

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“Angiotensina–(1-9) reduce la expresión de marcadores
pro-inflamatorios inducidos por TNF-alfa en
células endoteliales”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magister en
Bioquímica y memoria para optar al título de bioquímico

Andrés Ignacio Ramírez Reyes

Directores de Tesis:

Dres. Sergio Lavandero González - Jaime Riquelme Meléndez

Santiago-CHILE

2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

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

ANDRÉS IGNACIO RAMÍREZ REYES

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica Aplicada y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Jaime Riquelme

Dr. Sergio Lavandero

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mario Chiong

Dr. Alfonso Paredes

Dra. Zully Pedrozo

Tabla de contenido

Agradecimientos	5
Abreviaturas	6
Índice de Figuras	9
Índice de Tablas	11
Financiamiento	12
Resumen	13
Abstract	14
1.- Introducción	15
1.1. Enfermedades cardiovasculares y funciones fisiológicas del endotelio.	15
1.2. Endotelio y su rol en enfermedades cardiacas	15
1.3. Endotelio e inflamación en enfermedades cardiovasculares.	17
1.4. Sistema renina-angiotensina contra-regulatorio.	20
1.5. Ang-(1-9) en enfermedades cardiovasculares	22
1.6. Ang-(1-9) y su potencial anti-inflamatorio.	22
2. Planteamiento de la hipótesis y objetivos	24
2.1 Hipótesis.....	24
2.2. Objetivo General	24
2.3. Objetivos Específicos.....	24
3. Metodología	26
3.1. Cultivo celular.....	26
3.2. Cuantificación de proteínas	26
3.3. Western blot.....	27
3.4. Ensayo de liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	28
3.5. Ensayo de IL-6 por ELISA	28
3.6. Análisis estadístico	28
4. Resultados	29
4.1. Ensayos de LDH en HUVECs incubadas durante 24 h con TNF- α , seguido de 24 h con Ang-(1-9) ..	29
4.2. Marcadores proinflamatorios incubados 24 h con TNF- α , seguido de 24 h con Ang-(1-9) ..	30
4.3. Ensayo de LDH en HUVECs incubadas 24 h con TNF- α , seguido de 3 h con Ang-(1-9)	31
4.4. Marcadores proinflamatorios en HUVECs incubadas 24 h con vehículo de TNF- α , seguido de 3 h con Ang-(1-9).....	32

4.5. Marcadores proinflamatorios en HUVECs incubadas 24 h con TNF- α , seguido de 3 h con Ang-(1-9).....	33
4.6. Detección de IL-6 en sobrenadante de HUVECs incubadas por 24 h con TNF- α , seguido de 3 h de Ang-(1-9).....	37
4.7. Marcadores pro-inflamatorios de HUVECs incubadas 24 h con TNF- α , seguido de 8 h con Ang-(1-9).....	38
4.8. Expresión de AT2R en HUVEC	41
5. Discusión	43
6. Conclusiones	50
7. Actividades extracurriculares realizadas durante la tesis	51
8. Bibliografía.....	52
9.- Anexo.	58

Agradecimientos

Es imposible para una persona plasmar la gratitud de una vida en un pedazo de papel digital. Solo espero que aquellos, aquellas y aquellos que me acompañaron durante el camino, personal o académicamente sepan lo infinitamente agradecidos que les estoy. Y si aún no lo saben, me queda una vida entera para demostrárselos. Sin embargo, dadas las formalidades de este documento no puedo dejar de agradecer a Don Fidel y a la Sra. Gindra, el cielo y la tierra saben que sin el personal técnico los laboratorios no durarían una semana, no solo por su experiencia y trabajo duro tan infravalorado por nuestra sociedad, sino por su infinita calidad humana. Agradezco también a mis compañeros del laboratorio de transducción de señales moleculares, quienes siempre me ayudaron cuando lo necesité y al Profesor Sergio Lavandero por ayudarnos a que esta tesis haya sido posible. Un especial agradecimiento también le debo a mis compañeros del “*Team endotelio*”, Nicolás y Úrsula, sin ustedes mi trabajo no sería más que un pedazo de papel, pero gracias a ustedes fue una experiencia de vida. A mi tutor y mentor, Jaime Riquelme, si más profesores valoraran más al estudiante que a sus notas, la universidad sería un lugar más alegre. No puedo no agradecer a Alexandra Elbakyan, quien ha hecho más por la ciencia que cualquier otro científico del mundo.

“A pesar de no entender muchas cosas ni saber que hacer. Quería contarte que soñé algo increíble y que extraño contarte muchas cosas.

Espero que esta noche sueñe con volcanes submarinos y truenos de todos los colores que se me ocurran, y que quizás mañana, te pueda contar otra cosa increíble.”

Abreviaturas

Akt: Proteína quinasa B, del inglés *protein kinase B*.

Ang-(1-12): Angiotensina 1-12.

Ang-(1-5): Angiotensina 1-15.

Ang-(1-7): Angiotensina 1-7.

Ang-(1-9): Angiotensina 1-9.

Ang-(2-8)/Ang III: Angiotensina 2-8/III.

Ang I: Angiotensina I.

Ang II: Angiotensina II.

Ang IV/ 3-8 Angiotensina IV/ 3-8.

ANOVA: Análisis de varianza, del inglés *Analysis of variance*.

ARAI: Antagonistas del receptor de angiotensina II.

AT1R: Receptor de Angiotensina tipo 1, del inglés *Angiotensin type 1 receptor*.

AT2R: Receptor de Angiotensina tipo 2, del inglés *Angiotensin type 2 receptor*.

BCA: Acido bicinconínico, del inglés *Bicinchoninic acid*.

C21: Compuesto 21.

CCL2/ MCP-1: Quimioquina de ligando 2 motivo C-C, del inglés *chemokine (C-C motif) ligand 2*/ Proteína quimiotáctica de monocitos, del inglés *monocyte chemoattractant protein*.

DOCA: acetato de deoxicorticosterona, del inglés *deoxycorticosterone acetate*.

ECA: Enzima convertidora de Angiotensina I.

ECA2: Enzima convertidora de Angiotensina tipo 2.

ECV: Enfermedades Cardiovasculares.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial, del inglés *endothelial Nitric oxide synthase*.

hCAEC: Células endoteliales de arteria coronaria humana, del inglés *Human Coronary Artery Endothelial Cells*.

HK-2: Células de riñón humano 2, del inglés *Human kidney 2*.

HUVECs: Células endoteliales de vena de cordón umbilical humanas, del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*.

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular 1 del inglés *Intercellular Adhesion Molecule 1*.

IECA (ACEi): Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina M.

IkB: Inhibidor de factor nuclear kB, del inglés *inhibitor of nuclear factor kappa B*.

IKK: Kinasa del inhibidor de factor nuclear kB, del inglés *IkB kinase*.

IL-10: Interleuquina 10.

IL-1 β : Interleuquina 1 β .

IL-6: Interleuquina 6.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LFA-1: Antígeno asociado a función leucocitaria 1, del inglés *Lymphocyte function-associated antigen 1*.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADPH-oxidasa: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa.

NF-kB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.

NO: Óxido nítrico, del inglés *Nitric Oxide*.

PBS-BSA: Tampón fosfato salino-Albumina de suero bovino, del inglés *Phosphate-buffered saline- Bovine Serum Albumin*.

PCR: Reacción de polimerasa en cadena, del inglés *Polymerase chain reaction*.

p-eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial fosforilada, del inglés *phosphorylated endothelial Nitric oxide synthase*.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno, del inglés *polyvinylidene difluoride*.

RIP: Proteína quinasa 1 que interactúa con el receptor, del inglés *Receptor-Interacting Protein Kinase 1*.

RIPA: Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación, del inglés *Radioimmunoprecipitation assay buffer*.

ROS: Especies reactivas del oxígeno, del inglés *Reactive oxygen species*.

SRA: Sistema renina-angiotensina.

TBS: Tampón de tris salino, del inglés *Tris Buffered Saline*.

THP-1: Hospital pediátrico de Tohoku, del inglés *Tohoku Hospital Pediatrics-1*. Línea celular de monocitos humanos.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α , del inglés *tumor necrosis factor α* .

TNFR-1/2: Receptor del factor de necrosis tumoral 1/2 del inglés *tumor necrosis factor receptor 1/2*.

TRADD: Proteína de dominio DEATH asociada al receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1, del inglés *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*.

TRAF-2: Factor 2 asociado al receptor de TNF, del inglés *TNF receptor-associated factor 2*.

T-TBS: Tampón de tris salino con tween, del inglés *Tween- Tris Buffered Saline*.

VCAM-1: Proteína de adhesión de células vasculares 1, del inglés *Vascular cell adhesion protein 1*.

VLA-4: Antígeno muy tardío 1, del inglés *very late antigen-4*.

Índice de Figuras

Figura 1.- Relación entre estrés oxidativo, citoquinas proinflamatorias, inflamación y producción de óxido nítrico.....	18.
Figura 2.- Dinámica subcelular de la activación endotelial mediada por TNF- α	19.
Figura 3.- Modelo propuesto de acción de Ang 1-9 en células endoteliales.....	25.
Figura 4.- Porcentaje de LDH liberado por HUVECs estimuladas por 24 horas con TNF- α (10 ng/mL) seguidas de 24 h de Ang-(1-9)	29.
Figura 5.- Expresión de VCAM-1 en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α y luego por 24 h de concentraciones crecientes Ang-(1-9).....	30.
Figura 6.- Porcentaje de LDH liberado por HUVECs estimuladas por 24 h con TNF- α , seguido de 3 h de Ang-(1-9)	31.
Figura 7.- Niveles proteicos de VCAM-1 en HUVECs incubadas con PBS-BSA por 24 h y con Ang-(1-9) por 3 h.....	32.
Figura 8.- Niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1, comparándose el grupo sin estímulo de TNF- α /sin Ang 1-9, un control positivo (con TNF- α /Sin Ang 1-9) y un grupo sin TNF- α y 100 μ M.....	33.
Figura 9.- Expresión de VCAM-1 en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α y luego por 3 horas de concentraciones crecientes de Ang-(1-9)	34.
Figura 10.- Expresión de eNOS en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α y luego por 3 horas de concentraciones crecientes de Ang-(1-9).....	35.
Figura 11.- Expresión de e-Selectina en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α y luego por 3 h de concentraciones crecientes de Ang-(1-9).....	36.
Figura 12.- Expresión de ICAM-1 en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α y luego por 3 horas de concentraciones crecientes de Ang-(1-9).....	37.
Figura 13.- Niveles de IL-6 en sobrenadante de células HUVEC pre-tratadas con TNF- α por 24 h e incubadas durante 3 h con 0,01 μ M y 100 μ M Ang-(1-9).....	38.
Figura 14.- Expresión de VCAM-1 en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α y luego durante 8 h con concentraciones crecientes de Ang-(1-9).....	39.
Figura 15.- Expresión de e-Selectina en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α y luego durante 8 h con concentraciones crecientes de Ang-(1-9).....	40.

Figura 16.- Expresión de e-Selectina en HUVECs estimuladas por 24 h con TNF- α y 8 h de Ang-(1-9) 100 μ M.....	41.
Figura 18.- Western blot de 3 grupos celulares distintos de pasaje 9 y 10 para evaluar la expresión de AT2R.....	42.
Anexo 1.- Expresión de VCAM-1 en HUVECs estimuladas con TNF-alfa 10 ng/mL por 6, 24 y 48 h.....	58.
Anexo 2.- Expresión de ICAM-1 en HUVECs estimuladas con TNF-alfa 10 ng/mL por 6, 24 y 48 horas.....	59.

Índice de Tablas

Tabla 1.- Listado de anticuerpos primarios utilizados en la realización de los western-blot	27.
---	-----

Financiamiento

Este trabajo de investigación fue financiado a través de los siguientes proyectos:

- Fondecyt de Iniciación 11181000 – Jaime Riquelme Meléndez
- FONDAP 15130011 – Sergio Lavandero González, Jaime Riquelme Meléndez
- Fondecyt 1200490 – Sergio Lavandero González

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son las más prevalentes y mortales en Chile y el mundo. Dentro del sistema cardiovascular, el endotelio juega un papel clave en el desarrollo de múltiples ECV, generalmente a través de su papel como mediador de procesos inflamatorios. La expresión de proteínas proinflamatorias tales como VCAM-1, ICAM-1 y e-Selectina, al igual que la disminución de producción de óxido nítrico (NO) por la pérdida de funcionalidad de la eNOS, son factores claves en el desarrollo de ECV.

Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)], es un péptido que actúa mediante la activación del receptor AT2R y se ha postulado como un potencial agente terapéutico en ECV. La prevención del remodelado cardíaco y efectos antihipertensivos sugieren que este péptido podría ser un componente del Sistema Renina Angiotensina (SRA) contra-regulatorio, que actuaría en distintos tipos celulares. Sin embargo, se desconoce si ejerce efectos antiinflamatorios en el endotelio vascular. Por lo tanto, en esta tesis se propuso la siguiente hipótesis: *Ang-(1-9) reduce la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales estimuladas con TNF- α a través del receptor AT2, disminuyendo la activación de la vía de NF- κ B.*

Para probar esta hipótesis, células HUVECs fueron estimuladas con la citoquina pro-inflamatoria TNF- α para inducir un estado similar al inflamatorio encontrado en patologías cardiovasculares. Una vez incubadas con TNF- α , se evaluaron distintas concentraciones (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M) y tiempos de co-incubación (3, 8 y 24 h) con Ang-(1-9) y se evaluó la expresión de los marcadores proinflamatorios VCAM-1, ICAM-1 y e-Selectina y del marcador de activación endotelial eNOS mediante Western blot. Además, se evaluó mediante ensayo de LDH, que los estímulos utilizados no generaban muerte celular.

No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de muerte celular en ninguna de las concentraciones, ni en los tiempos evaluados (3 y 24 h). No se encontraron cambios en la expresión de los marcadores VCAM-1, ICAM-1 y eNOS, al ser comparados con el grupo control (HUVECs con TNF- α y sin Ang-(1-9)), en ninguna de las concentraciones y tiempos evaluados (3, 8 y 24 h). Por otra parte, la co-incubación de TNF- α y Ang-(1-9) a 0,1; 1 y 10 μ M por 3 h, generó un aumento en el contenido proteico de e-Selectina.

En vista de los resultados, se evaluó la presencia del receptor AT2R por Western blot y se observó que el receptor no se expresa HUVECs. Este resultado explica la ausencia de efecto de Ang-(1-9), en directa contradicción de la literatura actual.

Abstract

Angiotensin 1-9 reduces the expression of TNF- α induced pro-inflammatory markers in endothelial cells.”

Cardiovascular diseases (CVD) are the most prevalent and deadly in Chile and the world. Within the cardiovascular system, the endothelium plays a key role in the development of multiple CVDs, generally through its role as a mediator of inflammatory processes. The expression of proinflammatory proteins such as VCAM-1, ICAM-1 and e-Selectin, as well as the decrease in nitric oxide (NO) production due to the loss of eNOS functionality, are key factors in the development of CVD.

Angiotensin-(1-9) [Ang-(1-9)], is a peptide that acts by activating the AT₂R receptor and has been postulated as a potential therapeutic agent in CVD. The prevention of cardiac remodeling and antihypertensive effects suggest that this peptide could be a component of the counterregulatory Renin Angiotensin System (RAS), which would act on different cell types. However, it is unknown whether it exerts anti-inflammatory effects on the vascular endothelium. Therefore, in this thesis the following hypothesis was proposed: Ang-(1-9) reduces the expression of pro-inflammatory markers in endothelial cells stimulated with TNF- α through the AT₂ receptor, decreasing the activation of the NF pathway - κ B.

To test this hypothesis, HUVECs were stimulated with the pro-inflammatory cytokine TNF- α to induce a state similar to the inflammatory state found in cardiovascular pathologies. Once incubated with TNF- α , different concentrations (0.01; 0.1; 1; 10 and 100 μ M) and co-incubation times (3, 8 and 24 h) with Ang-(1-9) were evaluated. and the expression of the proinflammatory markers VCAM-1, ICAM-1 and e-Selectin and the endothelial activation marker eNOS was evaluated by Western blot. In addition, it was evaluated by LDH assay that the stimuli used did not generate cell death.

No significant differences were found in the percentages of cell death in any of the concentrations, nor in the evaluated times (3 and 24 h). No changes were found in the expression of the markers VCAM-1, ICAM-1 and eNOS, when compared with the control group (HUVECs with TNF- α and without Ang-(1-9), at any of the concentrations and times evaluated (3, 8 and 24 h). On the other hand, the co-incubation of TNF- α and Ang-(1-9) at 0.1, 1 and 10 μ M for 3 h, generated an increase in the protein content of e-Selectin.

In view of the results, the presence of the AT₂R receptor was evaluated by Western blot and it was observed that the receptor is not expressed in HUVECs. This result explains the lack of effect of Ang-(1-9), in direct contradiction of the current literature.

1.- Introducción

1.1. Enfermedades cardiovasculares y funciones fisiológicas del endotelio

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan la primera causa de muerte a nivel mundial. Anualmente, se reportan alrededor de 17,9 millones de muertes en todo el globo (31% de todas las muertes a nivel mundial). Más del 75% de las ECV se concentran en países de ingresos medios y bajos [1] y cerca de la mitad de la población chilena está en riesgo cardiovascular moderado o alto [2].

Un componente celular del sistema cardiovascular corresponde a las células endoteliales, también llamadas endotelio vascular. Su papel fisiológico es variado y ellas presentan heterogeneidad a lo largo de los distintos vasos sanguíneos [3,4]. Entre sus funciones destacan: 1) control de permeabilidad vascular, 2) regulación del tono vascular, 3) mediador de respuestas inmunológicas 4) mantenimiento y regulación de la hemostasia. Por lo tanto, estas células no solo funcionan en el sistema cardiovascular, sino que también son parte del sistema inmune. Este sistema se compone de un revestimiento de células endoteliales dentro de los vasos sanguíneos. Estas células están estrechamente asociadas a pericitos que soportan la estructura vascular. Las células endoteliales tienen distintas adaptaciones según el tejido donde se encuentran. Por ejemplo, en el cerebro forman la barrera hemato-encefálica y en el endocardio se doblan adaptándose a un latido constante [5,6]. Respecto a su función en el sistema inmune, estas células cumplen funciones paracrinas y de intermediario inmunológico, secretando quimioquinas, interleucinas, interferones y factores de crecimiento. Además, median el reclutamiento de células del sistema inmune y extravasación de leucocitos en lugares de inflamación mediante la expresión de moléculas de adhesión como molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1), e-Selectina y p-Selectina [7].

1.2. Endotelio y su rol en enfermedades cardíacas

El endotelio ha sido reconocido como un componente importante en diversas patologías. Su remodelado es de vital importancia en la angiogénesis que ocurre en tumores cancerígenos, siendo la hipoxia principal promotor de este proceso [8,9]. Si bien durante

el infarto del miocardio, los cardiomiocitos son el principal tipo celular afectado del corazón, el endotelio, fibroblastos y células musculares lisas vasculares también experimentan cambios en respuesta al daño por isquemia/reperfusión [10].

En la última década se ha estudiado los efectos protectores del condicionamiento cardiaco previo (pre-condicionamiento), durante (per-condicionamiento) o justo después (post-condicionamiento) de un evento isquémico. En este contexto, al endotelio se le han atribuido diversas funciones: ser un receptor de restos derivados de la sangre durante el condicionamiento, sensor de estrés por hipoxia, agente paracrino involucrado en el reclutamiento de células distales no endoteliales y como un blanco para la protección misma [10]. Se ha descrito que el endotelio estimula la cardioprotección en respuesta a eritropoyetina mediante la producción del óxido nítrico (NO) [11]. Se ha descrito que agentes farmacológicos cardioprotectores requieren al endotelio para ejercer su efecto protector. El anestésico volátil isoflurano produce cardioprotección cuando se administra antes o después de un evento isquémico [12, 13]. El grupo de Leucker *et al.* estudió el papel del endotelio en este proceso y descubrió que la producción endotelial de NO es inducida por isoflurano, confiriendo protección frente al daño celular [14]. Por otra parte, nuestro laboratorio describió que el sedante dexmetomidina activa el eje óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)/NO y requiere que la interacción de este fármaco con el endotelio para la cardioprotección [15]. También se ha mostrado que las vesículas extracelulares pequeñas aisladas de células endoteliales son agentes protectores y posibles mediadores del preconditionamiento isquémico [16].

El endotelio también juega un papel clave en la aterosclerosis. Esta enfermedad precede a diversas patologías cardiovasculares, como el infarto del miocardio, trombosis venosa profunda, accidentes cerebrovasculares, angina inestable y muerte cardiaca súbita. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis son: edad avanzada, hipertensión arterial, ejercicio, hiperlipidemia, diabetes, enfermedades inflamatorias y autoinmunes y el consumo de tabaco [17]. En la etapa temprana ocurre “activación endotelial”, observándose estimulación de la respuesta inmune innata en arterias con una morfología poligonal típicas de zonas con flujos sanguíneos no laminares [18]. En estas zonas existe expresión de moléculas de adhesión en el endotelio como e-Selectina, p-Selectina, VCAM-1, ICAM-1 y Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), además del reclutamiento de monocitos que migran a través del endotelio y secretan

citoquinas como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleuquina 1 (IL-1) e Interleuquina 6 (IL-6) [19]. En la segunda etapa ocurre la formación de células espumosas, donde células del músculo liso vascular y macrófagos retienen lipoproteínas. La tercera etapa comprende la progresión de la placa ateromatosa formada por las células espumosas, que aumentando de tamaño y se desestabiliza por la secreción de citoquinas, metaloproteasas y catepsinas. La cuarta etapa comprende eventos agudos derivados de la desestabilización de la placa ateromatosa, generando infarto, fibrilación ventricular o muerte súbita coronaria [17].

El endotelio, por tanto, es un importante blanco farmacológico en el tratamiento de la aterosclerosis. Las estatinas son actualmente uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de esta enfermedad, por su efecto hipolipidémico. A nivel de endotelio vascular, se ha descrito que hipercolesterolemia genera disfunción endotelial, disminuyendo los niveles de NO endotelial. Al respecto, las estatinas aumentan los niveles de eNOS y disminuyen tanto las ROS, como la expresión de citoquinas proinflamatorias en las células endoteliales [20].

1.3. Endotelio e inflamación en enfermedades cardiovasculares

Como ya se expuso, el endotelio es clave en la génesis y desarrollo de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, estas patologías también tienen un componente inflamatorio relevante que contribuye a su génesis y progresión como, por ejemplo, la aterosclerosis [21]. En el endotelio, la inflamación se estudia principalmente como activación endotelial. En condiciones fisiológicas, el endotelio no interactúa con células del sistema inmune, dado que no presentan expresión de las proteínas de membrana necesarias para un anclaje efectivo [22]. Sin embargo, en respuesta a interacción con un microorganismo u otros estímulos inflamatorios, los macrófagos secretan TNF- α o IL-1 β . En respuesta a estas citoquinas, se induce la expresión de proteínas intracelulares y de membrana, entre las que se cuentan a las moléculas endoteliales de adhesión leucocitaria (ELAMs por sus siglas en inglés): e-Selectina, VCAM-1 e ICAM-1. Así, las células endoteliales interactúan de manera eficiente con leucocitos. Las células endoteliales activadas también sintetizan y secretan diversas citoquinas. Los leucocitos por su parte, expresan moléculas como LFA-1 y VLA-4, que actúan como contra-receptores de VCAM-1 e ICAM-1. Una vez establecida la unión entre la célula endotelial

y el leucocito, este último se extravasa hacia el tejido donde ocurre la inflamación. Otro componente de la respuesta inflamatoria endotelial es la Interleucina 6 (IL-6), citoquina proinflamatoria inducida por NF-kB. La IL-6 estimula la síntesis de proteínas de fase aguda, maduración de linfocitos B y la producción de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA [23]. Además, los procesos pro-inflamatorios ya descritos también se asocian a la generación de disfunción endotelial. En este estado, el endotelio sufre cambios celulares que no permiten una función adecuada del mismo, los cuales, si se prolongan en el tiempo, promueven la aparición de diversas patologías cardiovasculares, como la hipertensión y la aterosclerosis (Fig 1). Este estado se caracteriza por una sobreexpresión de moléculas de adhesión celular, reducida biodisponibilidad de NO y aumento de la liberación de factores vasoconstrictores derivados del endotelio [24].

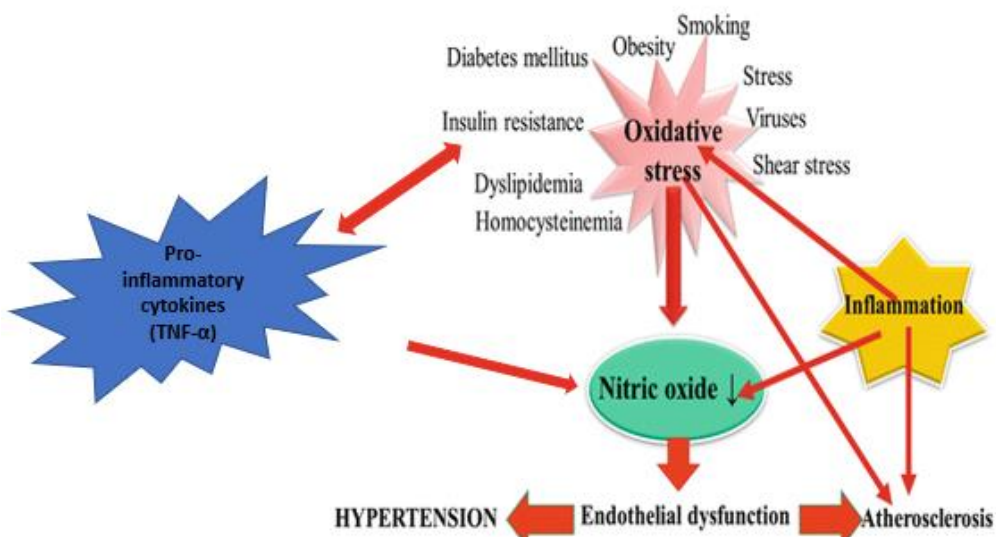


Figura 1. Relación entre estrés oxidativo, citoquinas proinflamatorias, inflamación y producción de óxido nítrico. La generación de estrés oxidativo en conjunto con un estado inflamatorio y la producción de citoquinas proinflamatorias generan una baja en la producción de óxido nítrico. Sin este, el endotelio no genera efectos vasodilatadores, promoviendo la aparición de hipertensión y aterosclerosis. *Adaptado de KONUKOGLU, Dildar; UZUN, Hafize. Endothelial dysfunction and hypertension. En Hypertension: from basic research to clinical practice. Springer, Cham, 2016. p. 511-540*

TNF- α es una citoquina maestra activadora del endotelio (Fig 2). Modelos de ratones transgénicos han validado esta citoquina y su receptor como protagonistas de la respuesta inflamatoria [25]. Mientras tanto, estudios en seres humanos han mostrado la efectividad de los anticuerpos anti-TNF-alfa o anti-receptor de TNF en el tratamiento de enfermedades autoinmunes [26]. Las células endoteliales humanas expresan dos

subtipos de receptores para TNF- α ; TNFR-1 y TNFR-2 [27]. Estos receptores difieren en la localización celular en las células endoteliales. El TNFR-1 se ubica mayoritariamente en el Golgi, con poca expresión en la membrana celular, mientras que el TNFR-2 se encuentra principalmente en la membrana celular [28]. TNF- α induce la activación del factor de transcripción NF- κ B, mediante la interacción del receptor TNRF-1 y otras proteínas adaptadoras como TRADD, TRAF-2 y RIP. En células HUVEC no estimuladas, I κ B secuestra NF κ B en el citosol. IKK es fosforilado en respuesta a la activación del TNFR-1 y a su vez fosforila I κ B, el cual es rápidamente ubiquitinado y degradado vía proteosoma. Una vez libre del I κ B, NF- κ B transloca al núcleo y se une a secuencias del ADN (elementos de respuesta a NF- κ B), presentes en los promotores de los genes para ICAM-1 y VCAM-1 [29].

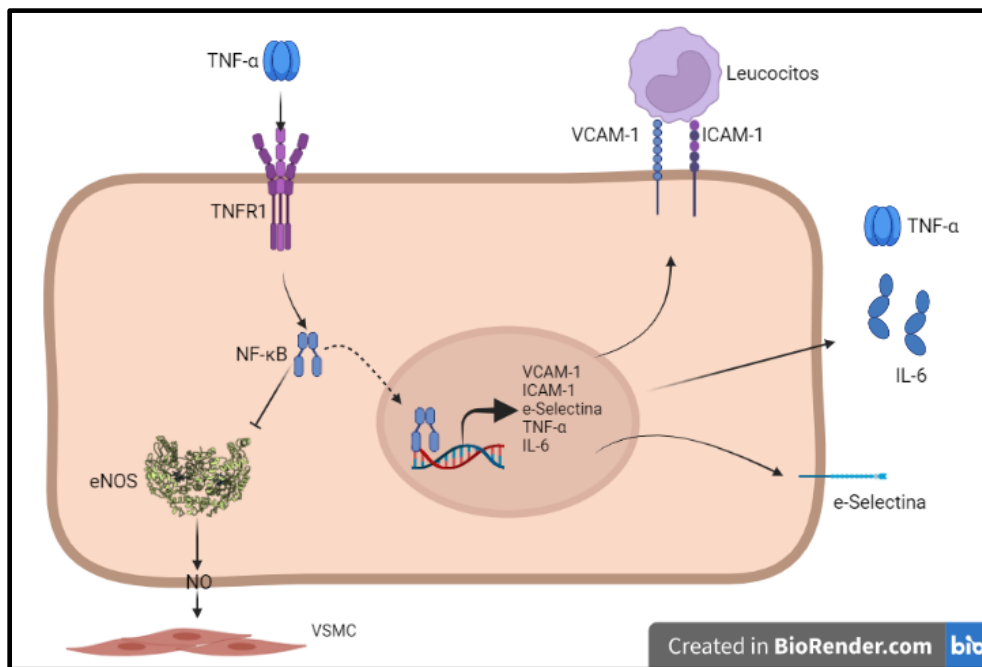


Figura 2. Dinámica subcelular de la activación endotelial mediada por TNF- α . En respuesta a TNF- α , se desencadena la transducción de señal que termina por la translocación de NF- κ B al núcleo celular, donde los genes con sitios de respuesta a este factor transcripcional inician su transcripción y posterior traducción. *Adaptado de STEYERS, Curtis M.; MILLER, Francis J. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. International journal of molecular sciences, 2014.*

Angiotensina II (Ang II) es un reconocido estímulo que promueve un estado proinflamatorio endotelial, a través de la estimulación de la actividad de NADH-/NADPH-

oxidasa, aumentando la cantidad de anión superóxido ($O_2\cdot^-$) y afectando el balance redox en las células endoteliales [30]. Adicionalmente, Ang II también es un activador de la vía NF- κ B en células endoteliales, aumentando la expresión de VCAM-1 [31]. En pacientes hipertensos, el uso de antagonistas del receptor de Ang II ha mostrado suprimir la generación de citoquinas pro-inflamatorias y estrés oxidativo [32]. Por lo tanto, el endotelio es un componente crítico en el desarrollo de enfermedades que cuentan con un componente inflamatorio crónico de bajo grado. En dicho sentido, el desarrollo de nuevas terapias debe considerar el papel clave de estas células para reducir la inflamación de una manera eficaz. Esta estrategia terapéutica tiene el potencial de tener un impacto significativo para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, que hasta la fecha no ha sido explorada en profundidad.

1.4. Sistema renina-angiotensina contra-regulatorio

El Sistema Renina Angiotensina (SRA) ha sido estudiado por más de un siglo [33]. En el sistema SRA canónico, el angiotensinógeno sintetizado en el hígado es convertido a angiotensina I (Ang I) por la acción de renina producida en la corteza renal y secretada a la circulación en respuesta a cambios en la presión sanguínea o por un desbalance de electrolitos. Luego, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) remueve dos aminoácidos de Ang I, produciendo Ang II. Ang II es el principal efector del SRA y tiene diversos efectos en todo el sistema vascular. Existen dos receptores que tienen como ligando Ang II, denominados AT1R y AT2R. Ambos receptores corresponden a receptores polipeptídicos con 7 dominios transmembrana. Estos receptores están presentes en la mayoría del cuerpo, incluyendo riñón, corazón, vasos sanguíneos, glándula adrenal, hígado, cerebro y pulmones. Sus efectos principales (incluyendo vasoconstrictores, secreción de aldosterona, retención de agua y sal) son mediados por el AT1R [33]. La activación crónica de este sistema se vincula al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, tales como hipertensión arterial y aterosclerosis [34]. Se han desarrollado distintos fármacos que tienen como blanco el SRA para tratar estas enfermedades. Los fármacos más comunes son los inhibidores de la (IECA) (ACEi) y los antagonistas del receptor de Ang II de tipo 1 (ARAI) y su uso se extiende a la hipertensión arterial, enfermedades renales, infarto del miocardio, hipertrofia del ventrículo izquierdo, nefropatía diabética, entre otras [35, 36]. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha descrito un sistema SRA contra-regulatorio que tendría efectos

contrarios al SRA canónico. Este sistema se compone de péptidos derivados del SRA canónico como: angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)], angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], alamandina, angiotensina-(1-12) [Ang-(1-12)], angiotensina-(1-5), angiotensina-(2-8) (Ang III) y angiotensina-(3-8) (Ang IV). Estos péptidos expanden el concepto del SRA canónico, ya que no solo representan nuevos ligandos con diferentes actividades respecto al receptor AT1, sino que también tienen interacciones con otros receptores [37].

Ang-(1-7) es un péptido de 7 aminoácidos (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro) formado a partir del corte proteolítico de Ang II por la enzima convertidora de angiotensina-2 (ECA2). Ang-(1-7) tiene como receptor el receptor *Mas* y ejerce efectos contrarios a los ejercidos por Ang II, tales como reducción de presión sanguínea y de la secreción de noradrenalina en modelos animales [38]–[40]. En modelos de ratones *knockout* para apolipoproteína E (-/-), la administración crónica de este péptido tiene un efecto vasoprotector, mejora la función endotelial y protege frente a la aterosclerosis [41]. En un modelo de asma en ratones, Ang-(1-7) contribuye a la resolución del proceso inflamatorio [42]. Ang III generada a partir de Ang II por corte de aminopeptidasa A, ejerce efectos similares a Ang II y actúa a través del AT1R [43]. Ang IV, a su vez, deriva de Ang III por acción de la aminopeptidasa E y contribuye al desarrollo neuronal, aprendizaje, memoria y regulación del flujo sanguíneo [44]. Ang-(1-12) es un péptido que sirve como precursor de Ang I y Ang II, con la particularidad que su síntesis sería independiente de renina [45].

1.5. Ang-(1-9) en enfermedades cardiovasculares

Por otra parte, Ang-(1-9) es un péptido de secuencia Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His, originado a partir del corte proteolítico de Ang I por ECA2. Este péptido ha tomado relevancia en el último tiempo por sus efectos cardioprotectores. En modelos animales ha mostrado que su administración sistémica disminuye significativamente la muerte celular y la recuperación del ventrículo izquierdo después de un infarto del miocardio [46]. En un modelo *ex vivo* de isquemia-reperfusión, Ang-(1-9) redujo el tamaño del infarto y mejoró la función contráctil [46]. En un estudio *in vitro*, usando cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatas, Ang-(1-9) disminuyó la muerte celular inducida por isquemia-reperfusión simulada [46]. Este péptido actúa vía AT2R [47,48], ejerciendo efectos anti-hipertensivos, aumentando la producción de NO e induciendo vasodilatación [49]. Ocaranza et al. mostraron que estos efectos anti-hipertensivos de Ang-(1-9) en modelos de ratas hipertensas son mediados a través del AT2R. La infusión de Ang-(1-9) redujo los niveles de presión sanguínea, revirtió el remodelado vascular, disminuyó el estrés oxidativo cardiovascular y la actividad de ECA. Este mismo estudio sugirió que los efectos de Ang-(1-9) sobre la presión sanguínea podrían estar mediados por NO producido en el endotelio [49]. Por lo tanto, Ang-(1-9) es un atractivo agente terapéutico, no solo por sus efectos, sino también por ser de origen endógeno, lo que sugiere un perfil de seguridad favorable [50].

1.6. Ang-(1-9) y su potencial anti-inflamatorio

A pesar de los múltiples efectos protectores de Ang-(1-9) en diferentes modelos experimentales de enfermedades cardiovasculares, hasta a la fecha no hay estudios que evalúen su efecto directo en el endotelio. Tanto el endotelio vascular del corazón como del riñón expresan ECA2 [51]. También se ha descrito la presencia del AT2R en el endotelio vascular. En células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC, por sus siglas en inglés), la presencia del AT2R parece tener poco impacto en la producción de NO en respuesta a insulina [52]. Pastore et al. estudiaron el efecto de Ang II sobre los niveles de ICAM-1 en células HUVEC. En este trabajo, Ang II estimula la expresión de ICAM-1 y los antagonistas del AT2R no modificaron la expresión de ICAM-1 [53]. Toedebucsh *et al* usaron un agonista del AT2R en HUVECs y en células endoteliales de arteria coronaria (hCAEC). Este nuevo agonista tuvo efectos en la expresión del AT2R,

generando un feedback positivo en la expresión del mRNA y los niveles proteicos del AT2R después de 7 días de tratamiento. También se mostró que este agonista aumentó los niveles de eNOS y NO en células hCAEC [54]. En la línea celular de macrófagos THP-1, que expresan AT1R y AT2R, el agonista del AT2R C21 disminuyó la producción de TNF- α e IL-6 en respuesta a la estimulación por lipopolisacáridos y aumentó la producción de interleuquina 10 (IL-10), ejerciendo un efecto anti-inflamatorio [55]. Resultados similares se encontraron en la línea celular HK-2 del túbulo proximal epitelial humano pre-tratados con el agonista del AT2R C21, previo a la exposición a liposacáridos, aumentando los niveles de IL-10 y disminuyendo los niveles de TNF- α e IL-6. En este mismo estudio, en ratas pre-hipertensas, los niveles de TNF- α e IL-6 disminuyeron cuando se trataron con C21 y el tratamiento con el antagonista de AT2R PD123319, disminuyó los niveles de IL-10 [56]. Adicionalmente, en ratas Wistar sometidas a infarto del miocardio y tratadas con C21, se observó una disminución de los niveles de mRNA de IL-1 β , IL-2 e IL-6 [57]. En ratas hipertensas (modelo DOCA) tratadas con Ang-(1-9), se generó una reducción de la infiltración de monocitos en el tejido cardíaco. Sin embargo, este efecto no se previno al co-incubar Ang-(1-9) con PD123319 [58]. Además, Ocaranza *et al.* reportaron que, en dos modelos de hipertensión en ratas, Ang-(1-9) redujo la presión sanguínea y mejoró la función endotelial. Además, sus resultados sugieren que el endotelio tiene un rol central en la acción vasodilatadora de Ang-(1-9) [49]. Por lo que, en resumen, se desconoce el efecto de Ang-(1-9) en células endoteliales y si en particular, ejerce efectos anti-inflamatorios, lo que podría sugerir su uso como potencial agente terapéutico de relevancia para prevenir y controlar la progresión de ECV.

2. Planteamiento de la hipótesis y objetivos

Considerando que el estado pro-inflamatorio del endotelio es un blanco terapéutico relevante para el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares y que el péptido Ang-(1-9) ha mostrado potentes efectos protectores en la vasculatura, así como en otros tejidos, el presente estudio busca evaluar el potencial antiinflamatorio de Ang-(1-9) en células endoteliales. Para esto, se propuso la siguiente hipótesis:

2.1 Hipótesis

Angiotensina-(1-9) reduce la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales estimuladas con TNF- α a través del receptor AT2, disminuyendo la activación de la vía de NF- κ B.

2.2. Objetivo General

Determinar si Ang-(1-9) disminuye la expresión de marcadores pro-inflamatorios inducidos por TNF- α , mediante un mecanismo dependiente del receptor AT2 y la inhibición de la vía NF- κ B en células endoteliales humanas de vena umbilical (HUVEC).

2.3. Objetivos Específicos

1. Evaluar si Ang-(1-9) reduce la expresión de marcadores pro-inflamatorios inducidos por TNF-alfa vía AT2R en células endoteliales humanas de vena umbilical.
2. Determinar si Ang-(1-9) reduce la activación de la vía de NF- κ B en células endoteliales humanas de vena umbilical estimuladas con TNF-alfa.

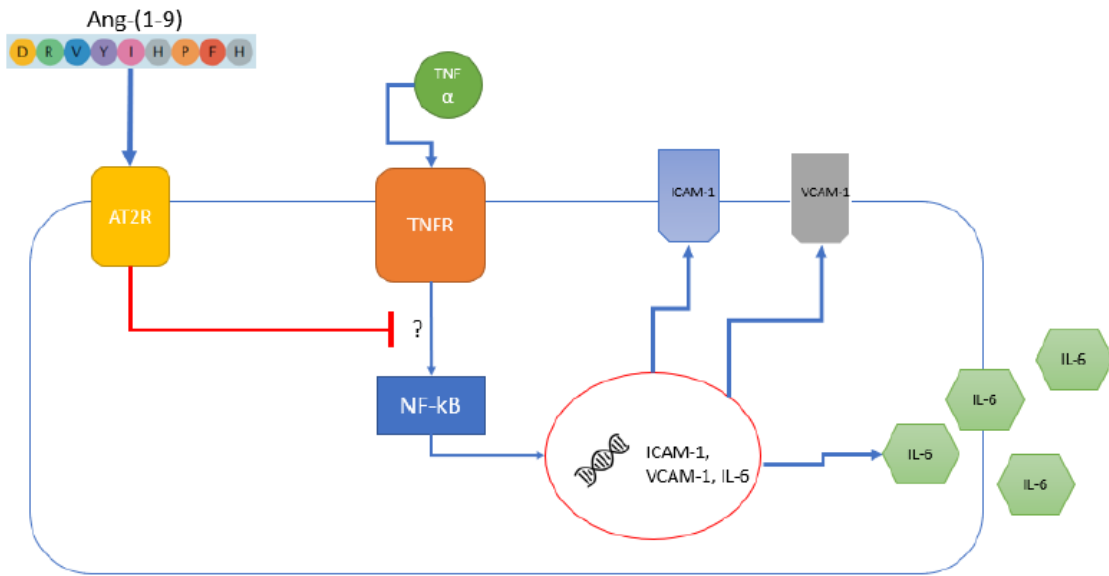


Figura 3. Modelo propuesto de acción de Ang-(1-9) en células endoteliales.

3. Metodología

3.1. Cultivo celular

Se utilizaron células endoteliales de vena de cordón umbilical humanas (HUVEC) mantenidas con Endothelial BASAL Medium-2 (Lonza), suplementado con EGM-2 SingleQuot kit (Lonza). Se usaron pasajes celulares entre 8 y 12 y se utilizó una enzima comercial para el realizar el pasaje de las células (Accutase, Sigma). Las células se incubaron a 37°C en un ambiente de 95% de aire y 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80-90% para ser estimuladas o realizar pasajes. Una vez alcanzada la confluencia óptima, las células fueron sembradas en placas de 60 mm, de acuerdo con los distintos estímulos de cada grupo experimental. Las células fueron estimuladas con TNF- α 10 ng/mL (R&D systems, #210-TA) por 24 h o con su vehículo (PBS-BSA 0,1%). Luego, se incubaron placas con concentraciones crecientes (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M) de Ang-(1-9) por 3, 8 y 24 h, dependiendo de cada grupo experimental, además de una condición experimental control con el vehículo (agua Milli-Q). Cabe destacar que tras las 24 h de incubación con TNF- α , no se cambió el medio de cultivo de las células, por lo que el tiempo final de estos estímulos es de 27, 32 y 48 h. El inhibidor PD123319 se pre-incubó en una concentración de 1 μ M durante 30 minutos y su vehículo es agua Milli-Q. Posterior a los estímulos, las células fueron lavadas con PBS frío, se administró buffer RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer) y se almacenaron congeladas a -80°C envueltas en papel aluminio, para su posterior procesamiento.

3.2. Cuantificación de proteínas

Se obtuvieron lisados celulares con RIPA y fueron centrifugados por 13 min a 14,500 g. Se rescató el sobrenadante en tubos de 1,5 mL y se utilizó un kit de cuantificación de proteínas basado en el método del ácido bicinconínico (PIERCE BCA PROTEIN ASSAY #23225, Thermo Scientific). En breve, 1 μ L de muestra fue incubado con 200 μ L de la mezcla de reactivos del kit durante 1 h a 50°C. La placa fue leída a 560 nm en un lector de placas. La cuantificación se realizó con la absorbancia de una curva estándar de 5 puntos (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 mg/mL), mediante una regresión lineal, restando el blanco de las muestras y de la curva (RIPA y agua destilada, respectivamente).

3.3. Western blot

Las proteínas purificadas fueron mezcladas con buffer de carga y agua destilada para cargar 10 µg (geles del grupo de 24 h de Ang 1-9) o 20 µg (grupos de 3 y 8 h) de proteína, normalizando por volumen (carga total 30 µL). La electroforesis se realizó a 80 V en geles al 8% o al 10%, dependiendo del peso molecular de las proteínas buscadas (8% para eNOS, e-Selectina, VCAM-1 o ICAM-1, 10% para AT2R). Para la transferencia, se utilizaron membranas de PVDF, y se transfirieron a 400 mA por 90 min a 4°C. Posterior a la transferencia, se comprueba que esta fue efectiva con una tinción con rojo ponceu y una vez observadas las proteínas, se lavaron las membranas con Tween-TBS y se bloquearon por 1 h en solución al 5% de leche. Posterior al bloqueo, se incubaron las membranas con los respectivos anticuerpos primarios (Tabla 1) en las diluciones señaladas durante la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con T-TBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Rabbit Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate, Calbiochem, Merck #402335) por 45 min. Luego de 45 min, las membranas se lavaron 3 veces con T-TBS y se incubaron durante 30 seg con un mix de revelado ECL y se revelaron en un equipo LI-COR durante 2 o 5 min, dependiendo de la cantidad de proteína cargada y la sensibilidad del anticuerpo.

Nombre del anticuerpo	Marca	Numero de catálogo	Peso molecular	Dilución Anticuerpo 1°	Dilución Anticuerpo 2°
VCAM-1	Santa Cruz	sc-13160	~110 kDa	1:1000	1:5000
ICAM-1	Santa Cruz	sc-8439	~85-110 kDa	1:1000	1:5000
e-Selectina	Santa Cruz	sc-137054	115 kDa	1:1000	1:5000
eNOS	BD	610297	~120 kDa	1:1000	1:5000
β-tubulina	Sigma	T-0198	~55 kDa	1:5000	1:5000
AT2R	Invitrogen	MA5-38084	50 kDa	1:500	1:1000

Tabla 1. Listado de anticuerpos primarios utilizados en la realización de los western-blot.

3.4. Ensayo de liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Con el fin de determinar si los estímulos usados ejercen potenciales efectos citotóxicos, se utilizó un kit de liberación de LDH, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (CytoTox 96® Non-radioactive Cytotoxicity Assay #G1780. PROMEGA).

3.5. Ensayo de IL-6 por ELISA

Se utilizó un subgrupo de muestras para evaluar la secreción de IL-6. Las células se pre-incubaron por 24 h con TNF- α y posteriormente tratadas durante 3 y 8 h con Ang-(1-9). IL-6 se determinó con el kit Quantikine ELISA Human IL-6 (R&D systems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del Kit es de 0-300 pg/mL.

3.6. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 8.0.1. Para evaluar la normalidad de los datos, se utilizó un test Shapiro-Wilk. Para analizar *outliers*, se utilizó un test Q. Para evaluar diferencias significativas entre grupos se utilizó un ANOVA de 1 o 2 vías, seguido de un post-test de Tukey para evaluar múltiples comparaciones. Se consideró como diferencias significativas aquellas que cumplieran con un *p-value* < 0,05. Se presentaron los datos como el promedio \pm la desviación estándar.

4. Resultados

4.1. Ensayos de LDH en HUVECs incubadas durante 24 h con TNF- α , seguido de 24 h con Ang-(1-9)

Considerando que es primera vez que se estudia el efecto de Ang-(1-9) en HUVECs pre-estimuladas con TNF- α , se determinó la muerte celular, con el fin de descartar potenciales efectos citotóxicos inducidos por la combinación de los estímulos. Para evaluar esto, células HUVEC fueron pre-incubadas con TNF- α (10 ng/mL) durante 24 h. Posteriormente, las células fueron tratadas con Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M) por 24 h y el inhibidor de AT2R PD123319 (1 μ M) fue pre-incubado por 30 min. Se evaluó la muerte celular mediante un ensayo de LDH. Los resultados muestran que TNF- α no indujo muerte celular en comparación con el control. Sin embargo, se observan diferencias estadísticamente significativas entre Ang-(1-9) 100 μ M y las condiciones de TNF- α , TNF- α + con Ang-(1-9) 0,01, 1, 100 μ M y TNF- α + PD123319 (Figura 4).

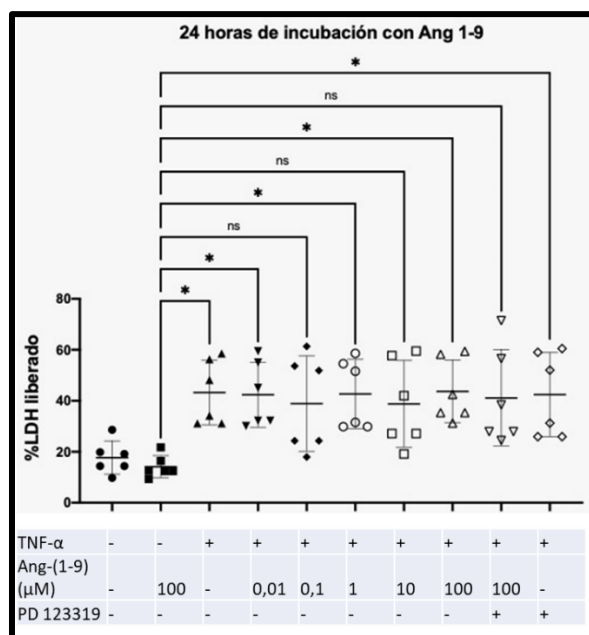


Figura 4. Porcentaje de LDH liberado por HUVECs estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) seguidas de 24 h de Ang-(1-9) en las concentraciones señaladas (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). Se incluyeron a este experimento grupos controles con el inhibidor del receptor AT2 PD123319 1 μ M pre-incubado por 30 min. El test de Shapiro-Wilk mostró que los datos tenían una distribución normal y no se encontraron *outliers*. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, con post-test de Tukey (*= p value < 0.05). Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD) N = 6.

4.2. Marcadores pro-inflamatorios incubados 24 h con TNF- α , seguido de 24 h con Ang-(1-9)

Para evaluar el efecto de Ang-(1-9) sobre la expresión de parámetros pro-inflamatorios inducida por TNF- α , se realizó una estandarización de tiempo y concentración de incubación de Ang-(1-9). Considerando resultados previos del laboratorio y de literatura primaria, se realizó una incubación de 24 h con TNF- α (10 ng/mL) para inducir un estado pro-inflamatorio. Luego, se administraron concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10; 100 μ M) por 24 h adicionales y se midieron los niveles proteicos de VCAM-1 por Western blot. Como controles, se evaluó un grupo con el vehículo de TNF- α (PBS-BSA 0,1%) y otro grupo incubado con TNF- α por 24 h y con el vehículo de Ang-(1-9) (agua destilada). Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre ninguno de los grupos tratados con TNF- α y todos estos grupos expresaron más VCAM-1, en comparación con el grupo que no fue tratado con TNF- α (Figura 5).

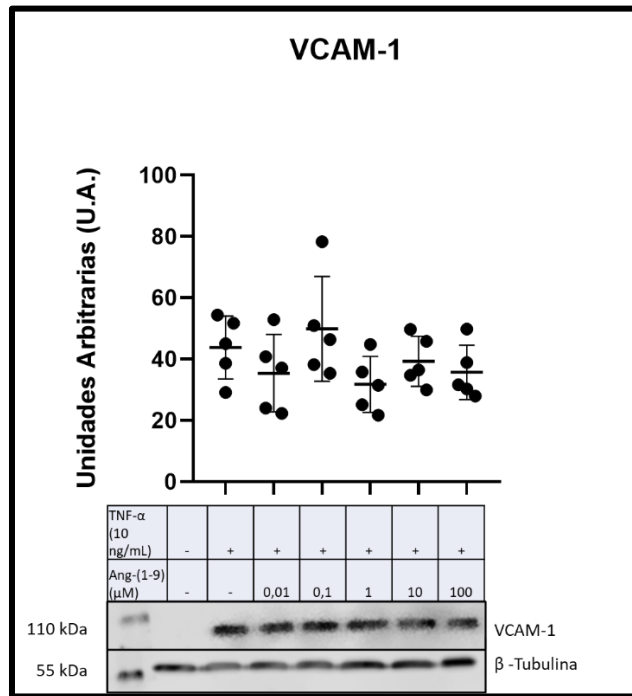


Figura 5.- Expresión de VCAM-1 en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y luego por 24 h de concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). De izquierda a derecha: Pesos moleculares indicados por el estándar de peso molecular, primer carril corresponde al grupo control que no se incubó con TNF- α (PBS-BSA 0,1%) y no expresa VCAM-1. Carriles del 2 al 7 son los grupos incubados con las concentraciones crecientes de Ang 1-9. Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk, confirmándose la normalidad de los mismos. Luego, se analizó en busca de *outliers* con un test Q, sin encontrarse ninguno. Finalmente, se realizó un ANOVA de una vía, seguido de un post-test de Tukey, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos tratados con TNF- α . Como control de carga se utilizó β -tubulina. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N = 5.

4.3. Ensayo de LDH en HUVECs incubadas 24 h con TNF- α , seguido de 3 h con Ang-(1-9)

Se evaluó un segundo tiempo de incubación con Ang-(1-9) para observar los efectos de este péptido en un tiempo corto. Posterior a la administración de TNF- α (10 ng/mL) durante 24 h, las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10; 100 μ M) por 3 h y se midió el porcentaje de liberación de LDH. Los datos muestran que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

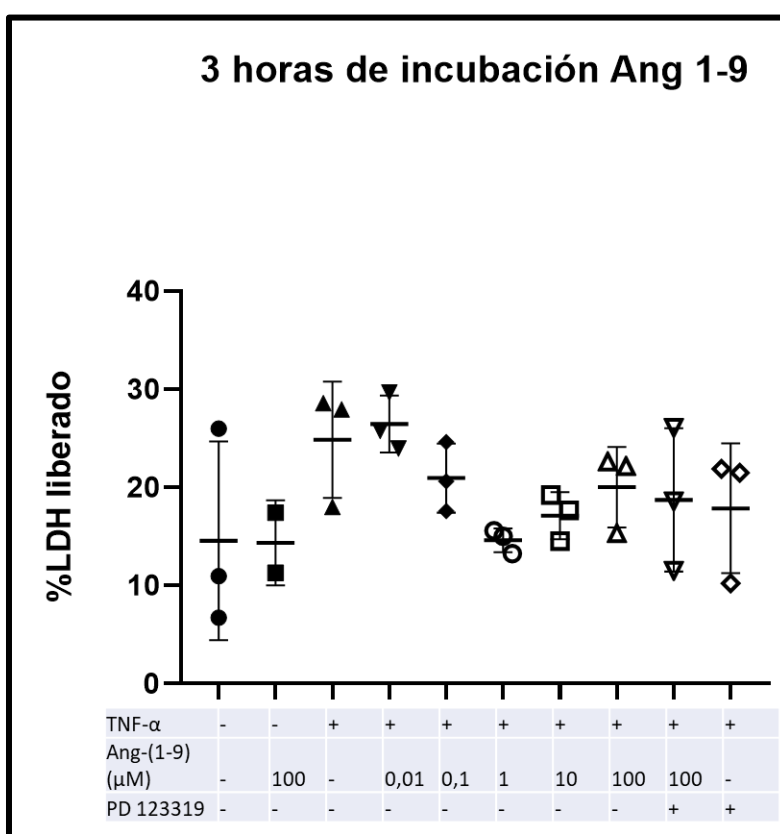


Figura 6. Porcentaje de LDH liberado por HUVECs estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL), seguido de 3 h de Ang-(1-9) en las concentraciones señaladas (0,01; 0,1; 1; 10; 100 μ M). Se incluyeron grupos controles con el inhibidor del receptor AT2 PD123319 a concentración 1 μ M. El test de Shapiro-Wilk mostró que los datos tenían una distribución normal y mediante test Q se eliminó un outlier. Los datos fueron analizando mediante ANOVA de una vía con post-test de Tukey y se encontró que no hay diferencias en la liberación de LDH entre los distintos grupos. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=3.

4.4. Marcadores pro-inflamatorios en HUVECs incubadas 24 h con vehículo de TNF- α , seguido de 3 h con Ang-(1-9)

Con el fin de descartar la inducción de parámetros pro-inflamatorios en respuesta a Ang-(1-9), células HUVEC fueron incubadas por 24 h con PBS-BSA (0,1%) y concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M) por 3 h y se midieron los niveles proteicos de VCAM-1 por Western blot. Los resultados muestran que ninguna concentración de Ang-(1-9) induce la expresión de VCAM-1, lo que es confirmado por la inducción de esta proteína en presencia de TNF- α (10 ng/mL) como control positivo (Fig 7). Si bien este experimento solo muestra 2 repeticiones, estos hallazgos fueron corroborados evaluando la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en respuesta a 100 μ M de Ang-(1-9) (Fig 8).

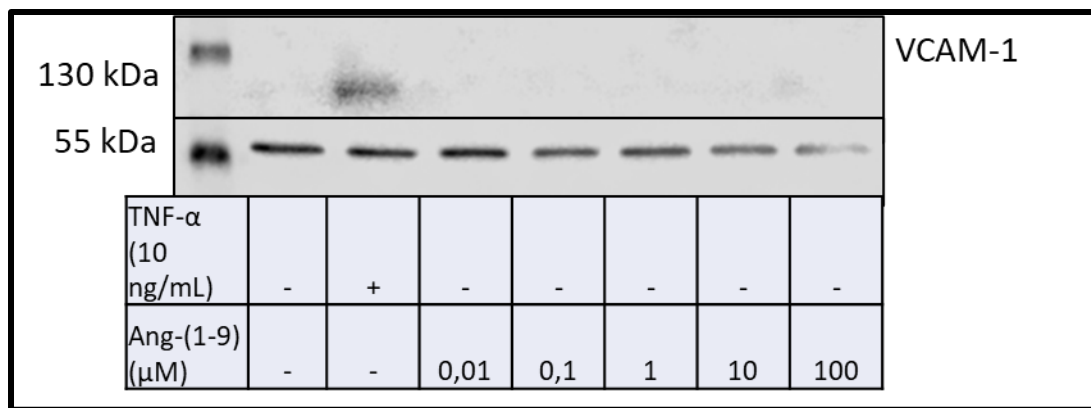


Figura 7. Niveles proteicos de VCAM-1 en HUVECs incubadas con PBS-BSA por 24 h y con Ang-(1-9) por 3 h. De izquierda a derecha: Pesos moleculares indicados por el estándar de peso molecular, primer carril corresponde al grupo control (sin TNF- α y sin Ang-(1-9)). Carril 2 corresponde a un control positivo (incubado con TNF- α 10 ng/mL y sin Ang-(1-9)) y los carriles del 3 al 7 son los grupos incubados con las concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). La expresión de VCAM-1 se mostró clara, pues no se indujo con ninguna de las concentraciones de Ang-(1-9). Como control de carga se utilizó β -tubulina, N=2.

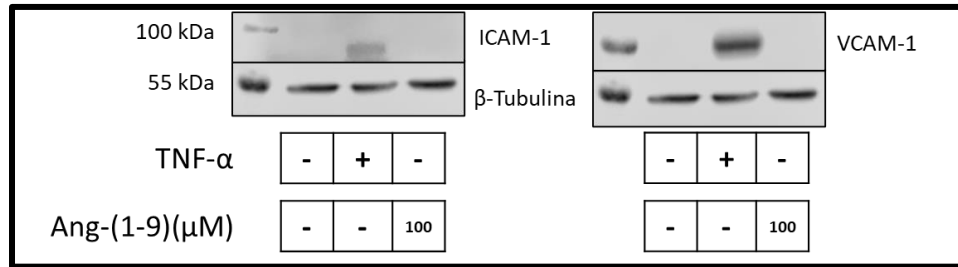


Figura 8.- Niveles proteicos de ICAM-1 y VCAM-1, comparándose el grupo control sin estímulos con un control positivo (con TNF- α /Sin Ang 1-9) y un grupo sin TNF- α (10 ng/mL) y 100 μ M de Ang-(1-9). Esto se realizó con el fin de evaluar si la máxima concentración de Ang-(1-9) genera la inducción de estos marcadores pro-inflamatorios. N=3.

4.5. Marcadores pro-inflamatorios en HUVECs incubadas 24 h con TNF- α , seguido de 3 h con Ang-(1-9).

Posteriormente, se procedió a probar el efecto de la incubación de Ang-(1-9) en la expresión de marcadores pro-inflamatorios inducidos por TNF- α en un tiempo de incubación corto. Para complementar los hallazgos previos, se incluyó la medición de 2 marcadores: e-Selectina y eNOS. Se estimularon células HUVEC con TNF- α (10 ng/mL) durante 24 h, luego se incubaron con concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M) durante 3 h y se determinaron los niveles proteicos de los marcadores ya indicados por Western blot. Los resultados indican que Ang-(1-9) no revirtió el aumento de VCAM-1, ICAM-1, ni la reducción en los niveles de eNOS inducida por TNF- α (Figura 9 y 10). Sin embargo, Ang-(1-9) generó un aumento significativo en la expresión de e-Selectina en respuesta a la co-administración de TNF- α con 0,1; 1 y 10 μ M de Ang-(1-9) (Figura 11).

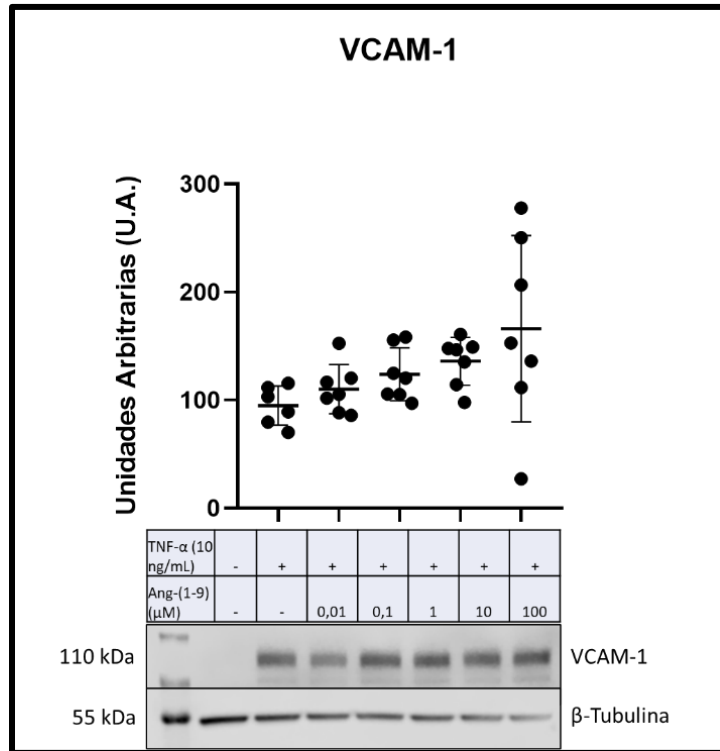


Figura 9. Expresión de VCAM-1 en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y luego por 3 h de concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). De izquierda a derecha: Pesos moleculares indicados por el estándar de peso molecular. Primer carril corresponde al grupo control que no se incubó con TNF- α y no expresa VCAM-1. Carriles del 2 al 7 son los grupos incubados con TNF- α y las concentraciones crecientes de Ang-(1-9). Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk, confirmándose la normalidad de los mismos. Luego se analizó en busca de outliers con un test Q, sin encontrarse ninguno. Finalmente, se realizó un ANOVA de una vía, seguido de un post-test de Tukey sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos tratados con TNF- α . Todos los grupos expresaron más VCAM-1 comparados contra el grupo que no se incubó con TNF- α . Como control de carga se utilizó β -tubulina. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=6.

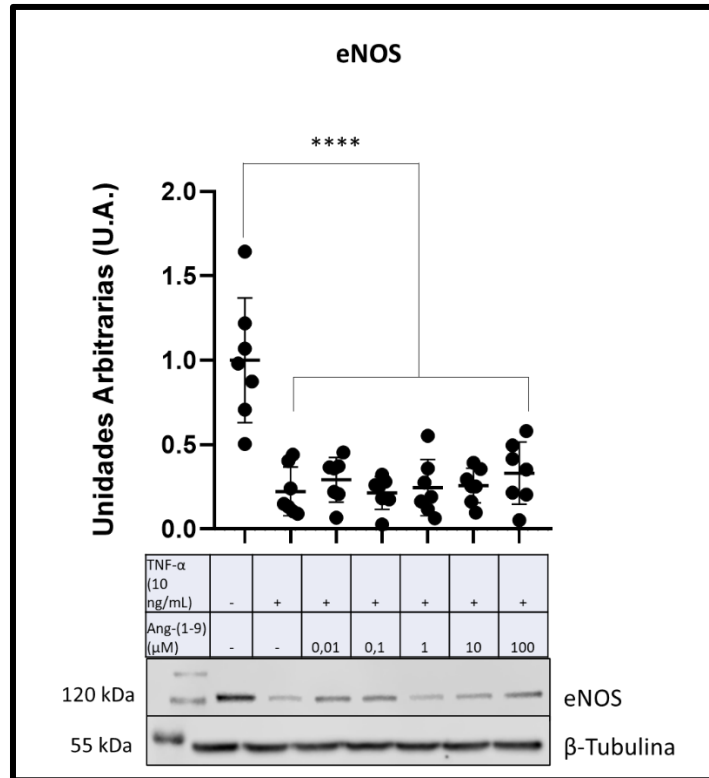


Figura 10. Expresión de eNOS en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y luego por 3 h de concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). De izquierda a derecha: Pesos moleculares indicados por el estándar de peso molecular, primer carril corresponde al grupo control que no se incubó con TNF- α y expresa de forma constitutiva eNOS. Carriles del 2 al 7 son los grupos incubados con las concentraciones crecientes de Ang-(1-9). Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk, confirmándose la normalidad de los mismos. Luego se analizó en busca de outliers con un test Q, sin encontrarse ninguno. Finalmente, se realizó un ANOVA de una vía, seguido de un post-test de Tukey sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos tratados con TNF- α y todos los grupos expresaron más VCAM-1, comparados con el grupo control (****= p value < 0.0001). Como control de carga se utilizó β -tubulina. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=7.

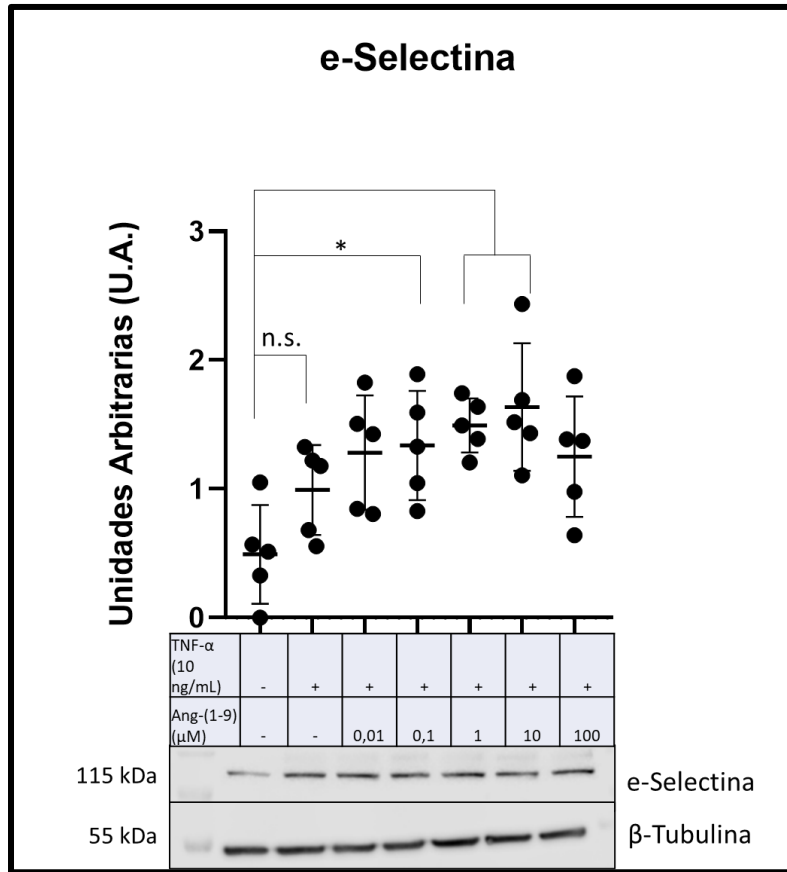


Figura 11.- Expresión de e-Selectina en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y luego por 3 h de concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). De izquierda a derecha: Pesos moleculares indicados por el estándar de peso molecular, primer carril corresponde al grupo control que no se incubó con TNF- α . Carriles del 2 al 7 son los grupos incubados con las concentraciones crecientes de Ang-(1-9). Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk, confirmándose la normalidad de los mismos. Luego se analizó en busca de outliers con un test Q encontrándose un valor, el cual se dejó fuera del análisis. Finalmente, se realizó un ANOVA de una vía, seguido de un post-test de Tukey. En el caso de e-Selectina, se encontró una diferencia significativa entre el grupo control (sin TNF- α) y los grupos con concentración 0,1 μ M de Ang-(1-9) (*=p value < 0,05) y 1 y 10 μ M (**=p value < 0,01). No se encontraron diferencias entre los demás grupos. Como control de carga se utilizó β -tubulina. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=5.

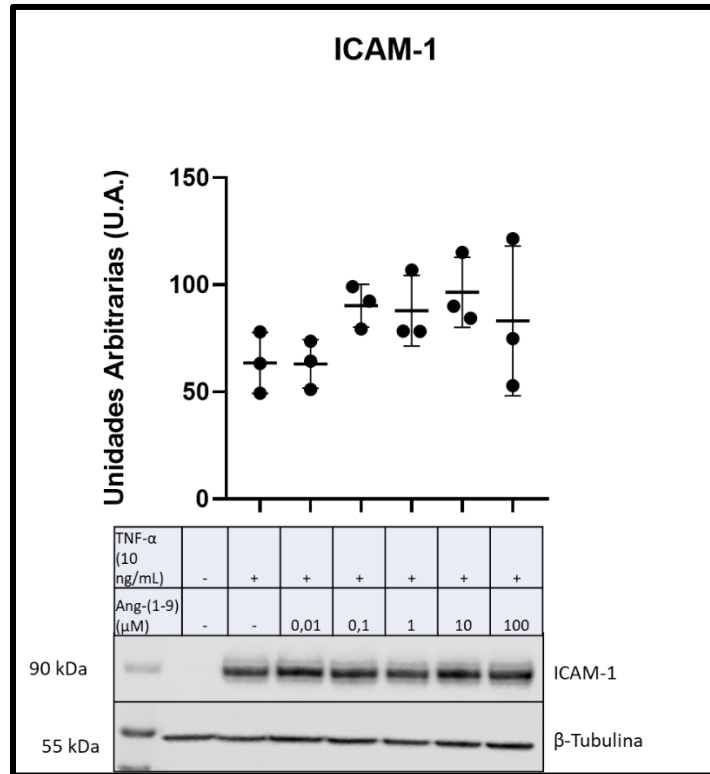


Figura 12.- Expresión de ICAM-1 en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y luego por 3 horas de concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). De izquierda a derecha: Pesos moleculares indicados por el estándar de peso molecular. Primer carril corresponde al grupo control que no se incubó con TNF- α y no expresa VCAM-1. Carriles del 2 al 7 son los grupos incubados con las concentraciones crecientes de Ang-(1-9). Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk, confirmándose la normalidad de los mismos. Luego se analizó en busca de outliers con un test Q, sin encontrarse ninguno. Finalmente, se realizó un ANOVA de una vía, seguido de un post-test de Tukey, sin encontrarse diferencias significativas entre los grupos tratados con TNF- α . Todos los grupos expresaron más ICAM-1 comparados contra el grupo que no se incubó con TNF- α . Como control de carga se utilizó β -tubulina. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=3.

4.6. Detección de IL-6 en sobrenadante de HUVECs incubadas por 24 h con TNF- α , seguido de 3 h de Ang-(1-9)

Como una aproximación complementaria, se midió mediante ELISA, los niveles de IL-6 liberada al medio por las HUVECs luego de ser incubadas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y luego con Ang-(1-9) por 3 h. Se evaluó la concentración más baja (0,01 μ M) y más alta (100 μ M) de Ang-(1-9). Los resultados muestran que no hay diferencias entre los tratamientos administrados y el control (Figura 13).

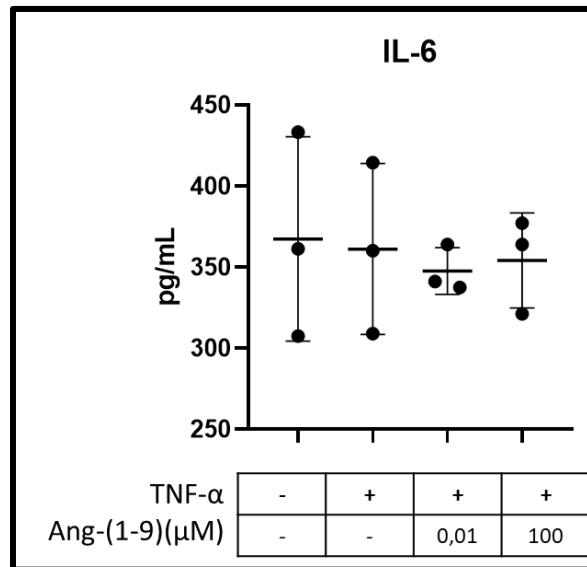


Figura 13.- Niveles de IL-6 en sobrenadante de células HUVEC pre-tratadas con TNF- α (10 ng/mL) por 24 h e incubadas durante 3 h con 0,01 μ M y 100 μ M Ang-(1-9). Se analizó la normalidad de los datos mediante un test de Shapiro-Wilk y se buscaron outliers mediante un test Q, encontrándose que se ajustaban a un comportamiento normal y no se detectaron outliers. Mediante un ANOVA de una vía, se determinó que no existen diferencias significativas en la liberación de IL-6 entre los distintos tratamientos. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=3.

4.7. Marcadores pro-inflamatorios de HUVECs incubadas 24 h con TNF- α , seguido de 8 h con Ang-(1-9)

Finalmente, se evaluó el efecto de Ang-(1-9) en la expresión de marcadores pro-inflamatorios inducidos por TNF- α , utilizando un tiempo de incubación intermedio. Para estudiar esto, células HUVEC fueron pre-tratadas con TNF- α (10 ng/mL) durante 24 h y posteriormente, fueron tratadas con concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M) durante 8 h. Los datos muestran que el péptido no redujo la expresión de VCAM-1 en ninguna de las concentraciones de Ang-(1-9) evaluadas (Figura 14). Cabe señalar que en este experimento se incluyó un control adicional: HUVECs incubadas por 24 h con el vehículo de TNF- α (PBS-BSA) y posteriormente, las células fueron estimuladas durante 8 h con Ang-(1-9) 100 μ M. La adición de este grupo nos permite analizar la interacción que se pudiese generar entre TNF- α (10 ng/mL) y Ang-(1-9) a esta concentración. Se observa que no hay diferencias significativas entre TNF- α y Ang-(1-9) 100 μ M, descartando una interacción entre los estímulos a las 8 h. De manera similar, se observó que ninguna de las concentraciones de Ang-(1-9) aumentó de manera significativa la expresión de e-Selectina (Fig. 15). Adicionalmente, cuando se realizó un análisis con un

ANOVA de 2 vías no se encontraron diferencias significativas cuando se variaba la concentración de Ang-(1-9) (Fig. 16).

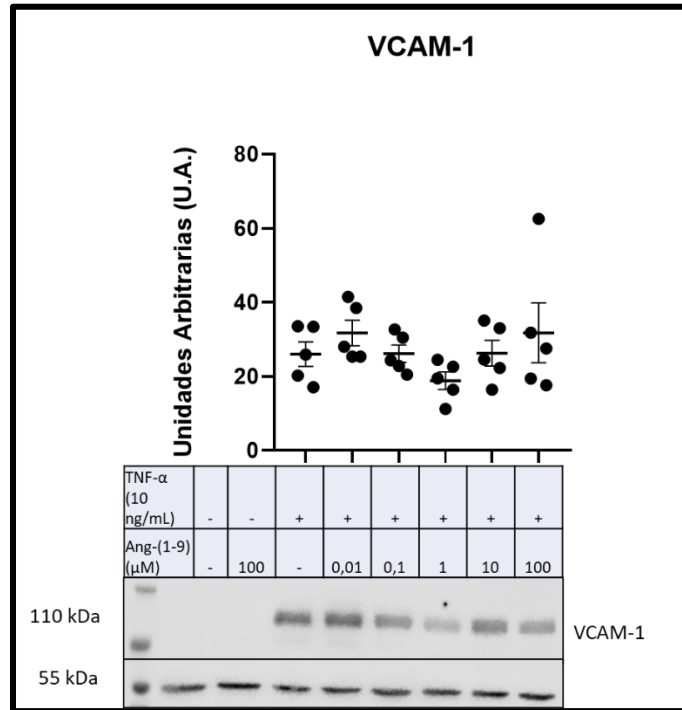


Figura 14. Expresión de VCAM-1 en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y luego durante 8 h con concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). De izquierda a derecha: Pesos moleculares indicados por el estándar de peso molecular, primer carril corresponde al grupo control que no se incubó con TNF- α . El segundo carril corresponde al nuevo control incubado con el vehículo de TNF- α por 24 h y luego con Ang-(1-9) 100 μ M durante 8 h. Carriles del 3 al 8 son los grupos incubados con las concentraciones crecientes de Ang-(1-9). Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk, confirmándose la normalidad de los mismos. Luego se analizó en busca de outliers con un test Q sin encontrarse. Finalmente se realizó un ANOVA de una vía seguido de un post-test de Tukey.). No se encontraron diferencias entre los grupos). Todos los grupos expresaron más VCAM-1 comparados contra los grupos que no se incubaron con TNF- α . Como control de carga se utilizó β -tubulina. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=5.

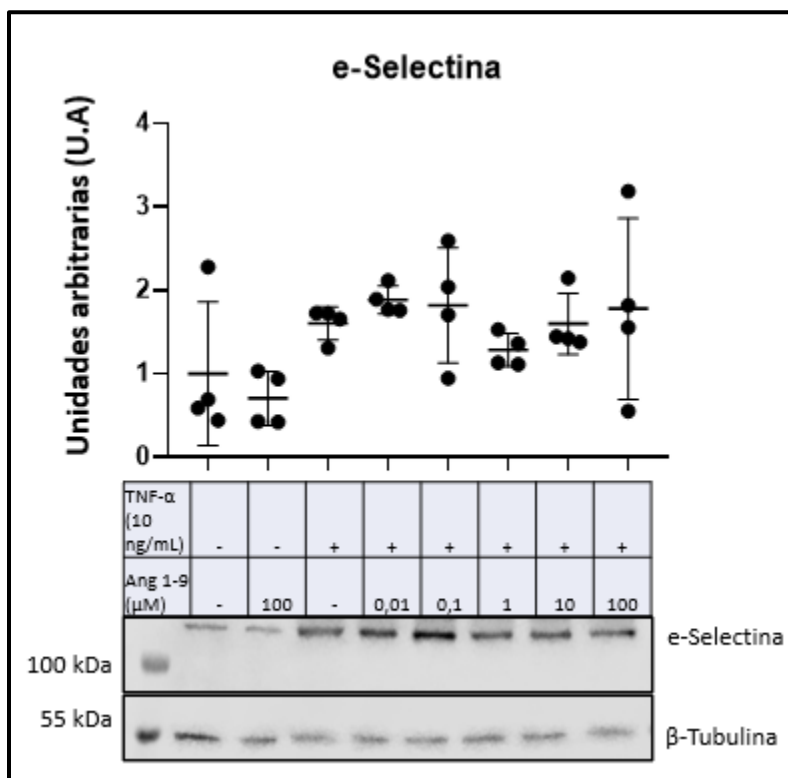


Figura 15.- Expresión de e-Selectina en células HUVEC estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y luego durante 8 h con concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (0,01; 0,1; 1; 10 y 100 μ M). De izquierda a derecha: Pesos moleculares indicados por el estándar de peso molecular. Primer carril corresponde al grupo control que no se incubó con TNF- α . El segundo carril corresponde al nuevo control incubado con el vehículo de TNF- α por 24 h y luego con Ang-(1-9) 100 μ M durante 8 h. Carriles del 3 al 8 son los grupos incubados con las concentraciones crecientes de Ang-(1-9). Se determinó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk, confirmándose la normalidad de los mismos. Luego se analizó en busca de outliers con un test Q, sin encontrarse ninguno. Finalmente se realizó un ANOVA de una vía seguido de un post-test de Tukey. No se encontraron diferencias entre los grupos. Como control de carga se utilizó β -tubulina. Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=4.

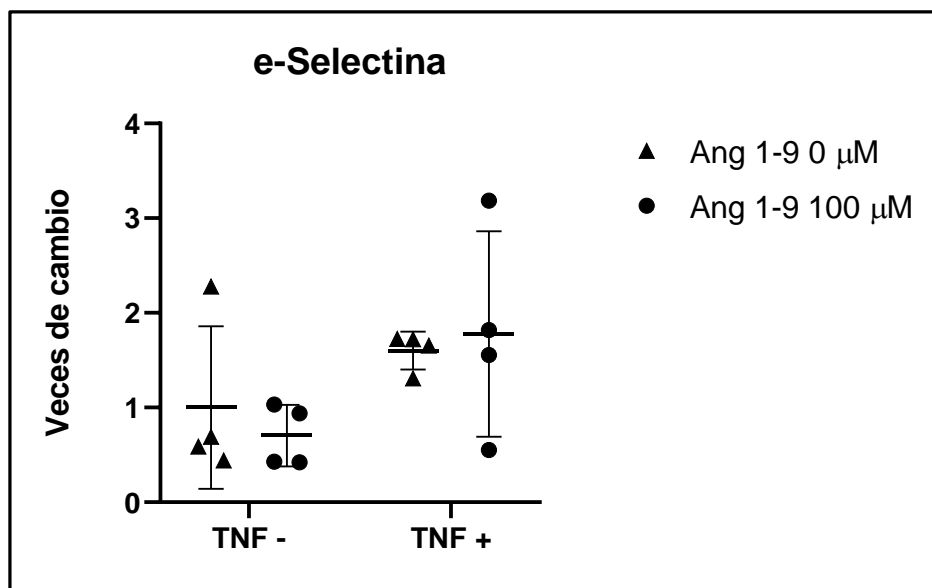


Figura 16.- Expresión de e-Selectina en HUVECs estimuladas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL) y 8 h de Ang-(1-9) 100 μ M. Se agruparon los datos de la figura 5 para poder realizar un ANOVA de 2 vías. Se encontraron diferencias significativas (**p value < 0,01) entre los grupos que fueron incubados con y sin TNF- α . Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos incubados sin Ang-(1-9) y con la concentración máxima de Ang-(1-9) (100 μ M). Los valores presentados corresponden al promedio \pm la desviación estándar (SD). N=4.

4.8. Expresión de AT2R en HUVEC

Considerando la ausencia de cambios significativos en la expresión de marcadores inflamatorios, surge la posibilidad de que los resultados neutrales observados en los distintos experimentos de este estudio puedan explicarse por la ausencia de la expresión del receptor para Ang-(1-9). Por lo tanto, se evaluó el contenido proteico de este receptor por Western blot en 3 grupos diferentes de células HUVECs con estímulos de 24 h de TNF- α , seguidos de 3 h de incubación con Ang-(1-9) o su control. Además, se utilizaron grupos de HUVECs pre-incubadas con PD123319 (Figura 17). Se puede ver una clara ausencia de bandas correspondientes a AT2R en todos los lisados celulares, excepto en el control positivo, que corresponde a células AGS de cáncer gástrico que fueron transfectadas con un vector viral para sobre expresar AT2R ("Ctrl +" en figura 18).

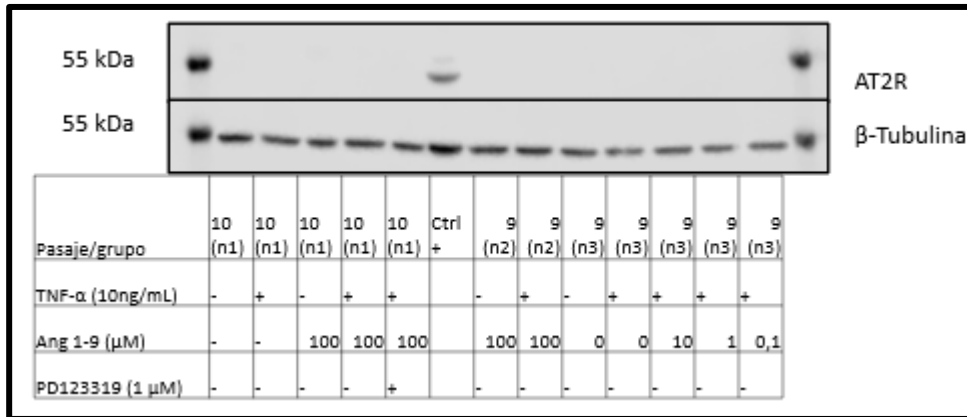


Figura 17. Western blot de 3 grupos celulares distintos de pasaje 9 y 10 para evaluar la expresión de AT2R. El primer y último carril corresponden al estándar de peso molecular. El carril “Ctrl +” corresponde a células de cáncer gástrico que expresan AT2R basalmente y además fueron transfectadas con un AAV para sobre expresar el gen.

5. Discusión

El presente trabajo mostró que TNF- α indujo la expresión de los parámetros pro-inflamatorios VCAM-1, ICAM-1 y e-Selectina y redujo los niveles proteicos de eNOS en HUVECs. Por otra parte, Ang-(1-9), si bien no presentó citotoxicidad en las concentraciones evaluadas, no revirtió los efectos inducidos por TNF- α .

Los hallazgos de este estudio revelan que el patrón de expresión de VCAM-1 en los 3 tiempos de incubación con TNF- α y las 5 concentraciones de Ang-(1-9) es claro y reproducible. La expresión de VCAM-1 es una proteína de adhesión leucocitaria ampliamente descrita en la literatura en distintos modelos, entre ellos, HUVECs [59]. La detección de esta proteína en el laboratorio fue estandarizada en la tesis de Magister de Nicolás Herrera Zelada. En esta, se evaluó la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en respuesta a TNF- α (10 ng/mL). Sus resultados mostraron que tanto VCAM-1 como ICAM-1 son marcadores altamente sensibles y confiables en HUVECs, por cuanto se inducen de forma robusta en presencia de TNF- α . Además, este trabajo evaluó los cambios en la expresión de estos marcadores en el tiempo, siendo el aumento de la expresión de VCAM-1 estadísticamente significativo a las 6 y 24 h de incubación con TNF- α y a las 48 h, se observa una leve reducción (Anexo 1).

En base a estos hallazgos, se eligió como límite de tiempo de incubación las 48 h (24 h de TNF- α + 24 h de Ang 1-9), ya que un tiempo más prolongado significaría que cualquier alteración en la expresión de VCAM-1 podría generarse por el largo tiempo de incubación, en lugar de ser en respuesta a los estímulos utilizados. Los resultados expuestos en esta tesis muestran que VCAM-1 se induce de forma esperada por los estímulos con TNF- α , sin embargo, ninguna concentración ni tiempo de incubación con Ang-(1-9) altera su expresión de forma significativa, por lo que estos hallazgos sugieren que Ang-(1-9) no revierte la expresión de VCAM-1 en células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) cuando son estimuladas con TNF- α . Además, se debe destacar que cuando se evaluó el tiempo de 8 h de incubación de Ang-(1-9), se añadió un grupo de células que no se realizó en otros experimentos, que corresponde a HUVECs que no fueron estimuladas con TNF- α , pero sí con Ang-(1-9) en su concentración de trabajo máxima (100 μ M). Añadir este grupo nos permitió evaluar si existe alguna interacción entre ambos estímulos utilizados. Sin embargo, no se encontraron diferencias que indicaran una interacción entre los estímulos en la expresión de VCAM-1.

Por otra parte, el marcador ICAM-1 tiene características similares a VCAM-1 no solo en su papel a nivel celular, sino en su patrón de expresión en condiciones experimentales. Lin y cols. demostraron que en respuesta a visfatina (una adipocina), se observa en células de vasculatura endotelial humanas (EA.hy926), que tanto VCAM-1 e ICAM-1 aumentaron su expresión mediante la activación de la vía p38/PI3K/Akt y una posterior traslocación al núcleo de NF- κ B [60]. Si bien el presente estudio solo evaluó su expresión a las 3 h de estimulación con Ang-(1-9), su uso como marcador pro-inflamatorio se encuentra confirmado por los resultados de la tesis de Nicolás Herrera Zelada (Anexo 2), así como por la literatura [61]. Al igual que los hallazgos relacionados a VCAM-1, Ang-(1-9) no redujo la expresión de ICAM-1 en el tiempo evaluado.

La eNOS es una enzima descrita como un marcador de función endotelial. Su detección usualmente se acompaña de la forma fosforilada (p-eNOS), pues esta presenta actividad enzimática [62] y la producción de NO asociada. La literatura actual describe un comportamiento contrario de eNOS en respuesta a estímulos inflamatorios, esta proteína disminuye su expresión en respuesta a estos estímulos [63]. Tanto TNF- α , como LPS e IL-1 β son estímulos capaces de reducir la expresión de eNOS [64]. La expresión de eNOS, en el tiempo de 3 h de incubación con Ang-(1-9), disminuye con respecto al control sin TNF- α , como se esperaba, pero ninguna concentración de Ang-(1-9) restauró su contenido proteico a niveles basales. Estos resultados parecieran contradecir los hallazgos de Ocaranza y cols., por cuanto se ha observado que Ang-(1-9) aumenta los niveles de mRNA de eNOS en aorta de ratas hipertensas [49]. Asimismo, este péptido aumentó los niveles de nitritos en plasma de ratas hipertensas, lo que sugiere un aumento en la actividad de eNOS en respuesta a Ang-(1-9). Cabe señalar que ambos efectos fueron prevenidos por un pretratamiento con el antagonista del AT2R, PD123319 [49]. Una diferencia importante entre el presente trabajo y el estudio de Ocaranza y cols. es el uso de células humanas, en lugar de una muestra de tejido, que contiene más de un tipo celular. Adicionalmente, el carácter *in vivo* de los experimentos de este trabajo permite una evaluación más integral de la respuesta biológica que genera Ang-(1-9). Adicionalmente, el presente estudio no evaluó actividad de eNOS, lo que constituye una limitación. Otro aspecto a considerar es que este marcador solo se evaluó a las 3 h de incubación con el péptido, por lo que no se puede descartar que una incubación más larga con Ang-(1-9) pueda restaurar el contenido proteico tras la reducción inducida por TNF- α . Además, tampoco se determinaron los niveles de p-eNOS. Esto es relevante, ya que se ha descrito que en corazones asilados de

ratas adultas, Ang-(1-9) induce la fosforilación de Akt [46], la que a su vez fosforila a eNOS [62]. Sin embargo, un estudio reciente reportó que Ang-(1-9) redujo los niveles de p-eNOS en células de músculo liso vascular de aorta de ratas A7r5 [65], sugiriendo que los efectos de este péptido depende del tipo celular sobre el que ejerce su acción.

Otro parámetro evaluado en el desarrollo de esta tesis fue e-Selectina. Al igual que VCAM-1 e ICAM-1, corresponde a una molécula de adhesión leucocitaria y aumenta su expresión en respuesta a TNF- α en HUVECs. Esta proteína se expresa en respuesta a TNF- α y es utilizada como marcador de activación endotelial [66, 67]. A diferencia de VCAM-1 e ICAM-1, e-Selectina presentó un nivel de expresión basal, evidenciado en el grupo control (sin TNF- α y sin Ang-(1-9)), pero cuando las HUVECs fueron estimuladas solo con TNF- α , no se generó un aumento significativo de este marcador. La co-incubación de TNF- α con Ang-(1-9) indujo un aumento de esta proteína de forma significativa en tres de las cinco concentraciones utilizadas. Esto podría sugerir una potencial interacción entre el estímulo con TNF- α y Ang-(1-9), promoviendo la expresión de este marcador proinflamatorio. Este resultado fue inesperado, toda vez que las Figuras 7 y 8 mostraron que Ang-(1-9) no aumentaron los parámetros proinflamatorios VCAM-1 e ICAM-1, si bien el presente estudio no evaluó si el péptido induce la expresión de e-Selectina en ausencia de TNF- α . Respecto a las posibles explicaciones de esta interacción, cabe señalar que se ha descrito que la expresión de e-Selectina inducida por TNF- α se genera por dos vías paralelas de respuesta a NF- κ B, éstas son TRAF-NF- κ B y TRAF-RAC/CDC42-JNK-c-Jun/ATF2 [68]. Adicionalmente, estudios en humanos obesos destacan a e-Selectina como un marcador que se asocia a un incremento en TNF- α , por lo que su utilidad como marcador es útil no solo a nivel preclínico [69]. Una posible interacción de Ang-(1-9) y alguna de estas vías puede explicar el resultado obtenido, pero esta hipótesis debe ser evaluada experimentalmente. Además, al no observarse una diferencia entre el efecto de TNF- α solo respecto al control en este estudio, tampoco se puede considerar un efecto aditivo. Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente estudios deben ser complementados con la evaluación de e-Selectina en respuesta a la incubación con Ang-(1-9) durante 3 h y 24 h, con el fin de explorar las posibles variaciones en el contenido proteico de este marcador.

Se realizaron ensayos de LDH en dos de los tres tiempos de incubación de Ang-(1-9), 3 y 24 h. Estos experimentos se realizaron para descartar que el tiempo de estímulo de 24 h aumentara la muerte celular, mientras que la administración de 3 h de Ang-(1-9) era la

condición en que ambos estímulos se encuentran en una mayor concentración, por lo que evaluar estos dos tiempos, permitió determinar que las células no fueron afectadas por la combinación de ambos estímulos. Adicionalmente, la co-administración de TNF- α , Ang-(1-9) y PD123319 tampoco tuvo efectos sobre la muerte celular, mostrando que si bien no existen diferencias significativas entre la condición control y TNF- α , se observa una tendencia que parece sugerir un leve aumento en la liberación de LDH en respuesta a TNF- α , lo cual concuerda con el efecto descrito de esta citoquina en la muerte celular [70], pero los porcentajes de LDH liberado no son elevados, en comparación con un estudio previo [71].

Los resultados obtenidos con VCAM-1, ICAM-1 y e-Selectina muestran que Ang-(1-9) no redujo la expresión de estos parámetros pro-inflamatorios. Para confirmar estos hallazgos, se evaluó el efecto del péptido sobre la expresión de IL-6. Sin embargo, los resultados mostraron que Ang-(1-9) no afectó los niveles de esta citoquina pro-inflamatoria. Esto llama la atención por dos razones; la primera es que TNF- α es un conocido inductor de liberación de IL-6 en HUVECs [23, 72] y por otra parte, Ang-(1-9) no redujo de forma significativa la liberación de esta citoquina, contribuyendo al rechazo de la hipótesis inicial del trabajo. Sin embargo, estos resultados se pueden explicar por errores de la técnica, bajo n muestral o estrés de las células cultivadas.

Los resultados presentados en esta tesis contradicen los resultados esperados planteados en la hipótesis. Los principales trabajos que apoyaban esta hipótesis sustentaban en el uso de un agonista del receptor AT₂, C21, y su efecto en la expresión de marcadores proinflamatorios [73]. En este trabajo se utilizaron HUVECs, sin embargo, los parámetros experimentales difieren de los utilizados en esta tesis. Se utilizaron células en un pasaje menor (2-6 vs 7-11). El tiempo de incubación con TNF- α también fue distinto (4 h vs 24 h). El rango de concentraciones del estímulo fue similar; desde 0,1 a 100 μ M en el trabajo de Sampson y cols. vs 0,01 a 100 μ M en este trabajo. La evaluación de los marcadores pro-inflamatorios difirió no solo en cuáles se evaluaron, sino también en las técnicas utilizadas. En el trabajo de Sampson y cols se midió mediante citometría de flujo y RT-PCR la expresión de ICAM, CCL2 e IL-6. [73] En un ensayo similar, Ismail y cols probaron los efectos en la disminución de los marcadores inflamatorios VCAM-1 e ICAM-1, cuando se administró un extracto acuoso de la hierba *Piper sarmentosum*. Su modelo experimental constaba de HUVECs incubadas por 24 h con TNF- α (10 ng/mL), además de un co-estímulo

correspondiente al extracto en diferentes concentraciones (100, 150, 250 y 300 ug/mL) [74]. Los autores observaron que este extracto redujo la expresión de ambos marcadores de forma significativa y dosis-dependiente. Sin embargo, se debe señalar que en este trabajo no se entregan detalles respecto al origen de las HUVECs y se midió VCAM-1 e ICAM-1 mediante ELISA [74].

Por otra parte, en este trabajo se utilizó un sistema de pre-incubación con TNF- α y posterior co-incubación con Ang-(1-9). Esto se pensó con la intención de emular un contexto patológico, en el cual un paciente sea diagnosticado con una enfermedad que curse con procesos de inflamación a nivel vascular, tales como aterosclerosis y obesidad [21, 75] y por lo tanto, se le puedan administrar fármacos con la finalidad de revertir o detener la enfermedad. Nuestro modelo pretende hacer el símil con esta situación, induciendo un fenotipo pro-inflamatorio mediante la incubación con TNF- α y la posterior co-incubación con Ang-(1-9). Esto generó que los tiempos de incubación finales de TNF- α fueran más largos que los descritos en la literatura presentada: Los tiempos de 3, 8 y 24 h de Ang-(1-9) eran a su vez tiempos de 27, 32 y 48 h de TNF- α , ya que no ocurría un recambio de medio en este proceso. Los prolongados tiempos de incubación con TNF- α podrían dar cuenta de la ausencia de efectos ya, que al ser una citoquina pro-inflamatoria potente [25], pocos estímulos podrían tener un efecto significativo en la expresión de marcadores proteicos. Esto cobra aún más relevancia cuando se considera el bajo tiempo de vida media que presenta el péptido Ang-(1-9) [76].

Se ha descrito que Ang-(1-9) ejerce potentes efectos terapéuticos en enfermedades cardiovasculares. En efecto, este péptido redujo la presión sanguínea en modelos preclínicos de hipertensión [49]. En el contexto de isquemia/reperfusión redujo la muerte celular *in vitro*, redujo el tamaño de infarto *ex vivo* y mejoró la función ventricular *in vivo* [46]. Adicionalmente, redujo la desdiferenciación de células musculares lisas vasculares, contribuyendo a la disminución del remodelado vascular [65]. Por lo tanto, considerando su alto potencial terapéutico y los resultados neutrales del presente estudio, se procedió a determinar la presencia del AT2R. Sorprendentemente, el análisis de Western blot que evaluó la expresión de AT2R, en presencia de control positivo correspondiente a una línea celular de cáncer gástrico (AGS) que sobre expresa AT2R por acción de un vector viral, reveló que AT2R fue detectado en HUVECs de distintos grupos y condiciones experimentales. Se debe discutir entonces la posibilidad de que AT2R no se encuentre en

las HUVECs que se trabajaron en esta tesis. La expresión de AT2R en células HUVEC ha sido descrita de forma extensa en la literatura, ya sea mediante su medición directa o mediante el uso de agonistas específicos de AT2R con efectos significativos [54, 77, 78].

La ausencia del receptor AT2 en HUVECs fue inesperada, pero no significa que no se exprese en todas las HUVECs. Como una proyección de este trabajo se debería estandarizar la presencia de este receptor según los pasajes utilizados (una de las principales diferencias entre este trabajo y otros de la literatura son los pasajes utilizados en el cultivo [73]) ya que posiblemente, la expresión de AT2R podría variar a medida que las células se replican. Otra potencial explicación es que el tiempo de incubación cambie la expresión de AT2R. Para evaluar esto, se debería realizar una curva dosis-respuesta, modificando la concentración y los tiempos de incubación con TNF- α y evaluar la expresión de AT2R. Incluso si las HUVEC no fueran un modelo adecuado para trabajar con Ang-(1-9), se podría utilizar un vector de expresión viral para expresar este receptor, ya que la utilidad de estas células como modelo endotelial no puede ser descartada solo por no expresar este receptor. Al ser evidentemente sensible al estímulo con TNF- α , complementar la falta de este receptor puede ser un camino viable para dilucidar el rol que Ang-(1-9) podría tener a nivel endotelial. Adicionalmente, se sabe que la expresión de AT2R en HUVECs puede variar, por ejemplo, por el tipo de suero que se utilice. En un trabajo por Takeda-Matsubara y cols. se observa un cambio en la expresión de los receptores AT1 y AT2 en respuesta a la incubación con suero correspondiente a mujeres que presentaban hipertensión inducida por embarazo. Se ha observado también que la expresión de AT2R en la vasculatura varía según el estado de desarrollo en ratas [79, 80]. Considerando esto y que las HUVECs corresponden a un estadio temprano de desarrollo, puede que la expresión de AT2R varíe según el pasaje en que se encuentren las células. Alternativamente, se pueden utilizar otros modelos de células endoteliales que sí expresen AT2R o se puede cambiar la aproximación terapéutica de reversión por una de prevención, si bien la pre-incubación con Ang-(1-9) antes de un estímulo con TNF- α tendría un menor valor clínico.

Por otra parte, la intención inicial del objetivo específico 1 era obtener una concentración de Ang-(1-9) y un tiempo de trabajo en el que se observara un cambio significativo en la expresión de marcadores pro-inflamatorios y usar esa concentración y tiempo, para evaluar si Ang-(1-9) ejercía un efecto en la vía NF- κ B. Sin embargo, al no encontrarse cambios

significativos, por lo ya discutido previamente, no poseemos una concentración y tiempo de trabajo para evaluarlo y al no encontrarse el AT2R, carece de sentido evaluar posibles cambios en la traslocación de NF- κ B al núcleo.

A pesar de los resultados obtenidos, el potencial farmacológico de Ang-(1-9) en células endoteliales no puede ser descartado. Está descrita la presencia de AT2R en diversos trabajos con células endoteliales a nivel *in vitro* e *in vivo* y en seres humanos [54, 77, 78]. En dicho contexto, futuros estudios deberán evaluar el potencial terapéutico de Ang-(1-9) en modelos preclínicos de enfermedades que cursen con procesos inflamatorios a nivel vascular, para determinar con precisión el verdadero potencial, así como también las limitaciones de este péptido como un novedoso agente farmacológico.

6. Conclusiones

1.- TNF- α indujo la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y e-Selectina en HUVECs, además de disminuir la expresión de eNOS.

2.- Ang-(1-9) no indujo la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en condiciones basales (3 h de incubación) y no aumentó la muerte celular de HUVECs en presencia o ausencia de TNF- α (tiempos de incubación de Ang-(1-9): 3 y 24 h).

3.- Ang-(1-9) no redujo la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y e-Selectina en HUVECs pre-tratadas con TNF- α en ninguno de los tiempos de incubación ensayados. Además, tampoco aumentó la expresión de eNOS.

4.- La administración de TNF- α por 24 h a HUVECs, seguida de 3 h de Ang-(1-9) en 0,1; 1 y 10 μ M, generó un aumento en la expresión de e-Selectina.

5.- Las células HUVECs utilizadas en el presente estudio no expresan el AT2R.

Conclusión final.

Angiotensina 1-9 no es capaz de disminuir los marcadores proinflamatorios evaluados en ninguna de las concentraciones ni tiempos ensayados en HUVECs, probablemente porque las células utilizadas en este estudio no expresan AT2R.

7. Actividades extracurriculares realizadas durante la tesis

Publicaciones:

- Ramírez-Sagredo, A., **Ramírez-Reyes, A.**, Ocaranza, M. P., Chiong, M., Riquelme, J. A., Jalil, J. E., & Lavandero, S. (2020). Antihipertensivos en pacientes con COVID-19. *Revista chilena de cardiología*, 39(1), 66-74.
- Herrera-Zelada, N., Zuñiga-Cuevas, U., **Ramírez-Reyes, A.**, Lavandero, S., & Riquelme, J. A. (2021). Targeting the endothelium to achieve cardioprotection. *Frontiers in Pharmacology*, 3.
- Días-Vesga M.C., Zuñiga-Cuevas, U., **Ramírez-Reyes, A.**, Herrera Zelada, N., Palomo, I., Bravo-Sagua, R., & Riquelme, J. A. (2021). Potential therapies to protect the aging heart against ischemia/reperfusion injury. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 1710.
- Sergio Lavandero, **Andrés Ramírez-Reyes**, María José Olivares. ¿Qué sabemos del SARS-CoV-2? (2020). *Anales del instituto de Chile Vol. XXXIX*.

Ayudantías:

- Tópicos de Farmacología (CPQF5117-1). Primer semestre 2021.
- Bioquímica Clínica y patológica (CIBQ4218-1). Segundo semestre 2021.

Unidad de investigación:

- Co-tutoría de Unidad de Investigación de pregrado “Enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2) y su papel enfermedades cardiovasculares” Profesor Encargado Dr. Sergio Lavandero, Estudiante que realiza la Unidad: Ignacio Barra

8. Bibliografía.

- [1] "Cardiovascular diseases (CVDs)." [Online]. Available: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). [Accessed: 28-Mar-2022].
- [2] Minsal, "ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017 Primeros resultados," 2017. [Online]. Available: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf. [Accessed: 28-Mar-2022].
- [3] W. C. Aird, "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 2, pp. 158–173, 2007.
- [4] W. C. Aird, "Endothelial cell heterogeneity," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–13, 2012.
- [5] R. H. Adams and K. Alitalo, "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 6, pp. 464–478, 2007.
- [6] C. K. Domigan and M. L. Iruela-Arispe, "Recent advances in vascular development," *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 19, no. 3, pp. 176–183, 2012.
- [7] D. Vestweber, "Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1257, no. 1, pp. 184–192, 2012.
- [8] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 6, pp. 417–427, 2011.
- [9] T. D. Nauta *et al.*, "Identification of HIF-2 α -regulated genes that play a role in human microvascular endothelial sprouting during prolonged hypoxia in vitro," *Angiogenesis*, vol. 20, no. 1, pp. 39–54, 2017.
- [10] R. M. Bell and D. M. Yellon, "Conditioning the whole heart-not just the cardiomyocyte," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 53, no. 1, pp. 24–32, 2012.
- [11] R. Teng *et al.*, "Acute erythropoietin cardioprotection is mediated by endothelial response," *Basic Res. Cardiol.*, vol. 106, no. 3, pp. 343–354, 2011.
- [12] J. R. Kersten, T. J. Schmeling, P. S. Pagel, G. J. Gross, and D. C. Warltier, "Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: Reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase," *Anesthesiology*, vol. 87, no. 2, pp. 361–370, 1997.
- [13] P. C. Chiari, M. W. Bienengraeber, P. S. Pagel, J. G. Krolikowski, J. R. Kersten, and D. C. Warltier, "Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: Evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits," *Anesthesiology*, vol. 102, no. 1, pp. 102–109, 2005.
- [14] T. M. Leucker *et al.*, "Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 51, no. 5, pp. 803–811, 2011.
- [15] J. A. Riquelme *et al.*, "Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion

- injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism," *Pharmacol. Res.*, vol. 103, pp. 318–327, 2016.
- [16] S. M. Davidson, J. A. Riquelme, Y. Zheng, J. M. Vicencio, S. Lavandero, and D. M. Yellon, "Endothelial cells release cardioprotective exosomes that may contribute to ischaemic preconditioning," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–9, 2018.
- [17] P. N. Hopkins, "Molecular biology of atherosclerosis," *Physiol. Rev.*, vol. 93, no. 3, pp. 1317–1542, 2013.
- [18] A. J. Lusis, "Atherosclerosis," *Nature*, vol. 407, no. 6801, pp. 233–241, 2000.
- [19] J. S. Pober, "Endothelial activation: intracellular signaling pathways," *Arthritis Res.*, vol. 4, pp. S109–S116, 2002.
- [20] A. Oesterle, U. Laufs, and J. K. Liao, "Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System," *Circ. Res.*, vol. 120, no. 1, pp. 229–243, 2017.
- [21] P. Libby, "Inflammation in atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 9, pp. 2045–2051, 2012.
- [22] C. M. Steyers and F. J. Miller, "Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 7, pp. 11324–11349, 2014.
- [23] P. Ataie-Kachoie, M. H. Pourgholami, D. R. Richardson, and D. L. Morris, "Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6)," *J. Clin. Pathol.*, vol. 67, no. 11, pp. 932–937, 2014.
- [24] P. O. Bonetti, L. O. Lerman, and A. Lerman, "Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 2, pp. 168–175, 2003.
- [25] E. Douni *et al.*, "Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis.," *J. Inflamm.*, vol. 47, no. 1–2, pp. 27–38.
- [26] K. Bendtzen, "Anti-TNF- α biotherapies: perspectives for evidence-based personalized medicine.," *Immunotherapy*, vol. 4, no. 11, pp. 1167–1179, Nov. 2012.
- [27] H. T. Idriss and J. H. Naismith, "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s).," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 50, no. 3, pp. 184–195, Aug. 2000.
- [28] J. R. Bradley, S. Thiru, and J. S. Pober, "Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells," *Am. J. Pathol.*, vol. 146, no. 1, pp. 27–32, 1995.
- [29] T. Collins, M. A. Read, A. S. Neish, M. Z. Whitley, D. Thanos, and T. Maniatis, "Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers.," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 9, no. 10, pp. 899–909, Jul. 1995.
- [30] H. Zhang *et al.*, "Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 44, no. 1, pp. 215–222, Oct. 1999.
- [31] M. E. Pueyo, W. Gonzalez, A. Nicoletti, F. Savoie, J. F. Arnal, and J. B. Michel, "Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB

- activation induced by intracellular oxidative stress.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 645–651, Mar. 2000.
- [32] P. Dandona, S. Dhindsa, H. Ghanim, and A. Chaudhuri, "Angiotensin II and inflammation: The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 21, no. 1, pp. 20–27, 2007.
- [33] C. M. Ferrario, "Role of angiotensin II in cardiovascular disease - Therapeutic implications of more than a century of research," *JRAAS - J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.*, vol. 7, no. 1, pp. 3–14, 2006.
- [34] M. G. Nicholls and J. I. Robertson, "The renin-angiotensin system in the year 2000.," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 14, no. 10–11, pp. 649–666, 2000.
- [35] B. Dahlöf *et al.*, "Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol.," *Lancet (London, England)*, vol. 359, no. 9311, pp. 995–1003, Mar. 2002.
- [36] B. M. Brenner *et al.*, "Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 345, no. 12, pp. 861–869, Sep. 2001.
- [37] S. J. Forrester *et al.*, "Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology.," *Physiol. Rev.*, vol. 98, no. 3, pp. 1627–1738, Jul. 2018.
- [38] M. A. Fontes, L. C. Silva, M. J. Campagnole-Santos, M. C. Khosla, P. G. Guertzenstein, and R. A. Santos, "Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptors.," *Brain Res.*, vol. 665, no. 1, pp. 175–180, Nov. 1994.
- [39] H. Xia and E. Lazartigues, "Angiotensin-converting enzyme 2: central regulator for cardiovascular function.," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 12, no. 3, pp. 170–175, Jun. 2010.
- [40] P. Li, M. C. Chappell, C. M. Ferrario, and K. B. Brosnihan, "Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide.," *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, vol. 29, no. 1 Pt 2, pp. 394–400, Jan. 1997.
- [41] S. Tesanovic, A. Vinh, T. A. Gaspari, D. Casley, and R. E. Widdop, "Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 8, pp. 1606–1613, Aug. 2010.
- [42] G. S. Magalhaes *et al.*, "Angiotensin-(1-7) Promotes Resolution of Eosinophilic Inflammation in an Experimental Model of Asthma.," *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 58, 2018.
- [43] V. G. Yugandhar and M. A. Clark, "Angiotensin III: a physiological relevant peptide of the renin angiotensin system.," *Peptides*, vol. 46, pp. 26–32, Aug. 2013.
- [44] I. Haulica, W. Bild, and D. N. Serban, "Angiotensin peptides and their pleiotropic actions.," *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.*, vol. 6, no. 3, pp. 121–131, Dec. 2005.
- [45] S. Ahmad *et al.*, "Angiotensin-(1-12): a chymase-mediated cellular angiotensin II substrate.," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 16, no. 5, p. 429, May 2014.
- [46] E. Mendoza-Torres *et al.*, "Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion

injury by angiotensin-(1–9) through an AT₂ R and Akt-dependent mechanism,” *Pharmacol. Res.*, vol. 135, pp. 112–121, 2018.

- [47] S. A. Cha, B. M. Park, S. Gao, and S. H. Kim, “Stimulation of ANP by angiotensin-(1-9) via the angiotensin type 2 receptor.,” *Life Sci.*, vol. 93, no. 24, pp. 934–940, Dec. 2013.
- [48] M. Flores-Muñoz, N. J. Smith, C. Haggerty, G. Milligan, and S. A. Nicklin, “Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor.,” *J. Physiol.*, vol. 589, no. Pt 4, pp. 939–951, Feb. 2011.
- [49] M. P. Ocaranza *et al.*, “Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis,” *J. Hypertens.*, vol. 32, no. 4, pp. 771–783, 2014.
- [50] M. Paz Ocaranza *et al.*, “Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 17, no. 2, pp. 116–129, 2020.
- [51] G. Y. Oudit, M. A. Crackower, P. H. Backx, and J. M. Penninger, “The role of ACE2 in cardiovascular physiology,” *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 13, no. 3, pp. 93–101, Apr. 2003.
- [52] I. Presta *et al.*, “Angiotensin II type 1 receptor, but no type 2 receptor, interferes with the insulin-induced nitric oxide production in HUVECs,” *Atherosclerosis*, vol. 219, no. 2, pp. 463–467, Dec. 2011.
- [53] L. Pastore *et al.*, “Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo.,” *Circulation*, vol. 100, no. 15, pp. 1646–1652, Oct. 1999.
- [54] R. Toedebusch, A. Belenchia, and L. Pulakat, “Cell-specific protective signaling induced by the novel AT₂R-agonist NP-6A4 on human endothelial and smooth muscle cells,” *Front. Pharmacol.*, vol. 9, no. AUG, pp. 1–14, 2018.
- [55] I. Dhande, W. Ma, and T. Hussain, “Angiotensin AT₂ receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin-10 production.,” *Hypertens. Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 21–29, Jan. 2015.
- [56] I. Dhande, Q. Ali, and T. Hussain, “Proximal tubule angiotensin AT₂ receptors mediate an anti-inflammatory response via interleukin-10: role in renoprotection in obese rats.,” *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, vol. 61, no. 6, pp. 1218–1226, Jun. 2013.
- [57] E. Kaschina *et al.*, “Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction?,” *Circulation*, vol. 118, no. 24, pp. 2523–2532, Dec. 2008.
- [58] L. Gonzalez *et al.*, “Angiotensin-(1-9) reduces cardiovascular and renal inflammation in experimental renin-independent hypertension,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 156, pp. 357–370, 2018.
- [59] M. P. Bevilacqua, “Endothelial-leukocyte adhesion molecules.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 11, pp. 767–804, 1993.
- [60] Y. T. Lin *et al.*, “Visfatin promotes monocyte adhesion by upregulating ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells via activation of p38-PI3K-AKT signaling and subsequent ROS production and IKK/NF- κ B activation,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 52, no. 6, pp. 1398–1411,

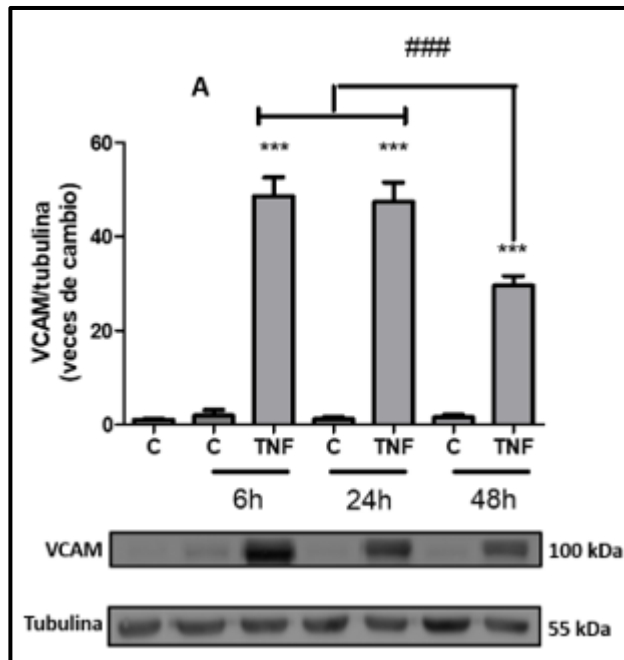
2019.

- [61] Y. Sawa *et al.*, "Effects of TNF-alpha on leukocyte adhesion molecule expressions in cultured human lymphatic endothelium.," *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, vol. 55, no. 7, pp. 721–733, Jul. 2007.
- [62] G. K. Kolluru, J. H. Siamwala, and S. Chatterjee, "eNOS phosphorylation in health and disease.," *Biochimie*, vol. 92, no. 9, pp. 1186–1198, Sep. 2010.
- [63] G. Yan, B. You, S.-P. Chen, J. K. Liao, and J. Sun, "Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1.," *Circ. Res.*, vol. 103, no. 6, pp. 591–597, Sep. 2008.
- [64] K. S. Lee *et al.*, "Functional role of NF-kB in expression of human endothelial nitric oxide synthase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 448, no. 1, pp. 101–107, 2014.
- [65] I. Norambuena-Soto *et al.*, "Angiotensin-(1–9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1-dependent mechanism," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 180, no. May, p. 114190, 2020.
- [66] Y. Liu and L. Tie, "Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF-alpha-induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/AKT signaling pathway.," *BMC Cardiovasc. Disord.*, vol. 19, no. 1, p. 279, Dec. 2019.
- [67] C. Del Bo', M. Marino, P. Riso, P. Møller, and M. Porrini, "Anthocyanins and metabolites resolve TNF-alpha-mediated production of E-selectin and adhesion of monocytes to endothelial cells.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 300, pp. 49–55, Feb. 2019.
- [68] W. Min and J. S. Pober, "TNF initiates E-selectin transcription in human endothelial cells through parallel TRAF-NF-kappa B and TRAF-RAC/CDC42-JNK-c-Jun/ATF2 pathways.," *J. Immunol.*, vol. 159, no. 7, pp. 3508–3518, Oct. 1997.
- [69] M. V Zanni, T. L. Stanley, H. Makimura, C. Y. Chen, and S. K. Grinspoon, "Effects of TNF-alpha antagonism on E-selectin in obese subjects with metabolic dysregulation.," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 73, no. 1, pp. 48–54, Jul. 2010.
- [70] M. Florian and S. Magder, "Estrogen decreases TNF-alpha and oxidized LDL induced apoptosis in endothelial cells.," *Steroids*, vol. 73, no. 1, pp. 47–58, Jan. 2008.
- [71] F.-Q. Long, C.-X. Kou, K. Li, J. Wu, and Q.-Q. Wang, "MiR-223-3p inhibits rTp17-induced inflammasome activation and pyroptosis by targeting NLRP3.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 24, no. 24, pp. 14405–14414, Dec. 2020.
- [72] N.-L. Huang, S.-H. Chiang, C.-H. Hsueh, Y.-J. Liang, Y.-J. Chen, and L.-P. Lai, "Metformin inhibits TNF-alpha-induced I kappa B kinase phosphorylation, I kappa B-alpha degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation.," *Int. J. Cardiol.*, vol. 134, no. 2, pp. 169–175, May 2009.
- [73] A. K. Sampson *et al.*, "Compound 21, a selective agonist of angiotensin AT2 receptors, prevents endothelial inflammation and leukocyte adhesion in vitro and in vivo," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 173, no. 4, pp. 729–740, 2016.
- [74] S. M. Ismail, U. M. Sundar, C. K. Hui, A. Aminuddin, and A. Ugusman, "Piper sarmentosum attenuates TNF-alpha-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in human umbilical vein

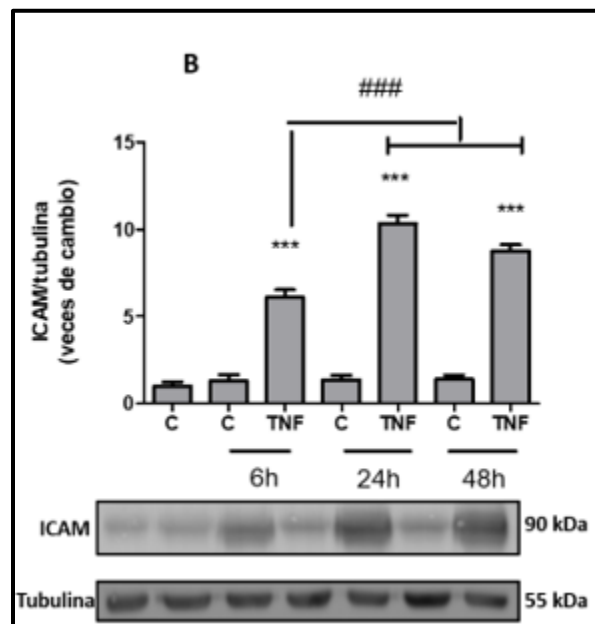
endothelial cells.," *J. Taibah Univ. Med. Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 225–231, Jun. 2018.

- [75] A. Engin, *Endothelial dysfunction in obesity*, vol. 960. 2017.
- [76] Z. Chen, F. Tan, E. G. Erdös, and P. A. Deddish, "Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors.," *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, vol. 46, no. 6, pp. 1368–1373, Dec. 2005.
- [77] Y. Takeda-Matsubara, K. Matsubara, H. Ochi, M. Ito, M. Iwai, and M. Horiuchi, "Expression of Endothelial Angiotensin II Receptor mRNA in Pregnancy-Induced Hypertension," *Am. J. Hypertens.*, vol. 16, no. 12, pp. 993–999, 2003.
- [78] J. A. González-Garrido Chem *et al.*, "Influence of the at 2 receptor on the L-arginine-nitric oxide pathway and effects of (-)-epicatechin on HUVECs from women with preeclampsia," *J. Hum. Hypertens.*, vol. 27, no. 6, pp. 355–361, 2013.
- [79] M. Viswanathan, K. Tsutsumi, F. M. Correa, and J. M. Saavedra, "Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 179, no. 3, pp. 1361–1367, Sep. 1991.
- [80] S. Shanmugam, P. Corvol, and J. M. Gasc, "Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat.," *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, vol. 28, no. 1, pp. 91–97, Jul. 1996.

9.- Anexo.



Anexo 1. Expresión de VCAM-1 en HUVECs estimuladas con TNF-alfa 10 ng/mL por 6, 24 y 48 h. Extraído de Tesis de Magister en Bioquímica de Nicolás Herrera Zelada (con permiso).



Anexo 2. Expresión de ICAM-1 en HUVECs estimuladas con TNF-alfa 10 ng/mL por 6, 24 y 48 h. Extraído de Tesis de Magister en Bioquímica de Nicolás Herrera Zelada (con permiso).