* 48, 944–953. doi:10.1111/j.1440-1827.1998.tb03865.x.

Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., et al. (1993). Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 82, 1120–1126.

Oh, D. Y., and Olefsky, J. M. (2010). Medicine. Wnt fans the flames in obesity. *Science* 329, 397–398. doi:10.1126/science.1193404.

Oh, J., McCloskey, M. A., Blong, C. C., Bendickson, L., Nilsen-Hamilton, M., and Sakaguchi, D. S. (2010). Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 88, 2798–2809. doi:10.1002/jnr.22447.

Oh, Y. J., and O'Malley, K. L. (1994). IL-6 increases choline acetyltransferase but not neuropeptide transcripts in sympathetic neurons. *Neuroreport* 5, 937–940. doi:10.1097/00001756-199404000-00021.

Olefsky, J. M., and Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135846.

Opp, M. R. (2005). Cytokines and sleep. *Sleep Med. Rev.* 9, 355–364. doi:10.1016/j.smr.2005.01.002.

Ouchi, N., Higuchi, A., Ohashi, K., Oshima, Y., Gokce, N., Shibata, R., et al. (2010). Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329, 454–457. doi:10.1126/science.1188280.

Parekh, K. R., Nawroth, J., Pai, A., Busch, S. M., Senger, C. N., and Ryan, A. L. (2020). Stem cells and lung regeneration. *Am. J. Physiol. Physiol.* 319, C675–C693. doi:10.1152/ajpcell.00036.2020.

- Pargellis, C., Tong, L., Churchill, L., Cirillo, P. F., Gilmore, T., Graham, A. G., et al. (2002). Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Biol.* 9, 268–272. doi:10.1038/nsb770.
- Park, S. E., Park, C.-Y., and Sweeney, G. (2015). Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance: Past, present and future. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 52, 180–190. doi:10.3109/10408363.2015.1023429.
- Patel, P., and Naik, U. P. (2020). Platelet MAPKs—a 20+ year history: What do we really know? *J. Thromb. Haemost.* 18, 2087–2102. doi:10.1111/jth.14967.
- Patra, T., Meyer, K., Geerling, L., Isbell, T. S., Hoft, D. F., Brien, J., et al. (2020). SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 trans-signaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells. *PLoS Pathog.* 16, e1009128. doi:10.1371/journal.ppat.1009128.
- Pedersen, B. K., and Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 457–465. doi:10.1038/nrendo.2012.49.
- Pereira, C., Schaer, D. J., Bachli, E. B., Kurrer, M. O., and Schoedon, G. (2008). Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 504–510. doi:10.1161/ATVBAHA.107.157438.
- Piao, C. Q., Liu, L., Zhao, Y. L., Balajee, A. S., Suzuki, M., and Hei, T. K. (2005). Immortalization of human small airway epithelial cells by ectopic expression of telomerase. *Carcinogenesis* 26, 725–731. doi:10.1093/carcin/bgi016.
- Pietsch, E. C., Sykes, S. M., McMahon, S. B., and Murphy, M. E. (2008). The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27, 6507–6521. doi:10.1038/onc.2008.315.
- Pradhan, A. D. (2001). C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2

Diabetes Mellitus. *JAMA* 286, 327. doi:10.1001/jama.286.3.327.

Quintana, A., Molinero, A., Borup, R., Nielsen, F. C., Campbell, I. L., Penkowa, M., et al. (2008). Effect of astrocyte-targeted production of IL-6 on traumatic brain injury and its impact on the cortical transcriptome. *Dev. Neurobiol.* 68, 195–208. doi:10.1002/dneu.20584.

Ramirez, R. D., Sheridan, S., Girard, L., Sato, M., Kim, Y., Pollack, J., et al. (2004). Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res.* 64, 9027–9034. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3703.

Rasheed, Z., Akhtar, N., and Haqqi, T. M. (2011). Advanced glycation end products induce the expression of interleukin-6 and interleukin-8 by receptor for advanced glycation end product-mediated activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- $\kappa$ B in human osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatology* 50, 838–851. doi:10.1093/rheumatology/keq380.

Rehman, K., Akash, M. S. H., Liaqat, A., Kamal, S., Qadir, M. I., and Rasul, A. (2017). Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 27, 229–236. doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2017019712.

Richards, P. J., Nowell, M. A., Horiuchi, S., McLoughlin, R. M., Fielding, C. A., Grau, S., et al. (2006). Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 1662–1672. doi:10.1002/art.21818.

Riegel, K., Yurugi, H., Schlöder, J., Jonuleit, H., Kaulich, M., Kirschner, F., et al. (2021). ERK5 modulates IL-6 secretion and contributes to tumor-induced immune suppression. *Cell Death Dis.* 12, 969. doi:10.1038/s41419-021-04257-8.

Rincon, M., and Irvin, C. G. (2012). Role of IL-6 in Asthma and Other Inflammatory Pulmonary Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 1281–1290. doi:10.7150/ijbs.4874.

- Risco, A., del Fresno, C., Mambol, A., Alsina-Beauchamp, D., MacKenzie, K. F., Yang, H.-T., et al. (2012a). p38 and p38 kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 11200–11205. doi:10.1073/pnas.1207290109.
- Risco, A., del Fresno, C., Mambol, A., Alsina-Beauchamp, D., MacKenzie, K. F., Yang, H.-T., et al. (2012b). p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11200–11205. doi:10.1073/pnas.1207290109.
- Rock, J. R., Gao, X., Xue, Y., Randell, S. H., Kong, Y.-Y., and Hogan, B. L. M. (2011). Notch-dependent differentiation of adult airway basal stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 639–648. doi:10.1016/j.stem.2011.04.003.
- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 1237–1247. doi:10.7150/ijbs.4989.
- Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10. doi:10.1101/cshperspect.a028415.
- Rose-John, S. (2020). Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Research* 9. doi:10.12688/f1000research.26058.1.
- Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G., and Jones, S. A. (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J. Leukoc. Biol.* 80, 227–236. doi:10.1189/jlb.1105674.
- Ross, S. E. (2000). Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science (80-. )*. 289, 950–953. doi:10.1126/science.289.5481.950.
- Rotter, V., Nagaev, I., and Smith, U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha,

- overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J. Biol. Chem.* 278, 45777–45784. doi:10.1074/jbc.M301977200.
- Roux, P. P., and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 320–344. doi:10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J. Y., Ko, H. J., et al. (2008). A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance. *Science (80-. )*. 322, 1539–1543. doi:10.1126/science.1160794.
- Sabio, G., and Davis, R. J. (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends Biochem. Sci.* 35, 490–496. doi:10.1016/j.tibs.2010.04.004.
- Sacks, D., Baxter, B., Campbell, B. C. V, Carpenter, J. S., Cognard, C., Dippel, D., et al. (2018). Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int. J. stroke Off. J. Int. Stroke Soc.* 13, 612–632. doi:10.1177/1747493018778713.
- Schaper, F., and Rose-John, S. (2015). Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26, 475–487. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.004.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 878–888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.
- Schimpl, A., and Wecker, E. (1972). Replacement of T-cell function by a T-cell product. *Nat. New Biol.* 237, 15–17. doi:10.1038/newbio237015a0.
- Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2016). IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.* 64, 1403–1415. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.004.

- Schreiber, A., Viemann, D., Schöning, J., Schloer, S., Mecate Zambrano, A., Brunotte, L., et al. (2022). The MEK1/2-inhibitor ATR-002 efficiently blocks SARS-CoV-2 propagation and alleviates pro-inflammatory cytokine/chemokine responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 65. doi:10.1007/s00018-021-04085-1.
- Schulte, D. M., Müller, N., Neumann, K., Oberhäuser, F., Faust, M., Güdelhöfer, H., et al. (2012). Pro-inflammatory wnt5a and anti-inflammatory sFRP5 are differentially regulated by nutritional factors in obese human subjects. *PLoS One* 7, e32437. doi:10.1371/journal.pone.0032437.
- Schumacher, N., and Rose-John, S. (2019). ADAM17 Activity and IL-6 Trans-Signaling in Inflammation and Cancer. *Cancers (Basel)*. 11. doi:10.3390/cancers11111736.
- Sehgal, P. B., Zilberstein, A., Ruggieri, R. M., May, L. T., Ferguson-Smith, A., Slate, D. L., et al. (1986). Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5219–5222. doi:10.1073/pnas.83.14.5219.
- Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., and Mooney, R. A. (2002). Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 51, 3391–3399. doi:10.2337/diabetes.51.12.3391.
- Smetana, K. J., and Brábek, J. (2020). Role of Interleukin-6 in Lung Complications in Patients With COVID-19: Therapeutic Implications. *In Vivo* 34, 1589–1592. doi:10.21873/invivo.11947.
- Smitka, K., and Marešová, D. (2015). Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. *Prague Med. Rep.* 116, 87–111. doi:10.14712/23362936.2015.49.
- Somers, W., Stahl, M., and Seehra, J. S. (1997). 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J.* 16, 989–997. doi:https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.989.
- Song, Q., Li, H., Shao, H., Li, C., and Lu, X. (2015). MicroRNA-365 in macrophages

regulates Mycobacterium tuberculosis-induced active pulmonary tuberculosis via interleukin-6. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 15458–15465.

Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., et al. (2011). Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res. Rev.* 67, 157–183. doi:10.1016/j.brainresrev.2011.01.002.

Stauber, M., Weidemann, M., Dittrich-Breiholz, O., Lobschat, K., Alten, L., Mai, M., et al. (2017). Identification of FOXJ1 effectors during ciliogenesis in the foetal respiratory epithelium and embryonic left-right organiser of the mouse. *Dev. Biol.* 423, 170–188. doi:https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.11.019.

Steensberg, A., Febbraio, M. A., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., Saltin, B., et al. (2001). Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J. Physiol.* 537, 633–639. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.00633.x.

Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 165–167. doi:10.1038/nrc2072.

Stubbs, J. L., Vladar, E. K., Axelrod, J. D., and Kintner, C. (2012). Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* 14, 140–147. doi:10.1038/ncb2406.

Tadokoro, T., Wang, Y., Barak, L. S., Bai, Y., Randell, S. H., and Hogan, B. L. M. (2014). IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E3641–E3649. doi:10.1073/pnas.1409781111.

Taga, T., and Kishimoto, T. (1997). Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 797–819. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.797.

Takada, I., Kouzmenko, A. P., and Kato, S. (2009). Wnt and PPAR $\gamma$  signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 442–447. doi:10.1038/nrrheum.2009.137.

- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., et al. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4109–4117. doi:10.1128/MCB.18.7.4109.
- Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016295. doi:10.1101/cshperspect.a016295.
- Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2018). Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10. doi:10.1101/cshperspect.a028456.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Masuda, K., and Kishimoto, T. (2013). Interleukin-6; pathogenesis and treatment of autoimmune inflammatory diseases. *Inflamm. Regen.* 33, 54–65.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Masuda, K., and Kishimoto, T. (2016). Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 941, 79–88. doi:10.1007/978-94-024-0921-5\_4.
- Thaler, J. P., Choi, S. J., Schwartz, M. W., and Wisse, B. E. (2010). Hypothalamic inflammation and energy homeostasis: resolving the paradox. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 79–84. doi:10.1016/j.yfrne.2009.10.002.
- Thalhamer, T., McGrath, M. A., and Harnett, M. M. (2008). MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 47, 409–414. doi:10.1093/rheumatology/kem297.
- Timmermann, A., Küster, A., Kurth, I., Heinrich, P. C., and Müller-Newen, G. (2002). A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor. *Eur. J. Biochem.* 269, 2716–2726. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02941.x.
- Trayhurn, P., Drevon, C. A., and Eckel, J. (2011). Secreted proteins from adipose tissue



- and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 47–56. doi:10.3109/13813455.2010.535835.
- Tsao, P.-N., Vasconcelos, M., Izvolsky, K. I., Qian, J., Lu, J., and Cardoso, W. V (2009). Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development* 136, 2297–2307. doi:10.1242/dev.034884.
- Uciechowski, P., and Dempke, W. C. M. (2020). Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology* 98, 131–137. doi:10.1159/000505099.
- van Es, J. H., van Gijn, M. E., Riccio, O., van den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., et al. (2005). Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435, 959–963. doi:10.1038/nature03659.
- Van Gaal, L. F., Mertens, I. L., and De Block, C. E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444, 875–880. doi:10.1038/nature05487.
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 253–278. doi:10.1146/annurev.iy.08.040190.001345.
- Van Wagoner, N. J., Choi, C., Repovic, P., and Benveniste, E. N. (2002). Oncostatin M Regulation of Interleukin-6 Expression in Astrocytes. *J. Neurochem.* 75, 563–575. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0750563.x.
- Velazquez-Salinas, L., Verdugo-Rodriguez, A., Rodriguez, L. L., and Borca, M. V (2019). The Role of Interleukin 6 During Viral Infections. *Front. Microbiol.* 10, 1057. doi:10.3389/fmicb.2019.01057.
- Vicennati, V., Vottero, A., Friedman, C., and Papanicolaou, D. A. (2002). Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 26, 905–911. doi:10.1038/sj.ijo.0802035.
- Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M., and Rose-John, S. (1999). A role for the

immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding. *Eur. J. Biochem.* 263, 438–446. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00511.x.

Wadt, K. A., Larsen, C. M., Andersen, H. U., Nielsen, K., Karlsen, A. E., and Mandrup-Poulsen, T. (1998). Ciliary neurotrophic factor potentiates the beta-cell inhibitory effect of IL-1beta in rat pancreatic islets associated with increased nitric oxide synthesis and increased expression of inducible nitric oxide synthase. *Diabetes* 47, 1602–1608. doi:10.2337/diabetes.47.10.1602.

Walters, M. S., Gomi, K., Ashbridge, B., Moore, M. A. S., Arbelaez, V., Heldrich, J., et al. (2013). Generation of a human airway epithelium derived basal cell line with multipotent differentiation capacity. *Respir. Res.* 14, 135. doi:10.1186/1465-9921-14-135.

Wang, Z.-Q., Wu, D.-C., Huang, F.-P., and Yang, G.-Y. (2004). Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 996, 55–66. doi:https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.09.074.

Wei, J., Xiong, X., Lin, Y., Zheng, B., and Cheng, D. (2015). Association between serum interleukin-6 concentrations and chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *PeerJ* 3, e1199. doi:10.7717/peerj.1199.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W. J. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808. doi:10.1172/JCI19246.

Wernstedt, I., Edgley, A., Berndtsson, A., Fäldt, J., Bergström, G., Wallenius, V., et al. (2006). Reduced stress- and cold-induced increase in energy expenditure in interleukin-6-deficient mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R551-7. doi:10.1152/ajpregu.00514.2005.

- Whitney, N. P., Eidem, T. M., Peng, H., Huang, Y., and Zheng, J. C. (2009). Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J. Neurochem.* 108, 1343–1359. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05886.x.
- Wisse, B. E., Ogimoto, K., Morton, G. J., Wilkinson, C. W., Frayo, R. S., Cummings, D. E., et al. (2004). Physiological regulation of hypothalamic IL-1beta gene expression by leptin and glucocorticoids: implications for energy homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E1107-13. doi:10.1152/ajpendo.00038.2004.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830. doi:10.1172/JCI19451.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., et al. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398, 714–718. doi:10.1038/19539.
- Yang, M.-L., Wang, C.-T., Yang, S.-J., Leu, C.-H., Chen, S.-H., Wu, C.-L., et al. (2017). IL-6 ameliorates acute lung injury in influenza virus infection. *Sci. Rep.* 7, 43829. doi:10.1038/srep43829.
- Yang, M., and Huang, C.-Z. (2015). Mitogen-activated protein kinase signaling pathway and invasion and metastasis of gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 21, 11673–11679. doi:10.3748/wjg.v21.i41.11673.
- Yirmiya, R., and Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain. Behav. Immun.* 25, 181–213. doi:10.1016/j.bbi.2010.10.015.
- Yong, H.-Y., Koh, M.-S., and Moon, A. (2009). The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1893–1905. doi:10.1517/13543780903321490.

- Yu, X., Ng, C. P., Habacher, H., and Roy, S. (2008). Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. *Nat. Genet.* 40, 1445–1453. doi:10.1038/ng.263.
- Zabner, J., Karp, P., Seiler, M., Phillips, S. L., Mitchell, C. J., Saavedra, M., et al. (2003). Development of cystic fibrosis and noncystic fibrosis airway cell lines. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L844-54. doi:10.1152/ajplung.00355.2002.
- Zakrzewska, M., Opalinski, L., Haugsten, E. M., Otlewski, J., and Wiedlocha, A. (2019). Crosstalk between p38 and Erk 1/2 in Downregulation of FGF1-Induced Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1826. doi:10.3390/ijms20081826.
- Zhang, P.-L., Levy, A. M., Ben-Simchon, L., Haggiag, S., Chebath, J., and Revel, M. (2007). Induction of neuronal and myelin-related gene expression by IL-6-receptor/IL-6: A study on embryonic dorsal root ganglia cells and isolated Schwann cells. *Exp. Neurol.* 208, 285–296. doi:https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.08.022.
- Zhang, T., Inesta-Vaquera, F., Niepel, M., Zhang, J., Ficarro, S. B., Machleidt, T., et al. (2012). Discovery of Potent and Selective Covalent Inhibitors of JNK. *Chem. Biol.* 19, 140–154. doi:10.1016/j.chembiol.2011.11.010.
- Ziccardi, P., Nappo, F., Giugliano, G., Esposito, K., Marfella, R., Cioffi, M., et al. (2002). Reduction of Inflammatory Cytokine Concentrations and Improvement of Endothelial Functions in Obese Women After Weight Loss Over One Year. *Circulation* 105, 804–809. doi:10.1161/hc0702.104279.
- Zur, R., Garcia-Ibanez, L., Nunez-Buiza, A., Aparicio, N., Liappas, G., Escós, A., et al. (2015). Combined deletion of p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  reduces skin inflammation and protects from carcinogenesis. *Oncotarget* 6, 12920–12935. doi:10.18632/oncotarget.4320.
- Zuriaga, M. A., Fuster, J. J., Farb, M. G., MacLauchlan, S., Bretón-Romero, R., Karki, S., et al. (2017). Activation of non-canonical WNT signaling in human visceral adipose

tissue contributes to local and systemic inflammation. *Sci. Rep.* 7, 17326.  
doi:10.1038/s41598-017-17509-5.

Zwick, R. K., Guerrero-Juarez, C. F., Horsley, V., and Plikus, M. V (2018). Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. *Cell Metab.* 27, 68–83.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.002>.

