

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**ESTUDIO DE LA ACCIÓN CARDIOPROTECTORA DEL
RETROENANTIO DE ANGIOTENSINA-(1-9) EN
ISQUEMIA-REPERFUSIÓN**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor
en Farmacología

por:

YVO FLORES LEÓN

Santiago-CHILE

2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**ESTUDIO DE LA ACCIÓN CARDIOPROTECTORA DEL
RETROENANTIO DE ANGIOTENSINA-(1-9) EN
ISQUEMIA-REPERFUSIÓN**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en
Farmacología

por:

YVO FLORES LEÓN

Directores de Tesis:

Sergio Lavandero
Dr. Sergio Lavandero González

Dr. Marcelo Kogan

Santiago-CHILE

2023

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

YVO FLORES LEÓN

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

_____.

Directores de Tesis:

Dr. Sergio Lavandero

Dr. Marcelo Kogan

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mauricio Báez

Dr. Claudio Cabello

Dr. Guillermo Díaz

Dr. Danilo González

A mi familia y a todo aquel que debe vender su fuerza de trabajo a cambio de un salario para poder subsistir.

Parte de los resultados de esta tesis, así como las metodologías desarrolladas, han sido presentados en congresos o informados en artículos científicos de la especialidad, los cuales se citan a continuación:

Publicaciones:

- **Yvo Flores**, Gerald Zapata-Torres, Agustin Nuñez, Douglas Matthies, Larissa Aleman, Carolina Hernández-Fuentes, Gina Sanchez, Eyleen Araya, Fanny Guzman, Zully Pedrozo, Salvador Guardiola, Monica Varesse, Ernest Giralt, Ivan Maslov, Mark DelBorgo, Robert Widdop, Mario Chiong, Joseph Hill, María Ocaranza, Marcelo Kogan, Sergio Lavandero. (2022). “*Angiotensin-(1-9) Retro-enantiomer Peptide with Cardio-protective Activity*” (manuscrito en revisión). #:CIRCULATIONAHA/2022/061322.
- Bejarano J, Rojas A, Ramírez-Sagredo A, Riveros AL, Morales-Zavala F, **Flores Y**, Riquelme JA, Guzman F, Araya E, Chiong M, Ocaranza MP, Morales JO, Villamizar Sarmiento MG, Sanchez G, Lavandero S, Kogan MJ. Light-induced release of the cardioprotective peptide angiotensin-(1-9) from thermosensitive liposomes with gold nanoclusters. *J Control Release*. 2020 Dec 10;328:859-872. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.11.002. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33160006.
- Bejarano J, Navarro-Marquez M, Morales-Zavala F, Morales JO, Garcia-Carvajal I, Araya-Fuentes E, **Flores Y**, Verdejo HE, Castro PF, Lavandero S, Kogan MJ. *Nanoparticles for diagnosis and therapy of atherosclerosis and myocardial infarction: evolution toward prospective theranostic approaches*. *Theranostics*. 2018 Sep 9;8(17):4710-4732. doi: 10.7150/thno.26284. PMID: 30279733; PMCID: PMC6160774.

Congresos:

- XXXIII Jornadas Chilenas de Química 2020: Análisis computacional de las interacciones entre angiotensina (1-9) y el receptor de angiotensina tipo 2 (AT₂R).

AGRADECIMIENTOS

La decisión de comenzar en el programa de doctorado fue dura desde una perspectiva personal. Los primeros años, las fuentes de financiamiento se mostraron esquivas y el futuro incierto. En aquel entonces, hice una apuesta aceptando el desafío y hoy tengo la certeza de que tomé el camino correcto. Estos seis años han sido turbulentos, difíciles y a la vez breves. Mas, han servido de justificación para aprender, crecer, fortalecerse y tener la oportunidad de mirar atrás, para valorar a quienes me han acompañado, a quienes me han enseñado y a quienes con afecto me han entregado algo tan preciado como su tiempo.

Para empezar, agradezco a mis directores de tesis, Los Dres. Sergio Lavandero y Marcelo Kogan; por abrir las puertas de sus respectivos laboratorios, su instrucción y orientación en instancias cruciales de este proceso. Me gustaría agradecer de igual manera, el apoyo de la Dra. Gina Sánchez; sus recomendaciones en el diseño y ejecución de los experimentos correspondientes al último objetivo de esta tesis. También a los miembros de la comisión: los Dres. Danilo González, Guillermo Díaz, Mauricio Báez y Claudio Cabello. Gracias a sus aportes y excelente disposición, se logró enriquecer este trabajo, adquiriendo una mayor robustez que, sin duda, será provechosa para posteriores proyectos.

Debo mencionar especial y encarecidamente a dos grandes amigos: el Dr. Gerald Zapata y Douglas Matthies, sin ustedes, este trabajo no sería posible. Sepan que su apoyo ha sido fundamental incluso fuera del laboratorio. Realmente, soy afortunado al haber estrechado lazos con ambos y faltaría espacio en esta sección para seguir agradeciéndoles. Como científicos son gigantes y como seres humanos aún más.

No podría dejar de señalar a quienes desde el primer día de este trayecto han estado presentes: Emanuel Guajardo, Carlos Mateluna y Pedro Novoa. Las horas de estudio, la preparación de cada evaluación y toda discusión científico-filosófica tuvo un impacto positivo en este continuo ejercicio de formación.

Durante la mitad de este proceso, el azote de la pandemia de COVID-19 fue el escenario que condicionó y transformó al mundo, además de ser un mal que cobró miles de vidas en nuestro país. En este contexto, quiero destacar la labor de amigos y compañeros que estuvieron conmigo en este periodo, particularmente al Dr. Rodrigo Torres y Nacaroha Orellana. No podría haber pedido una mejor compañía; compartimos incertidumbres, frustraciones y tristezas, pero también risas y alegrías que todavía atesoro. Asimismo, agradecer a todos los colegas del Instituto de Salud Pública; al Subdepartamento de Genética Molecular, el Subdepartamento de Enfermedades Virales, a Lizete Muñoz y al Dr. Eugenio Ramírez de quien sigo aprendiendo.

Este último párrafo se lo dejo a mi familia. Ningún logro es personal y el afirmar que esta instancia se debe solamente al esfuerzo de un individuo, sería menospreciar las acciones que contribuyeron al resultado. Desde el techo, abrigo, comida o las palabras de aliento, los gestos diarios, la comprensión en circunstancias desfavorables y el empuje antes que cualquier juicio, me han permitido continuar, poder celebrar estos días y los que vendrán. A mis padres: tengo la dicha de poder mirarlos a los ojos, abrazarlos y demostrar lo que siento por ustedes, «la vida es corta, aunque larga en vida» por lo que el tiempo que nos quede por compartir jamás será suficiente. Sólo espero que, cada uno de mis actos pueda retribuir de alguna manera todo lo que me han entregado. A mis hermanos: Fabián, Nadia y Fernanda; no hay momento en mi historia del que no hayan sido parte y este capítulo no es la excepción. Han sido soporte, refugio, compañía, ayuda, consejo, consuelo y el vínculo que nos une desde el nacimiento siempre será un motivo para sentirme agradecido y pleno. Finalmente, a ti Karen: mi vida a tu lado es una permanente aventura. Llevamos cerca de quince años caminando juntos y aunque las horas no se detengan, los días se acorten o tengamos que experimentar la amargura y desazón en varias ocasiones, resistiremos como lo hemos hecho siempre. Seguiremos fraguando nuestro futuro y erigiendo nuestra prosperidad. Sabemos que esto nunca ha sido fácil y no tiene porqué serlo, sin embargo ¿Quién diría que lo que hemos alcanzado hasta ahora podría ser así de significativo? En este compromiso tácito que decidimos honrar cotidianamente, cada segundo ha valido la pena, me ha obsequiado los mejores momentos que pudiese imaginar y si me lo permites, continuaremos avanzando para enfrentar los claroscuros venideros, las tempestades, el azar y los triunfos. Gracias por invitarme a ser parte de ti, de tu hogar y tu familia, y gracias por ser parte de mí, de mi hogar y mi familia.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XIII
SUMMARY	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Infarto agudo del miocardio (IAM).....	1
1.2 I/R y daño producido por ROS.....	2
1.3 Sistema renina-angiotensina (SRA) clásico o canónico	4
1.4. Angiotensina-(1-9)	6
1.5 Angiotensina-(1-9) en I/R y señalización vía AT ₂ R	8
1.6 Estructura del receptor AT ₂	8
1.7 Mecanismos de activación del AT ₂ R.....	11
1.8 <i>Crosstalk</i> entre AT ₂ R y AT ₁ R.....	16
1.9 Mecanismos de señalización	17
1.10 Péptidos miméticos: nuevas estrategias para el desarrollo de fármacos.....	20
1.11 Retroenantiómero de Ang-(1-9): D-Asp ⁹ -DArg ⁸ -DVal ⁷ -DTyr ⁶ -D-Ile ⁵ -DHis ⁴ -DPro ³ -D-Phe ² -DHis ¹	22
2. HIPÓTESIS	24
3. OBJETIVO GENERAL	24
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 Animales	25
5.2 Análisis <i>in silico</i> de las diferencias estructurales entre RE-Ang-(1-9) y Ang-(1-9) utilizando herramientas de dinámica molecular	25
5.3 Análisis estructurales de Ang-(1-9) y RE (1-9) por medio de dicroísmo circular	26

5.4	Análisis estructural de Ang-(1-9) y RE (1-9) mediante pruebas de resonancia magnética nuclear.....	26
5.5	Armado del sistema para la ejecución de la dinámica molecular en los complejos formados con AT ₁ R y AT ₂ R.....	27
5.6	Protocolo de simulación de los complejos formados con el AT ₁ R y el AT ₂ R.....	28
5.7	I/R en modelos <i>ex vivo</i> : Sistema de retroperfusión Langendorff.....	30
5.8	Medición del tamaño de infarto.....	31
5.9	Análisis estadísticos.....	31
6.	RESULTADOS.....	32
6.1	Estructura secundaria de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9).....	32
6.2	Complejo Ang II-AT ₂ R.....	41
6.3	Complejo Ang-(1-9)-AT ₂ R.....	43
6.4	Complejo RE-Ang-(1-9)-AT ₂ R.....	45
6.5	Complejo Ang-(1-9)-AT ₁ R.....	50
6.6	Complejo RE-Ang-(1-9)-AT ₁ R.....	51
6.7	Afinidades de unión teóricas de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) en los receptores AT ₁ y AT ₂	53
6.8	Actividad Cardioprotectora <i>ex vivo</i> de Re-Ang-(1-9).....	54
6.9	Desarrollo de un péptido Re-Ang-(1-9) cíclico basado en los resultados obtenidos en la sección 6.4.....	58
7.	DISCUSIÓN.....	61
7.1	Comparación de estructuras de Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9).....	61
7.2	Interacciones observadas en el sitio ortostérico del complejo Ang-(1-9)-AT ₂ R <i>versus</i> RE-Ang-(1-9)-AT ₂ R.....	63
7.3	Agonismo selectivo del AT ₂ R y similitudes con AT ₁ R.....	67
7.4	Afinidades de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) con AT ₁ R y AT ₂ R.....	69
7.5	Efecto cardioprotector de RE-Ang-(1-9) vs cRE-Ang-(1-9).....	70
8.	CONCLUSIONES.....	72
9.	REFERENCIAS.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema renina-angiotensina (SRA).....	7
Figura 2. Complejos s-Ang II- AT ₂ R (izquierda) Ang II-AT ₂ R (derecha)	10
Figura 3. Vías de transducción de señales mediadas por el AT ₂ R	19
Figura 4. Esquema representativo de la metodología retroenantio para la síntesis de péptidos miméticos	21
Figura 5. Estructuras de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9).....	23
Figura 6. Dinámica Molecular de Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9).	33
Figura 7. Gráfica de Ramachandran para los residuos que conforman el backbone de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9).	35
Figura 8. Espectros de dicroísmo circular de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9)	36
Figura 9. Constantes de acoplamiento $3J_{NH\alpha}$ determinada para los residuos de Ang-(1-9) y RE (1-9).	38
Figura 10. Análisis estructural de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) por medio de RMN y REMD.	40
Figura 11. Dinámica molecular del complejo Ang II-AT ₂ R.....	43
Figura 12. Dinámica molecular del complejo Ang-(1-9)-AT ₂ R.....	45
Figura 13. Dinámica molecular del complejo RE-Ang-(1-9)-AT ₂ R.....	47
Figura 14. Esquema comparativo de las conformaciones de los péptidos Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) y principales interacciones dentro del bolsillo de AT ₂ R.....	49
Figura 15. Interacciones observadas en el sitio ortostérico de AT ₁ R	52
Figura 16. Actividad de RE-Ang-(1-9) <i>ex vivo</i>	55
Figura 17. Análisis del efecto cardioprotector de RE-Ang-(1-9) en corazones aislados sometidos a I/R en el sistema de Langendorff	57
Figura 18. Análisis del efecto de cRE-Ang-(1-9) en corazones aislados sometidos a I/R en el sistema de Langendorff	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Afinidades de unión calculadas	54
--	----

ABREVIATURAS

%p/v: porcentaje peso volumen

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

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

ANP: Péptido natriurético auricular

AT₁R: Receptor de angiotensina II subtipo 1

AT₂R: receptor de angiotensina II subtipo 2

ATP: Adenosín Trifosfato

BNP: Péptido Natriurético Cerebral

BSA: Albúmina de suero bovino

cAng-(1-9): Angiotensina-(1-9) cíclica

CD: Dicroísmo circular

cGMP: GMP cíclico

CO₂: Dióxido de carbono

cRE-Ang-(1-9): *retroenantio* de Ang-(1-9) cíclico

D-aa: Aminoácidos en conformación estereoisómera D.

ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina I

ECA2: Enzima convertidora de Angiotensina 2

ECV: Enfermedades Cardiovasculares

FBS: Suero Fetal Bovino

GPCR: Receptor Acoplado a Proteína G

GSH-Px: Glutati6n Peroxidasa

I/R: Isquemia-Reperfusi6n

IAM: Infarto agudo del Miocardio

L-aa: Amino6cidos en conformaci6n estereois6mera L

LVDP: Desarrollo de presi6n del ventr6culo izquierdo

LVEDP: Presi6n de fin de di6stole del ventr6culo izquierdo

MasR: Receptor Mas

MD: Din6mica Molecular

min: Minutos

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MMGBSA: Mec6nica Molecular con Born Generalizado y Solvataci6n de 6rea Superficial

MMPBSA: Mec6nica Molecular con Poisson-Boltzmann y solvataci6n del 6rea superficial

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucle6tido Fosfato

NaP: Buffer Fosfato

NE: Norepinefrina

nM: Nanomolar

NO: Óxido Nítrico

NOE: Efecto Nuclear Overhausen

ns: Nanosegundos

NVRM: Cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatas

OMS: Organización Mundial de la Salud

PKA: Proteína quinasa A

ps: Picosegundos

RE-Ang-(1-9): *retroenantio* de Ang-(1-9)

REMD: Replica Exchange Molecular Dynamics

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RMSD: Raíz de la Desviación Cuadrática Media de las posiciones Atómicas

ROESY: *Rotating Frame NOE*

ROS: Especies reactivas de Oxígeno

s: Segundos

s-Ang II: Análogo [¹Sar, Ile⁸] de Ang II

SOD: Superóxido Dismutasa

CAT: Catalasa

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

TFE: Trifluoroetanol

TOCSY: Espectroscopía de Correlación Total

β -MHC: Cadena pesada de la β -miosina

μ g: Microgramo

μ L: Microlitro

μ M: Micromolar

μ s: Microsegundos

RESUMEN

Angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] es un nonapéptido derivado del sistema renina-angiotensina no canónico cuyo efecto cardioprotector está mediado a través de su unión al receptor de angiotensina subtipo 2 (AT₂R) y su posterior activación. Si bien Ang-(1-9) muestra resultados promisorios en modelos experimentales, una potencial intervención farmacológica con este péptido presenta desventajas importantes, entre ellas una corta vida media en el plasma. Para superar esta limitación, en este trabajo se propuso la utilización de un péptido-mimético de Ang-(1-9) utilizando la estrategia *retroenantio* para la síntesis del retroenantiómero de Ang-(1-9) denominado RE-Ang-(1-9). Los análisis estructurales mediante dinámica molecular (MD), dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear (RMN) mostraron que RE-Ang-(1-9) tendría una conformación extendida y flexible. Más adelante, estudios *in silico* de los complejos ligando-receptor sugieren que las cadenas laterales de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) tienen orientaciones similares, compartiendo interacciones descritas como críticas al interior del sitio ortostérico del AT₂R. Además, RE-Ang-(1-9) adoptaría una conformación cerrada en la cavidad, similar a la de un “péptido cíclico”. Posteriormente, al evaluar la actividad biológica del RE-Ang-(1-9) en un modelo de isquemia/reperfusión *ex vivo* se muestra un efecto cardioprotector, reduciendo el tamaño de infarto significativamente de $39 \pm 2\%$ a un $12 \pm 3\%$ respecto del grupo control. Por otra parte, una variante cíclica del RE-Ang-(1-9) [cRE-Ang-(1-9)] mostró preliminarmente un efecto detrimental sobre el

tejido cardiaco. En conjunto, estos resultados sugieren que RE-Ang-(1-9) tiene un efecto cardioprotector, dando indicios de una potencial relación estructura-actividad contribuyendo a las bases de la selectividad funcional de AT₂R.

SUMMARY

Angiotensin-(1-9) [Ang-(1-9)] is a nonapeptide derived from the non-canonical renin-angiotensin system whose cardioprotective effect is mediated through its binding to the angiotensin receptor subtype 2 (AT₂R) and its subsequent activation. Although Ang-(1-9) shows promising results in experimental models, a potential pharmacological intervention with this peptide has important limitations, including a short half-life in plasma. To overcome this problem, this work proposed the use of an Ang-(1-9) peptide-mimetic using the *retroenantio* strategy for its synthesis called retroenantiomer Ang-(1-9) (RE-Ang-(1-9)). Structural analyzes by molecular dynamics (MD), circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) showed that RE-Ang-(1-9) would have an extended and flexible conformation. Further *in silico* studies of the ligand-receptor complexes suggest that the side chains of Ang-(1-9) and RE-Ang-(1-9) have similar orientations, sharing interactions described as critical into the AT₂R orthosteric site and RE-Ang-(1-9) would adopt a closed conformation into the binding cavity, similar to a cyclic peptide. RE-Ang-(1-9) biological activity showed a cardioprotective effect in an *ex vivo* ischemia/reperfusion model, reducing infarct size from $39 \pm 2\%$ to $12 \pm 3\%$. On the other hand, a cyclic variant of RE-Ang-(1-9) [cRE-Ang-(1-9)] showed a detrimental effect on cardiac tissue. Taken together, these results suggest that RE-Ang-(1-9) has a cardioprotective effect via AT₂R showing potential clues related to functional selectivity and structure-activity relationship.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infarto agudo del miocardio (IAM)

Las patologías cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte a nivel mundial. De acuerdo con las cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2012, 17,5 millones de defunciones fueron reportadas por este tipo de trastornos, siendo el infarto agudo del miocardio (IAM) la cardiopatía con mayor frecuencia, con aproximadamente 7,4 millones de muertes alrededor del mundo. Esta cardiopatía de tipo isquémica se caracteriza por la oclusión de arterias coronarias, las cuales son las encargadas proveer sangre al miocardio. La obstrucción del flujo sanguíneo deriva en la muerte de los cardiomiocitos, ocasionando una lesión irreversible en el corazón. El desarrollo del IAM se ve favorecido por el estrechamiento (estenosis) de las arterias coronarias que corresponde a un proceso de formación de colágeno, acumulación de lípidos y células inflamatorias. Con respecto al tratamiento, usualmente se lleva a cabo mediante el uso de trombolíticos, o a través del restablecimiento del flujo sanguíneo por medio de una intervención quirúrgica (angioplastia). No obstante, como consecuencia de este procedimiento, el cuadro de isquemia seguido por la reperfusión del tejido cardíaco es a menudo asociado con la activación de una cascada de señalización deletérea, de este modo el infarto sufrido puede verse aumentado hasta en un 50% proporcionando un daño crítico en el órgano. Si bien los avances en cuanto al tratamiento del IAM son promisorios, nuevos blancos farmacológicos son requeridos para la prevención de la lesión por eventos de

isquemia-reperfusión (I/R), cuya característica principal es el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el subsecuente daño oxidativo.

1.2 I/R y daño producido por ROS

Un extenso número de estudios indican que, aunque la revascularización sea restablecida, una parte significativa de muerte celular es inducida paradójicamente, por la propia restauración del flujo. El fenómeno denominado síndrome de daño por reperfusión, ha sido explorado en diversos modelos experimentales [1-3]. Asimismo, se entiende que luego del IAM, recuperar el control de la homeostasis iónica es de suma importancia, debido a que el desequilibrio promueve la muerte de los cardiomiocitos [4-6]. Este tipo de muerte se produce durante los primeros minutos de la restauración del oxígeno y del flujo sanguíneo [7]. A continuación, se revisarán brevemente algunos de los mecanismos descritos para los eventos involucrados en la patogénesis.

Una serie de cambios bioquímicos y metabólicos en el tejido miocárdico ocurren debido a la privación de oxígeno y nutrientes durante la isquemia. El daño a nivel mitocondrial y carencia de ATP conducen a la disfunción en la capacidad contráctil del miocardio [6]. La glicólisis se lleva a cabo en ausencia de oxígeno, acumulando lactato intracelular y acidificando el medio extracelular [8-10]. Posteriormente, las bombas de $\text{Na}^+\text{-H}^+$ son activadas, liberando H^+ al medio extracelular a cambio de la entrada de moléculas de Na^+ . De este modo la función

de la bomba de la ATPasa de Na^+/K^+ contribuye al aumento intracelular de iones Na^+ y Ca^+ [9, 10].

Luego del restablecimiento del flujo sanguíneo, los niveles de oxígeno aumentan considerablemente, el efecto producido por esta alza conlleva a un incremento de ROS, generado por el daño por reperfusión [5, 6, 11, 12]. Entre fuentes generadoras de ROS se encuentran: a) La transformación, mediada por proteasas dependientes de Ca^{+2} , de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, que en presencia de O_2 durante la reperfusión oxida la hipoxantina a ácido úrico con generación del radical anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). B) La actividad de la NADPH oxidasa (NOX) en la mitocondria cataliza la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 formando O_2^- . rápidamente convertido en H_2O_2 , derivando en la formación de ácido hipocloroso (HOCl) y radical hidroxilo (OH^\cdot), el cual puede interactuar con lípidos, DNA y proteínas produciendo daño a nivel celular [7, 10, 13]. Por otro lado, los mecanismos de defensa para contrarrestar el incremento de ROS intracelular pueden ser clasificados como enzimáticos: principalmente a través de la actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión peroxidasa (GSH-Px), estas enzimas establecen una primera barrera de defensa ante el daño oxidativo [13-15]. Mientras que los no enzimáticos comprenden moléculas como glutatión reducido (GSH), cisteínas y otras moléculas que también pueden ser incorporadas por medio de una vía exógena [5, 6, 11, 12].

El daño por isquemia-reperfusión ha sido ampliamente estudiado [7], describiéndose arritmias por reperfusión, daño microvascular, atontamiento en el miocardio y muerte celular [1, 3, 8-10]. El desbalance entre los mecanismos antioxidantes y ROS conlleva a la activación de procesos inflamatorios, acidosis celular, desorganización del citoesqueleto y eventos de apoptosis, necrosis y necroptosis, entre otros [5, 16]. Entender los mecanismos involucrados en eventos de I/R es clave para descubrir y explorar nuevos blancos terapéuticos. Es así, como la intervención del eje renina-angiotensina clásico se ha convertido en los últimos años en un campo promisorio para la implementación de nuevas estrategias farmacológicas [17, 18].

1.3 Sistema renina-angiotensina (SRA) clásico o canónico

El sistema renina-angiotensina (SRA) cumple un rol importante sobre el daño en el tejido miocárdico en eventos de I/R [19-21]. Brevemente, de acuerdo con la vía canónica de este sistema, se llevan a cabo una serie de cortes proteolíticos, en primer lugar, a partir del angiotensinógeno [20, 22-25], una glicoproteína de 452 aminoácidos sintetizada en el hígado [26, 27]. Este angiotensinógeno es hidrolizado por la renina dando origen a la angiotensina I (o angiotensina-1-10)), deca péptido inactivo y que es sustrato de la enzima convertidora de angiotensina I, (ECA) generando la angiotensina II (o angiotensina-(1-8)) [20, 28] (**Figura 1**). Diversos estudios sugieren que angiotensina II (Ang II) tendría un efecto deletéreo sobre el tejido cardiaco, aumentando la acidosis dentro del

cardiomiocito e induciendo muerte celular *in vitro* [29] y daño oxidativo [30]. Ang II ejerce una acción vasoconstrictora a través de su unión al receptor de angiotensina II subtipo I (AT₁R) [31, 32]. Existe una relación entre AT₁R y el daño al miocardio en modelos *ex vivo* e *in vivo* [29, 33, 34]. Además, Ang II modularía positivamente la expresión del AT₁R [35]. De forma concomitante, la expresión del receptor AT₁ aumenta inmediatamente post-I/R, contribuyendo a la disfunción cardíaca [36]. Adicionalmente, diversos estudios muestran que este efecto se encuentra estrechamente regulado por ROS a través de un *feedback* positivo [37, 38]. Por ejemplo, el tratamiento de fibroblastos cardíacos con H₂O₂ induce significativamente la síntesis de Ang II con un subsecuente aumento de la expresión de los receptores AT₁ [38]. De esta forma, los datos son concluyentes respecto al desarrollo de una señalización patológica mediada Ang II a través de AT₁R [38, 39]. La vía de señalización del AT₁R se encuentra acoplada a la activación de otras vías mediadas por receptores de tipo tirosina quinasa (RTK), MAPK como también transductores y factores de transcripción (por ej. JAK-STAT) [40, 41]. La activación del AT₁R durante I/R modula la actividad de canales iónicos a través del complejo $\beta\gamma$ de la proteína G con la producción de ROS mediante la activación del complejo NADPH oxidasa [41]. Es por esta razón que las terapias farmacológicas actuales, están orientadas a la supresión de la vía canónica del SRA, por medio de inhibidores de la ECA (iECA) y el uso de antagonistas del AT₁R [42-48]. No obstante, nuevos antecedentes indican la participación de elementos no-canónicos del SRA, cuyos efectos muestran

funciones antagónicas a los reportados por medio de la vía SRA clásico, entre los que destacan procesos enzimáticos que participan en la producción de variantes de angiotensina [28, 49, 50]. Como es el caso de angiotensina (1-9) (Ang-(1-9)) [50-52], el que será revisado a continuación.

1.4. Angiotensina-(1-9)

Ang-(1-9) corresponde a un péptido de 9 residuos (H₂N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-COOH) [31, 53]. Este péptido se genera a partir de la hidrólisis de la leucina terminal de angiotensina I por medio de la ECA2 [54]. Se ha descrito que Ang-(1-9) tendría una función contrarreguladora de los efectos reportados para Ang II [55, 56]. Drummer *et al.* (1990) observaron que el tratamiento crónico con iECA disminuye los niveles de Ang II y de manera concomitante, la estrategia favorecería un aumento de los niveles de Ang-(1-9) [56]. Estos resultados sugieren la existencia de un efecto favorable y complementario de Ang-(1-9) sobre el tejido cardiaco. Posteriormente, se observó que la administración crónica de Ang-(1-9) tiene un efecto hipotensor, reduciendo la presión arterial sistólica y evitando el daño cardiovascular, mejorando también la función cardiaca endotelial, el remodelado del tejido cardiaco y disminuyendo los niveles de ROS en ratas hipertensas a través de un mecanismo mediado por el receptor de angiotensina tipo 2 (AT₂R) [31]. Se obtuvo resultados similares en modelos murinos de hipertensión pulmonar [51, 57]. La administración crónica de Ang-(1-9) presentó un efecto antifibrótico, que regula negativamente los niveles de

moléculas proinflamatorias y la expresión de factores proapoptóticos [51] (**Figura 1**).

En relación con lo anterior, la señalización celular y los efectos dependientes del AT₂R se encuentran menos documentados que los de AT₁R. Sin embargo, se le ha podido asociar efectos vasodilatadores, anti-proliferativos y anti-inflamatorios [52, 53, 58-60]. Varios estudios han concluido que el AT₂R también regula la presión arterial, hipertrofia, fibrosis cardiaca y la muerte celular posterior al IAM [60]. Por lo que los efectos dependientes de la vía no canónica de SRA a través de AT₂R, tendrían una función cardioprotectora [58].

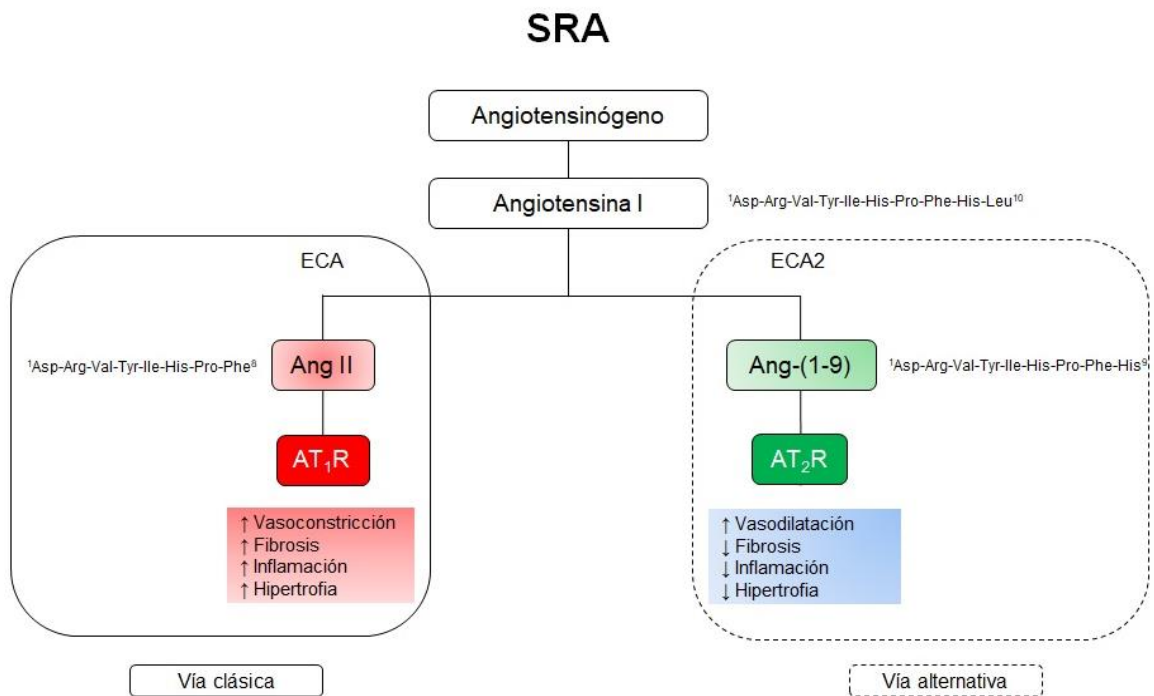


Figura 1. Sistema renina-angiotensina (SRA). Se destaca el rol de angiotensina II sobre AT₁R (Vía clásica) y Ang-(1-9) sobre AT₂R (Vía alternativa).

1.5 Angiotensina-(1-9) en I/R y señalización vía AT₂R

La lesión producida durante por la I/R desencadena una serie de respuestas adaptativas que tienen como objetivo el recambio del tejido dañado, además de cambios en la función celular (reprogramación transcripcional) que derivan en señales de muerte celular por apoptosis y/o necrosis en el miocardio [61, 62]. Desde esta perspectiva, la acción de Ang-(1-9) a través de la unión con el AT₂R se convierte en una alternativa viable para futuras investigaciones [63-67]. Algunos estudios han evaluado la actividad cardioprotectora de Ang-(1-9) en modelos de I/R [59]. En primera instancia, se ha descrito que los niveles circulantes de Ang-(1-9) se incrementan en etapas tempranas a eventos de I/R *in vivo* [68]. Más tarde, al utilizar una estrategia de preconditionamiento con Ang-(1-9) en ratas sometidas a isquemia a través de la ligadura de la arteria descendente anterior izquierda, se observó que el tamaño de infarto disminuye significativamente [59]. Para entender los mecanismos que median este efecto cardioprotector, es necesario revisar 4 aspectos que modulan la respuesta: 1) La estructura del receptor AT₂. 2) Los mecanismos de activación del receptor. 3) El *crosstalk* con AT₁R y 4) La señalización río abajo del AT₂R.

1.6 Estructura del receptor AT₂

El receptor AT₂ comparte un 34% de identidad aminoacídica con el AT₁R y su estructura corresponde a la de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) [69, 70]. La arquitectura general del AT₂R comprende 7 segmentos

transmembrana (hélices I -VII) y una hélice intracelular anfipática (H8). Análisis cristalográficos del AT₂R determinaron que el dominio H8, dependiendo de su posición, podría impedir el acoplamiento de la proteína G, así como también la unión con β -arrestina que media su internalización [71]. Estudios posteriores lograron cristalizar la estructura del AT₂R unido a Ang II (**Figura 2**), de esta forma se observaron las principales interacciones ligando-receptor conservadas entre los receptores AT₁ y AT₂ como, por ejemplo. Tyr103^{2.63}, Arg182^{ECL2}, Lys215^{5.42}, Asp279^{6.58} y Asp297^{7.32}. Además, se identificó la participación de los residuos críticos dentro del dominio de unión a ligando de AT₂R como lo son Met128^{3.36}, Trp269^{6.48}, Phe272^{6.51}, Tyr104^{2.64}, Phe308^{7.43}, que podrían favorecer respuestas diferenciales entre ambos receptores [72]. Del mismo modo, algunas publicaciones sugieren que la función del AT₂R estaría estrechamente relacionada con el tipo de ligando acoplado al sitio de unión [71, 73, 74]. De acuerdo con lo anterior, se desconoce qué tipo de interacciones se producirían dentro de este dominio con un ligando como Ang-(1-9).

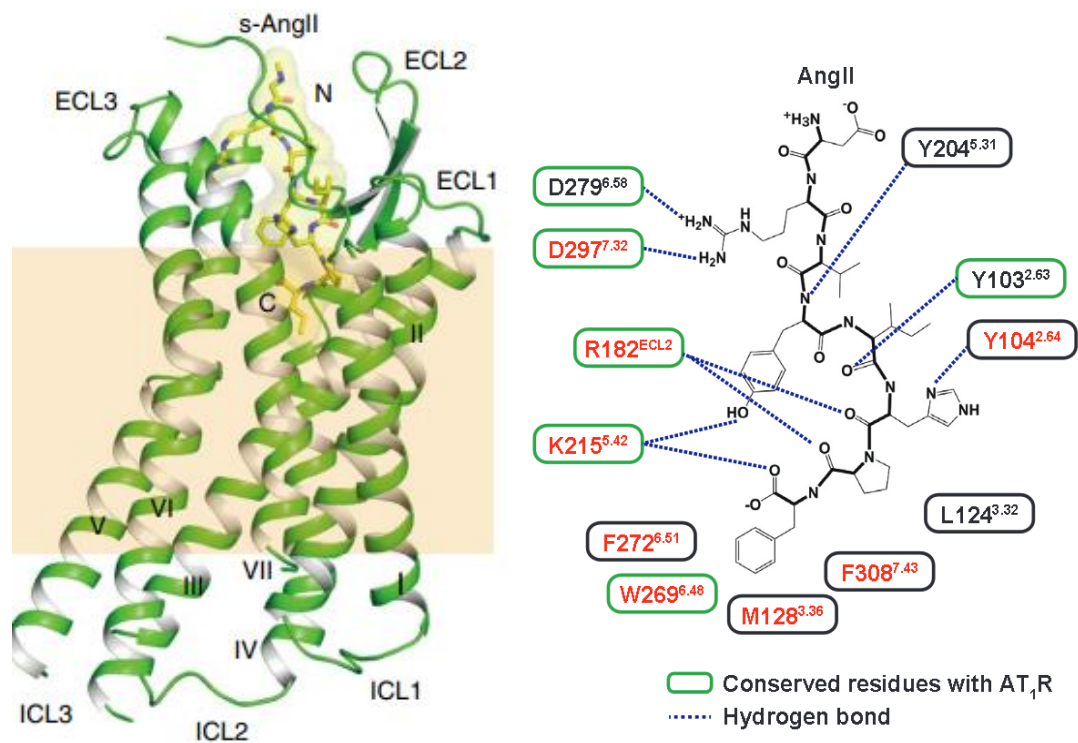


Figura 2. Complejos s-Ang II- AT₂R (izquierda) Ang II-AT₂R (derecha) (modificado de Asada *et al.*, 2019 y Asada *et al.*, 2020 respectivamente). La estructura cristalina muestra la inserción de s-Ang II dentro del bolsillo del AT₂R, interactuando con los segmentos de membrana TM2, TM5, TM6, TM7 y el *loop* extracelular 2 (ECL2). El péptido s-Ang II se orienta dentro del sitio ortostérico del AT₂R, exponiendo la porción N-terminal hacia la región extracelular, dejando la porción C-terminal hacia el fondo del bolsillo. De igual forma la unión de Ang II dentro del bolsillo de AT₂R deja expuesta la porción N-terminal del péptido (Asp1, Arg2). Además, se muestran las principales interacciones dentro del sitio ortostérico del AT₂R (derecha). Se destacan los contactos polares entre los residuos del receptor y las cadenas laterales de Ang II (línea discontinua), los residuos conservados con el AT₁R (en verde) y también la identificación de residuos críticos para la activación del AT₂R (marcados con rojo).

1.7 Mecanismos de activación del AT₂R

Como se mencionó anteriormente, las estructuras cristalizadas de AT₂R disponibles corresponden a complejos formados con Ang II y análogos como s-Ang II [¹Sar, Ile⁸] y moléculas pequeñas. De igual forma, estas moléculas muestran actividad en AT₁R y AT₂R. Estos datos en conjunto con modelos de dinámica molecular de nivel atómico han mostrado evidencia de potenciales mecanismos de activación en el AT₂R, encontrándose ciertas similitudes con el AT₁R [72, 75-77]. Así, para comprender estos mecanismos de activación en AT₂R se hace necesario establecer un paralelismo con el AT₁R.

El espacio intracelular de estos GPCRs clase A se encuentra altamente conservado en residuos como Arg3.50, Tyr7.53 y menos conservados en el sitio de unión a ligando, antecedente que sugiere una serie de interacciones específicas que estabilizarían conformaciones diferentes en el espacio intracelular. Hasta la fecha no se han identificado cuáles son estas conformaciones y de qué forma los diferentes ligandos podrían inducirlas. El uso de simulaciones a gran escala sugiere que el acoplamiento del AT₁R a las dos vías (proteínas G y β -arrestinas) se realiza a través de dos conformaciones distintas del AT₁R y que los ligandos extracelulares favorecen una u otra conformación [76]. Además, las estructuras cristalizadas del AT₁R unidas a los ligandos con diferentes perfiles selectivos muestran cambios conformacionales dentro y alrededor del bolsillo del receptor de acuerdo con lo observado en

simulaciones [77]. El receptor AT₁ tiene una señalización canónica bien descrita. Sin embargo, el AT₂R no muestra estas características clásicas de señalización de GPCRs [78]. Estudios recientes sugieren características estructurales que podrían explicar el bajo acoplamiento con proteínas G, la falta de fosforilación por quinasas y la desensibilización posterior a la unión de Ang II [71, 72, 78]. En todos los GPCRs en los cuales el estado activo e inactivo han sido determinados, se muestra una clara transición conformacional entre ambos. Esta transición es similar en el espacio intracelular y el sitio de unión a ligando. Esto sugiere que los péptidos derivados de angiotensina I como por ejemplo Ang II o Ang-(1-7) entre otros, podrían unirse al AT₁R y/o AT₂R, generando respuestas diferenciales río abajo resultando en distintos mecanismos de activación, pero llevando a cambios conformacionales similares.

Por otro lado, ligeras modificaciones en Ang II pueden resultar en un agonismo selectivo a través de una señalización por proteína G o β -arrestina en AT₁R, pudiendo modular una mayor o menor respuesta a través de estas dos vías en comparación con Ang II. En particular, la alteración de su C-terminal Phe⁸ atenúa la señalización mediada por Gq, pero no el acoplamiento de β -arrestina [77]. El desarrollo de ligandos selectivos para β -arrestina incrementaría la contractilidad cardiaca evitando los efectos hipertensivos no deseados. El modo de unión de Ang II y s-Ang II es similar en los AT₁R y AT₂R [72, 75, 77]. Las principales diferencias se encuentran en la región extracelular. En el complejo AT₁R-s-Ang II, las cadenas laterales de Ile⁵ y Val³ del péptido se orientan en la

misma dirección y muestran interacciones hidrofóbicas con Tyr92^{ECL1}, Ile172^{ECL2} y Ala181^{ECL2}; mientras los residuos de Arg2, Tyr4, His6 y el carboxilo terminal de la molécula, apuntan hacia el lado opuesto en el dominio de unión a ligando a través de interacciones polares. El extremo carboxilo de Ile8 o Phe8 en ambos octapéptidos, interactúan con la cadena lateral de Tyr4.

Comparado con el AT₂R, el extremo N-terminal del AT₁R se encuentra plegado hacia el *loop* extracelular 2 (ECL2), originando un espacio para la unión de la ¹Sar y permitiendo una ubicación más profunda de Arg2 dentro de la cavidad. Tanto Ang II como s-Ang II se unen a los receptores con el extremo N-terminal expuesto hacia el espacio extracelular. Por su parte, Ang II exhibe el extremo C-terminal orientado hacia el fondo del bolsillo de tal modo que la cadena lateral de Phe8 se mantiene flexible e inserta en el área hidrofóbica del sitio ortostérico. Aparentemente, existen diferencias entre la orientación de las cadenas laterales especialmente en el fondo del bolsillo donde residuos como Leu112^{3.36} en AT₁R y Met128^{3.36} de AT₂R tienen un papel en la activación del receptor [58, 79]. Luego de la unión, se han descrito cambios conformacionales en un área conocida como el candado interno, el cual es esencial para la estabilización de la conformación inactiva del AT₁R (Asn111^{3.35}-Asn295^{7.46}) [80]. Este candado no se encuentra en el AT₂R (Asn127^{3.35}-Ser311^{7.46}). No obstante, esta característica podría entregar información sobre las bases moleculares de la actividad basal observada en el AT₂R. Los complejos cristalizados del AT₁R unidos a análogos de angiotensina con perfiles selectivos muestran una

orientación similar de unión, a pesar de las variaciones en la posición de los residuos 1 y 5 de los péptidos. Los estudios no advierten una alteración significativa de las interacciones con el receptor, lo cual refuerza la idea de que los cambios en estos residuos no serían necesarios para cambiar la respuesta rí abajo generada por la unión de Ang II al receptor [77]. Por otro lado, se ha descrito diferencias sustanciales entre la unión de Ang II y el reclutamiento de β -arrestina, el cual ocurre en el fondo del sitio ortostérico del receptor, cuyos residuos interactúan con la porción C-terminal del ligando. Otros estudios indican que disminuyendo el tamaño de la región C-terminal de Ang II se favorece la activación de la vía a través de β -arrestina. Sin embargo, cabe destacar que la longitud de ligando no es el único factor determinante para la selectividad funcional del receptor [76]. Se ha reportado que anillos aromáticos en el extremo C-terminal se orientan de forma vertical, favoreciendo una conformación intracelular alternativa [76]. A su vez, el papel de las cadenas laterales en la posición 8 de Ang II o s-Ang II y sus efectos en la señalización selectiva a través de β -arrestina o proteína G también se ha sugerido. La sustitución en esta posición puede dar como resultado un agonista parcial para la señalización vía Gq [72]. El residuo de Phe8 en Ang II y en otros agonistas totales activan eficientemente la señalización por medio de Gq mientras que una sustitución por Ala o incluso deleciones en esta misma posición, da como resultado el reclutamiento de β -arrestina [77]. El residuo de Arg2 de Ang II unido al bolsillo de AT₂R muestra dos interacciones de tipo puente salino con los residuos Asp279^{6,58}

y Asp297^{7.32}, los cuales se encuentran conservados en el AT₁R (Asp263^{6.58} y Asp281^{7.32} respectivamente). La cadena lateral de Arg2 parece tener un rol importante en la afinidad del ligando con AT₂R. Pentapéptidos que carecen de este grupo guanidinio disminuyen su afinidad con el AT₂R [81]. Los oxígenos del grupo carbonilo de Ile5 forman un puente de hidrógeno con Tyr103^{2.63}, mientras que los oxígenos del grupo carbonilo de His6 y Pro7 forman un puente de hidrógeno con el grupo guanidinio de Arg182^{ECL2}, el cual ha sido descrito como un residuo crítico de unión. El grupo imidazol de la cadena lateral de His6 forma un puente de hidrógeno que con Tyr104^{2.64}. Por otra parte, la porción C-terminal de Phe8 forma un puente salino con Lys215^{5.42} este residuo se encuentra conservado en AT₁R (Lys199^{5.42}). Además, estudios de mutagénesis han descrito a este residuo como un punto clave para la activación del AT₁R [82]. Si bien los datos experimentales, en complemento con la información obtenida de los sistemas teóricos han dado luces sobre los mecanismos de activación del AT₂R contrastándolos con el funcionamiento de AT₁R, las bases moleculares del agonismo selectivo del AT₂R permanecen sin estar del todo claras. Más aún, se desconoce cómo Ang-(1-9) se uniría a AT₂R o si este ligando pudiese interactuar también con el sitio ortostérico del AT₁R, activando alguna vía de señalización alternativa. Dado estos antecedentes se hace relevante revisar la respuesta del AT₂R dentro del contexto de la comunicación cruzada con AT₁R. A continuación, se revisará brevemente la relación de la respuesta AT₁R-AT₂R.

1.8 *Crosstalk* entre AT₂R y AT₁R

Distintos trabajos sugieren un *crosstalk* entre el AT₂R y el AT₁R [32, 83-86]. En células renales, el uso de agonistas del AT₂R reprime la expresión del AT₁R a través de una vía dependiente de óxido nítrico/cGMP/Sp1 [87]. El receptor AT₂ actúa como un regulador negativo de la función del AT₁R [88]. Paralelamente, AT₂R puede formar heterodímeros con el AT₁R [20]. La interacción AT₂R-AT₁R produce la inhibición directa del AT₁R [20]. Un mecanismo descrito para AT₂R consiste en la activación de fosfatasas que apagan las vías de señalización activadas por el AT₁R, las cuales fueron mencionadas anteriormente [89]. De esta manera procesos como la proliferación celular, diferenciación, activación de fibroblastos y procesos proapoptóticos son inhibidos a través de este mecanismo [61, 66, 90, 91]. Aunque ambos receptores estimulan la fosforilación de ERK 1/2, las células que expresan sólo AT₁R, la vía MAPK inducida por EGF aumentó en presencia de Ang II de forma sinérgica [86]. En contraste, se determinó que las células que expresaban solo AT₂R muestran una reducción de la activación de ERK inducida por EGF [85, 86]. En fibroblastos que expresan AT₁R-AT₂R, Ang II potencia la activación de ERK inducida por EGF [86]. Así, la ocurrencia de un mecanismo regulatorio funcional entre AT₁R y AT₂R, y el *crosstalk* entre los receptores de Ang II y los receptores que promueven el crecimiento, puede explicar aún más los mecanismos de la fisiopatología del daño cardiovascular en función de la activación del eje SRA [92]. Descubrir nuevos mecanismos para entender la fisiopatología y farmacología de los receptores de Ang II, es una tarea

aún inconclusa para encontrar terapias específicas y selectivas para protección cardiovascular.

1.9 Mecanismos de señalización

En cardiomiocitos, Mendoza et al., (2018) determinaron que Ang-(1-9) actúa a través AT₂R activando Akt [59]. Previamente se ha descrito que la vía PI3K/Akt tiene un efecto cardioprotector en ratas diabéticas sometidas a eventos de I/R [93]. Este antecedente guarda relación con lo observado en reportes de I/R en células renales [94]. Brevemente, se estableció que la activación de Akt (pAkt) modula positivamente los niveles de Nrf2 y consecutivamente se registra un aumento significativo en la expresión de HMOX1 luego de 1 h de privación de oxígeno, lo que favorece procesos de evasión de muerte celular [94]. Este mecanismo ha sido evidenciado también en modelos de I/R en tejido nervioso, mediante una vía dependiente de PI3K/Akt que reduce el tamaño de infarto *in vivo* [94-96] (**Figura 3**). Esta vía señalización cumple un rol crucial en la regulación de la supervivencia celular, mostrando efectos directos sobre estímulos que inducen apoptosis [97]. Se conoce que Akt suprime directamente por fosforilación la acción de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 [98-100] Igualmente, se ha estudiado la interacción de Akt con proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK) las cuales regulan respuestas celulares asociadas a la síntesis de citoquinas [101]. El sistema SAPK, consiste en 2 grupos de quinasas: JNK y p38 MAPK cuya función puede ser modulada río arriba por Akt

al fosforilar ASK1, inhibiendo la apoptosis [102]. También se ha observado regulación transcripcional sobre factores asociados a sobrevivencia celular [97]. Un ejemplo de ello es la interacción directa entre Akt y FoxO. Luego de su fosforilación por Akt, FoxO modularía la expresión de factores como TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) y TRADD (*TNF receptor type 1 associated death domain*) en conjunto con proteínas de la familia Bcl-2 y componentes intracelulares que median la apoptosis [97, 103]. Asimismo, se ha visto que factores de transcripción como NF- κ B cuya activación es dependiente de la fosforilación de I κ B es regulado a través de la actividad de Akt [104, 105], conduciendo a la expresión de genes como Bcl-xL, inhibidores de caspasas y c-Myb [106]. Otros factores como p53, regulador maestro de genes proapoptóticos [107, 108], es inhibido por la acción de la ubiquitina ligasa Mdm2 [97]. Algunos estudios señalan que Akt fosforila a Mdm2, promoviendo su traslocación al núcleo, regulando sus niveles y llevando a p53 a degradación [109, 110]. De este modo, la participación de Akt tiene un papel central para el desarrollo de los mecanismos descritos y su activación vía Ang-(1-9)-AT₂R podría situarse como una posible solución para mitigar el daño por reperfusión, aumentando la sobrevivencia de los cardiomiocitos. Sin embargo, al igual que con otras moléculas endógenas, una eventual intervención farmacológica con Ang-(1-9) presenta desventajas. Entre ellas, cabe mencionar que la mayoría de los péptidos son moléculas de corta duración, degradadas fácilmente por enzimas [111, 112]. Frente a este escenario, el diseño racional de moléculas que semejan a Ang-

(1-9) en términos de estructura-actividad son requeridos para esclarecer esta interrogante y abrir nuevas alternativas para el desarrollo de moléculas de interés farmacológico.

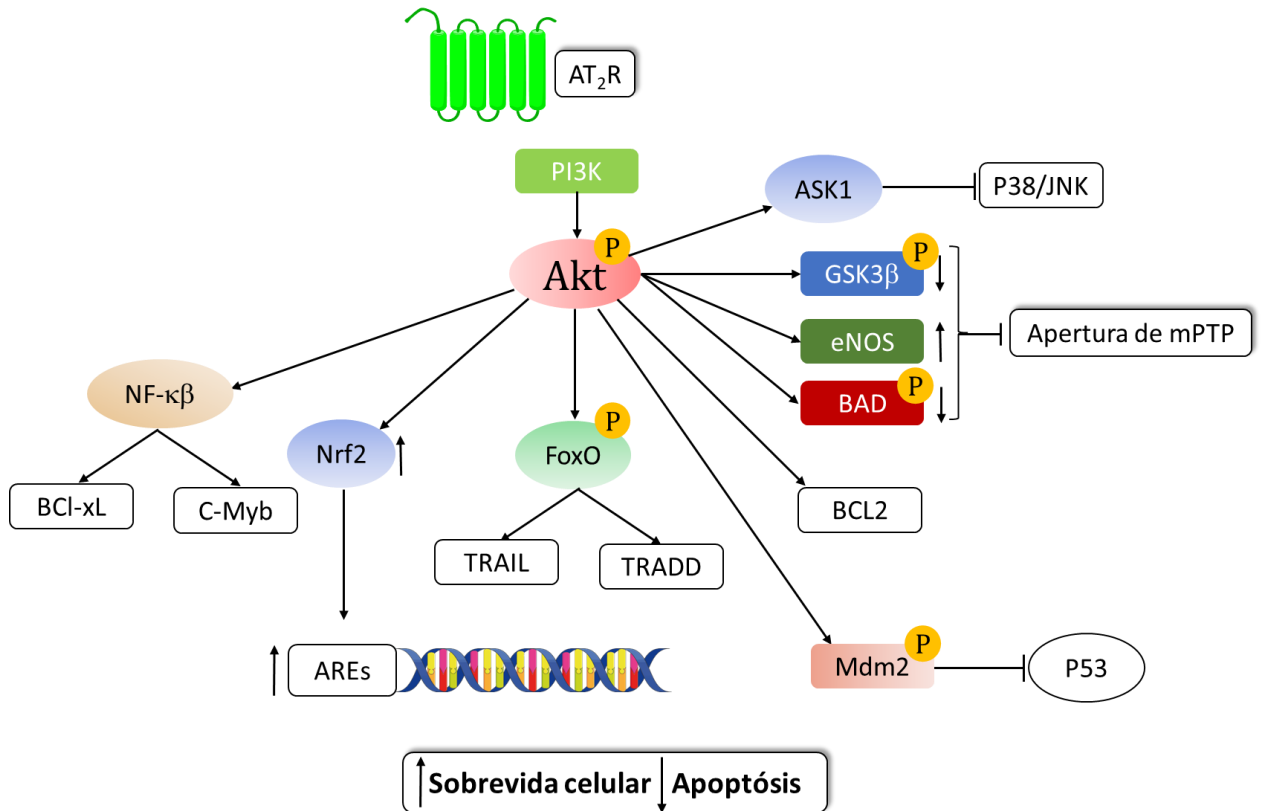


Figura 3. Vías de transducción de señales mediadas por el AT₂R. Hasta la fecha, los antecedentes sugieren que la administración de Ang-(1-9) tendría un efecto cardioprotector a través de la unión con el AT₂R. La formación de este complejo activa una cascada de señalización en la cual Akt corresponde un factor central para los procesos de supervivencia celular. Mediante la regulación positiva de factores antiapoptóticos (BCL-xL, BCL2, cMyb), elementos de respuesta a estrés oxidativo AREs (CAT, SOD, GSH-Px) y sobre factores que controlan el ciclo celular (p53).

1.10 Péptidos miméticos: nuevas estrategias para el desarrollo de fármacos

De acuerdo con lo descrito por Segura-Campos et al. (2010), el número de peptidasas presentes en el plasma constituyen un factor desfavorable para la estabilidad de los péptidos, reduciendo el tiempo de vida media al orden de 1 min [113]. Es así como surgen estrategias en función de aumentar la estabilidad de los péptidos frente a la degradación enzimática y mejorar la entrega de fármacos [114-119]. Una de ellas consiste en la unión de D-aminoácidos e invirtiendo el orden respecto de la secuencia original [115-118, 120, 121] (Figura 4). De esta forma, la orientación de las cadenas laterales es similar a la del péptido endógeno [122] (Figura 4). Este tipo de péptidos muestran una actividad equivalente al péptido L correspondiente, manteniéndose también el efecto farmacológico [123]. Previamente, Guichard et al. utilizaron péptidos miméticos de tipo *retroenantio* que simulan la estructura y respuesta antigénica del péptido L endógeno [124]. Más adelante, se mostró que los péptidos D pueden unirse con una alta afinidad a proteínas cuyo sustrato son moléculas formadas por L-aminoácidos [125]. Asimismo, la unión de D-aminoácidos confiere características que favorecen a la estabilidad de la molécula, siendo menos susceptibles a reacciones de proteólisis, tienen un tiempo efectivo más prolongado y tienden a tener una mayor biodisponibilidad [126]. Es así como la idea de generar un retroenantiómero de Ang-(1-9) toma lugar como una solución plausible.

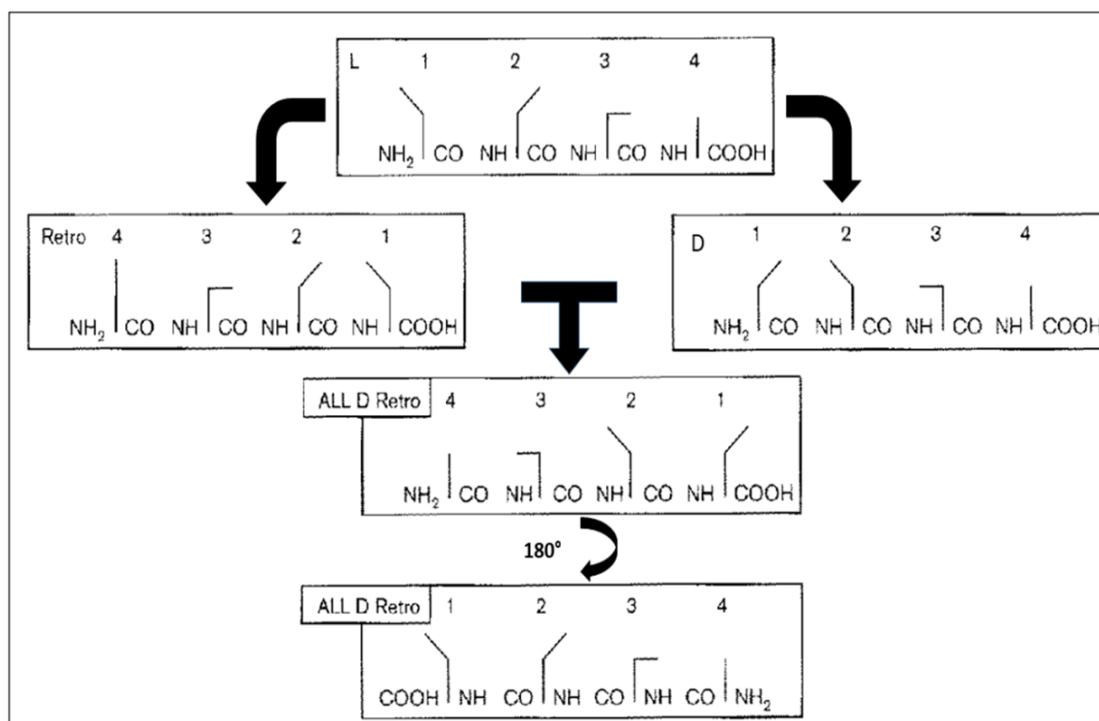


Figura 4. Esquema representativo de la metodología retroenantio para la síntesis de péptidos miméticos (Modificado de Van Regenmortel y Muller, 1998) [127]. El péptido “L” (panel superior) de un largo de 4 residuos numerados desde los extremos N-terminal a C-terminal, muestra la orientación de sus cadenas laterales representadas como líneas continuas. Para la obtención de un péptido *retroenantio*, es necesario combinar 2 estrategias. 1) la inversión de orden de los residuos, respecto del péptido original “Retro” (panel izquierdo). 2) Un cambio en la configuración de los residuos presentes en la molécula (panel derecho) a través de la unión de D-aminoácidos. Este péptido “D” corresponde a la imagen especular del péptido original, cambiando la orientación de las cadenas laterales. La combinación de estas 2 estrategias “ALL D Retro” (panel inferior) permitiría que la rotación de la molécula en 180° mantenga la orientación de las cadenas laterales respecto del péptido original.

1.11 Retroenantiómero de Ang-(1-9): D-Asp⁹-DArg⁸-DVal⁷-DTyr⁶-D-Ile⁵-DHis⁴-DPro³-D-Phe²-DHis¹

Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo, utilizando esta metodología, lograron sintetizar un péptido *retroenantio* Ang-(1-9) denominado **RE-Ang-(1-9)** (Figura 5), el cual tiene una estabilidad superior a 48 h en suero, mostrando también un efecto análogo al péptido endógeno en modelos de hipertrofia *in vitro* [165a] Además, la utilización de antagonistas selectivos del AT₂R bloquea el efecto antihipertrófico, sugiriendo que RE-Ang-(1-9) tiene las propiedades de un péptido-mimético que simularía el mecanismo de acción de Ang-(1-9) vía AT₂R. Más adelante, se observó en estudios en cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatas (NVRM) en un contexto de I/R simulada, que el tratamiento con RE-Ang-(1-9) protege a las células cardíacas de la necrosis de forma similar a lo descrito con Ang-(1-9) [165b]. Estos hallazgos sugieren un efecto cardioprotector *in vitro*, pero poco se sabe acerca de la relación estructura-actividad de RE-Ang-(1-9) sobre parámetros fisiológicos como el desarrollo de presión en el ventrículo izquierdo (LVDP), la presión de fin de diástole (LVEDP), y la cuantificación del tamaño de infarto en el tejido cardíaco. La utilización de un modelo que permita una comprensión más profunda de un evento de I/R global, proporcionaría información necesaria para desarrollo de una potencial intervención farmacológica y/o agentes terapéuticos para la cardiopatía isquémica. Es así como el sistema Langendorff representa una herramienta útil para este propósito [4]. Previamente, este sistema *ex vivo* ha sido utilizado para

demostrar la actividad de Ang-(1-9) [59]. Sin embargo, hasta la fecha no hay datos de la actividad de su análogo *retroenantio* en este modelo.

Como se mencionó previamente, pese a que AT₂R tiene una estructura cristalina resuelta, todavía se desconocen los cambios conformacionales que activan una respuesta diferencial entre Ang II y Ang-(1-9) cuya diferencia se debe únicamente un residuo de His en la porción C-terminal. Se desconoce también qué efecto tendría sobre la estructura del AT₂R, la unión de RE-Ang-(1-9). Por lo que, técnicas computacionales como el *docking* y dinámica molecular (MD) serían de gran ayuda para el diseño de fármacos basado en estructuras (SBDD) [128]. Las simulaciones de MD podrían mejorar los resultados de acoplamiento para las estructuras de cristal [128-130]. También se ha descrito que simulaciones de MD y de ajuste inducido incluso muestra un rendimiento similar al visto en evaluación de acoplamiento en estructuras de cristalizadas. Es por este motivo, que las herramientas predictivas utilizadas sistemas teóricos, presentan una alternativa favorable para el estudio de las interacciones de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) con el AT₂R.

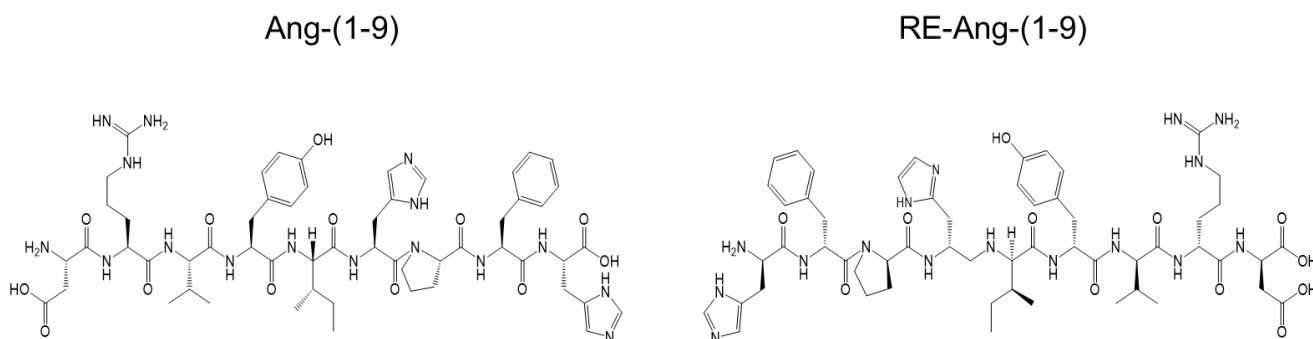


Figura 5. Estructuras de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9).

2. HIPÓTESIS

Las similitudes estructurales entre el péptido mimético *retroenantio* de angiotensina (1-9) y angiotensina (1-9), favorecen su interacción sobre el receptor AT₂ y su mecanismo farmacológico de cardioprotección.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación estructura actividad del péptido *retroenantio* de angiotensina (1-9) respecto de angiotensina (1-9) sobre el receptor AT₂ y su mecanismo farmacológico de cardioprotección.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.1 Comparar las características estructurales que diferencian al *retroenantio* de angiotensina (1-9) de la angiotensina (1-9).
- 4.2 Evaluar las interacciones entre el *retroenantio* de angiotensina (1-9) y angiotensina (1-9) con el receptor AT₂.
- 4.3 Investigar *ex vivo* la actividad cardioprotectora del *retroenantio* de angiotensina (1-9).

5. METODOLOGÍA

5.1 Animales

Todo el cuidado de los animales y los procedimientos experimentales cumplieron con la política del NIH sobre el cuidado humanitario y uso de animales de laboratorio y la guía ILAR para el mismo propósito [21]. El protocolo utilizado fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Chile (CBE-2018-08). Se utilizaron ratas adultas de 8-10 semanas *Sprague Dawley* macho de 250-300 g desde las instalaciones de criaderos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

5.2 Análisis *in silico* de las diferencias estructurales entre RE-Ang-(1-9) y Ang-(1-9) utilizando herramientas de dinámica molecular

Se modelaron los péptidos Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) a partir de sus secuencias aminoacídicas utilizando AMBER 18 [129]. Se utilizó la versión GPU pmemd implementado en AMBER, para llevar a cabo simulaciones de dinámica molecular. Se hidrataron ambos péptidos en una gota de agua. Se minimizó el sistema utilizando 5.000 pasos iniciales (método de máxima pendiente) y luego 5.000 pasos de gradiente conjugado [131] con un límite máximo de interacción de 10 Å. Se calentaron los sistemas en dos pasos secuenciales, el primero de 0 a 100 K en 5 ps usando el termostato Langevin, mientras que el segundo paso utilizó un rango de temperatura de 100 a 300 K en 200 ps, haciendo uso del método de acoplamiento de temperatura Berensden [132]. Para equilibrar estos

sistemas [131], se realizaron 2 pasos: un primer paso de 5 ns utilizando las condiciones NTP a 300 K, necesario para mantener las dimensiones y densidades de los sistemas. Durante esta etapa, se restringió los sistemas con una fuerza de $10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$. De esta forma, agua y iones se ajustaron a los péptidos. Se ejecutó un segundo paso 20 ns sin restricciones para permitir a los sistemas una relajación completa. Finalmente se llevó a cabo varias corridas de 100 ns para la recopilación de datos.

5.3 Análisis estructurales de Ang-(1-9) y RE (1-9) por medio de dicróismo circular

Para evaluar la estructura de los péptidos Ang-(1-9) y RE (1-9) mediante dicróismo circular, se llevó a cabo estrategias bien documentadas en las cuales se utilizó Ang II como modelo de estudio [133-135]. Los péptidos se sintetizaron en el laboratorio de la Dra. Eyleen Araya (UNAB). Ambos péptidos, disueltos en agua se analizaron en un rango de temperatura de 0 a 50°C utilizando un intervalo de λ 190 a 250 nm.

5.4 Análisis estructural de Ang-(1-9) y RE (1-9) mediante pruebas de resonancia magnética nuclear

La resolución de las posibles estructuras secundarias de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) se llevó a cabo procedimientos descritos para el análisis de la(s) conformación(es) de Ang II [136, 137] en colaboración con el Dr. Ernest Giralt (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, España). Se disolvieron

los péptidos en 20 mM de buffer 20 mM NaP, 0,01% NaN₃ pH 6,0. Se realizó el análisis por RMN utilizando una concentración de 2 mM de cada péptido en DSS y D₂O 10% en el equipo Bruker 800 MHz, a una temperatura de 25°C.

5.5 Armado del sistema para la ejecución de la dinámica molecular en los complejos formados con AT₁R y AT₂R

Las simulaciones se ejecutaron utilizando como referencia las estructuras cristalizadas de Ang II unido a los receptores AT₁ y AT₂ respectivamente (códigos PDB: 6OS0 y 6JOD). Luego, se removió el nanoanticuerpo co-cristalizado unido en ambas estructuras. Se modeló el péptido, Ang-(1-9) mediante la adición del residuo de His9 utilizando como molde la molécula de Ang II fijada en ambos cristales (todas las simulaciones fueron ejecutadas a partir de las coordenadas de Ang II en el sitio ortostérico del AT₁R y del AT₂R). Al igual que Ang-(1-9), se modeló RE-Ang-(1-9) mediante la adición de un residuo extra de histidina unido a Phe8, para luego invertir los extremos N-terminal y C-terminal de la molécula utilizando plataformas basadas en AMBER14 [138]. Se ejecutó cada condición de simulación realizando múltiples simulaciones independientes. Se asignaron las velocidades iniciales de manera aleatoria e independiente. Las cadenas laterales de los aminoácidos y *loops* faltantes se modelaron usando *Swiss-prot* [139]. Para las cadenas de los receptores, los grupos acetilos y metilos de carga neutra se cubrieron con un *cap* de N-terminal y C-terminal respectivamente. Se mantuvieron los residuos titulables en su protonación dominante a pH 7, exceptuando Asp^{2.50} que fue protonado (carga neutra) en todas las simulaciones,

de acuerdo con los datos reportados que indican que esta protonación se encuentra conservada en el estado activo de los GPCRs [140]. El residuo de Asp^{3.49}, el cual se encuentra cercano a grupos cargados (ej. Arg^{3.50} y Arg^{34.54} este último, forma parte del segmento intracelular 2) se mantuvo neutro, debido a que simulaciones previas mostraron resultados similares entre el estado neutro y cargado de este residuo [76]. Se asignó a los residuos de His una carga neutra con un átomo de hidrógeno unido al nitrógeno épsilon o delta dependiendo del estado tautomérico optimizado por la red de puentes de hidrógeno local. Se utilizó CHARMM-GUI [130, 141, 142] para la inserción de los complejos Ang-(1-9)-AT₁R, Ang-(1-9)-AT₂R, RE-Ang-(1-9)-AT₁R, y RE-Ang-(1-9)-AT₂R en la membrana. La membrana se situó, en el plano X-Y posicionando los fosfolípidos de forma perpendicular al eje Z. La solvatación del sistema se realizó usando un espesor de 17,5 Å en el límite superior e inferior. Se agregó los iones de Na⁺ y Cl⁻ simulando una concentración de 0,15 M [143].

5.6 Protocolo de simulación de los complejos formados con el AT₁R y el AT₂R

Todos los sistemas fueron calentados sobre 125 ps desde 0 K a 100 K en el ensamble NTV usando el termostato de Langevin con las restricciones armónicas de $10,0 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ en los átomos que no son de hidrógeno en lípidos, proteínas y el ligando. El muestreo de las velocidades iniciales se realizó utilizando una distribución de Boltzmann. Posteriormente, se calentó los sistemas a 310 K y 1 bar en el ensamble NPT, las restricciones armónicas en proteínas,

péptidos y átomos que no son de hidrógeno. Se elevó la temperatura de los sistemas a 310 K por 125 ps en el ensamble NTP mientras que el equilibrado del sistema se realizó a 310 K y 1 bar en el ensamble NTP con las constantes armónicas en las proteínas, péptidos y átomos que no son de hidrógeno disminuyendo $1,0 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$ comenzando por $5,0 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$ por cada 2 ns durante 10 ns y finalmente $0,1 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$ por cada 2 ns durante 18 ns adicionales. Exceptuando las simulaciones contenidas en el espacio intracelular, se removió todas las restricciones durante la producción de la simulación. La producción de las simulaciones se realizó a 310 K y 1 bar en el ensamble NTP usando el termostato de Langevin en conjunto con el baróstato de Montecarlo. En las simulaciones se utilizó un *time-step* de 4.0 fs mientras la masa de los átomos de hidrógeno era distribuida [144]. Se restringió la distancia de los enlaces usando SHAKE. Sobre las interacciones no enlazantes se aplicó un corte de 9 Å calculando las interacciones electrostáticas de largo alcance con el método PME (*particle-mesh Ewald*) con un coeficiente de Ewald (β) de 0.31 Å y una interpolación de *B-spline* de orden 4. El tamaño de la cuadrícula se definió de acuerdo con un tamaño del ancho de la celda (1 Å). Se utilizó el ff19SB de AMBER para proteínas y moléculas, el parámetro de LIPID17 se empleó para lípidos y iones y TIP3P para el agua. Se realizaron las simulaciones del AT₁R y del AT₂R usando la versión CUDA (*Compute Unified Device Architecture*) de PMEMD en AMBER14 [138]. El registro de las trayectorias se guardó cada 500

ps. Usando el paquete de AMBERTools18 CPPTRAJ y VMD [138, 145] para la visualización y análisis de los resultados.

5.7 I/R en modelos *ex vivo*: Sistema de retroperfusión Langendorff

El efecto cardioprotector de RE-angiotensina-(1-9), c-Ang-(1-9) y c-RE-Ang-(1-9) se evaluó en corazones aislados en ratas macho adultas *Sprague-Dawley* de acuerdo con lo descrito por Mendoza-Torres *et al.*, 2018 [59]. Brevemente, se anestesió a los animales administrando pentobarbital vía intraperitoneal (80 mg/kg). Posteriormente, para la remoción del corazón se inyectó 100 U/kg de heparina en la aurícula derecha. Luego de la remoción, se perfundieron los corazones a través de la aorta utilizando la solución de Krebs-Henseleit (KH) pH 7,4 (NaCl: 128 mM; KCl: 4,7 mM; CaCl₂: 1,35 mM; MgSO₄: 1,1 mM; NaH₂PO₄: 0,4 mM y C₆H₁₂O₆: 11,1 mM) equilibrado con una mezcla de gases (95% O₂ y 5% CO₂ a 37°C) utilizando una bomba peristáltica (Gilson Miniplus 3, Francia). En la aurícula izquierda y en la válvula mitral se instaló un globo de látex conectado a un transductor de presión. Este globo se llenó con solución salina para determinar la presión intraventricular isovolumétrica. Se utilizó un flujo de perfusión de 10-14 mL/min. Se estimuló los corazones en un rango de 240-300 latidos/min con electrodos de platino utilizando un estimulador Grass (pulsos de 5 V, 1ms). El seguimiento de los parámetros cardiacos se realizó con transductores de presión: desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (LVDP); presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo (LVEDP:

fijado en 5-10 mmHg al comienzo de todos los experimentos) y la tasa máxima de aumento de presión en el ventrículo izquierdo (+dP/dt). Al cabo de 20 min de estabilización, se preconditionaron los corazones perfundiendo los péptidos a una concentración de 1,5 nM para RE-Ang-(1-9) y 50 nM de los péptidos cíclicos (c-Ang-(1-9) y c-RE-Ang-(1-9)) por 10 min para luego ser sometidos por 30 min en condiciones de isquemia global al detener la bomba peristáltica, seguido de 60 min de reperfusión.

5.8 Medición del tamaño de infarto

El tamaño del infarto se midió por medio de la tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC). Procedimiento descrito por Riquelme *et al.*, 2016 [146]. Finalizado el tiempo de reperfusión, los corazones se perfundieron con una solución de TTC al 1 % y se congelaron a -20 °C durante 1 h. Posteriormente, se cortó los corazones en seis rebanadas para luego ser almacenados con una solución de formaldehído al 10% durante 48 h. Finalmente se determinó el área del infarto usando el *software ImageJ*.

5.9 Análisis estadísticos

Los resultados son muestran como la media \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Se analizó los datos utilizando Kruskal Wallis para comparaciones múltiples seguido de la prueba de Dunn. Se consideró el valor de alfa menor a 0,05 para establecer la significancia estadística como describió anteriormente [59, 146].

6. RESULTADOS

6.1 Estructura secundaria de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9)

Los resultados de dinámica molecular para los péptidos en agua (solvente implícito) muestran conformaciones no definidas en ambos casos (**Figura 6A**). Tanto Ang-(1-9) como RE-Ang-(1-9) exhiben una estructura flexible, la cual no cambia significativamente respecto de la estructura inicial en cada uno de los péptidos. El registro de la desviación cuadrática media entre las posiciones atómicas (RMSD) muestra la distancia promedio entre los átomos que conforman los péptidos Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) respectivamente, cuyas fluctuaciones varían en un margen de 2-3 Å para Ang II y Ang-(1-9) mientras que para RE-Ang-(1-9) las fluctuaciones observadas fueron de 1-2 Å, advirtiendo que en los sistemas simulados no se distinguen diferencias relativas a la conformación del *backbone* en ambas moléculas. Los péptidos no exhiben una conformación estable o prevalente a lo largo del tiempo de simulación. Se contrastaron estos datos con las simulaciones efectuadas por el grupo de investigación del Dr. Ernest Giralt (Instituto para la investigación en Biomedicina, Barcelona) mediante REMD (*Replica Exchange Molecular Dynamics*) obteniendo resultados similares (**Figura 6B**). En conjunto, la información que proveen los sistemas *in silico* estudiados, da cuenta de potenciales estructuras de tipo *random coil* para Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9).

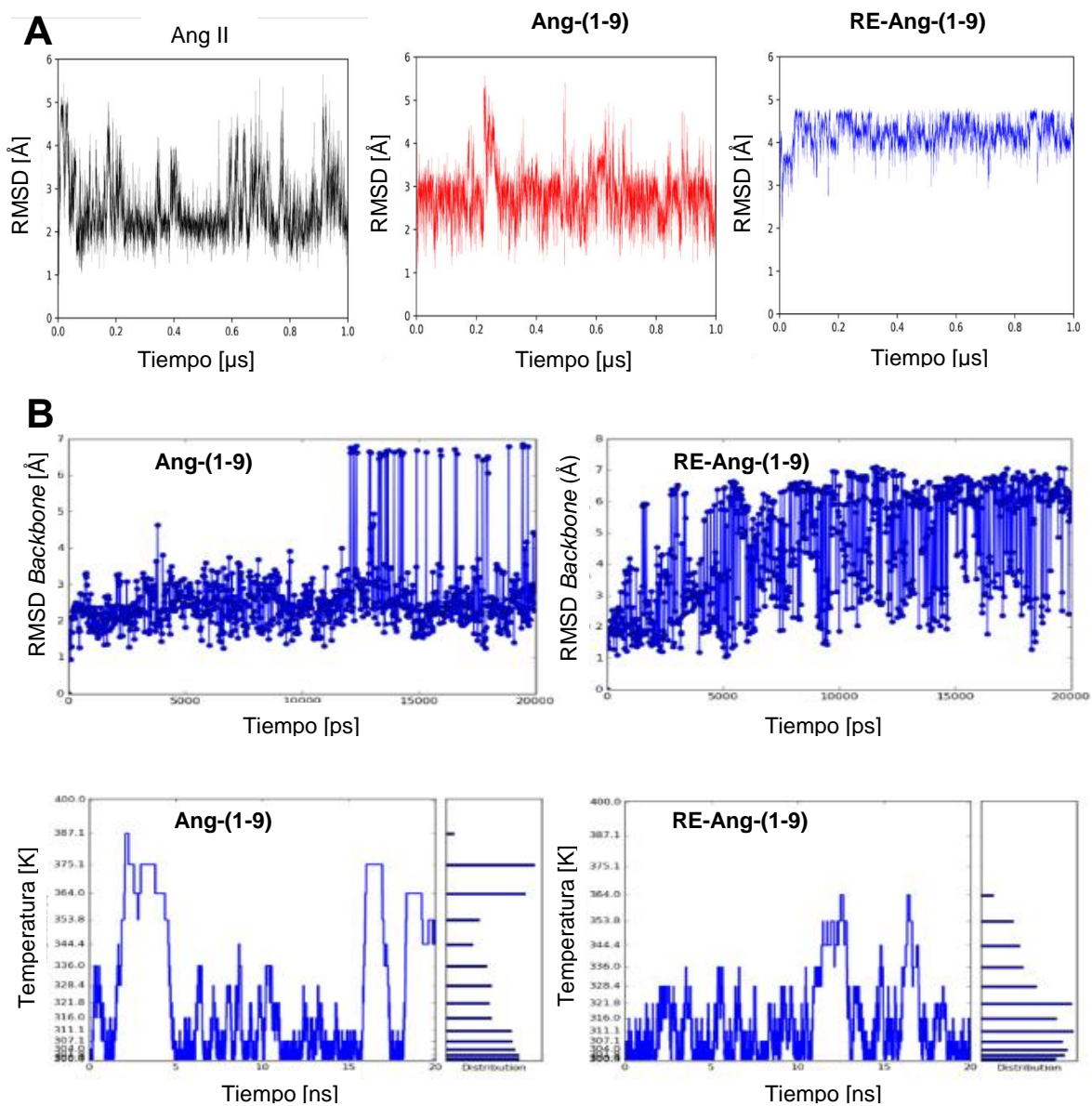


Figura 6. Dinámica Molecular de Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9). A. Grafica de RMSD vs tiempo de la dinámica molecular (MD) de los péptidos Ang II (izquierda); Ang-(1-9) (centro); RE-Ang-(1-9) (derecha) en solvente implícito. Los resultados sugieren que todos los péptidos estudiados mostraron conformaciones aleatorias a lo largo del tiempo de simulación (1μs). B. REMD utilizando los péptidos Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9).

Desde los datos de REMD, se desprenden algunas pistas sobre las potenciales conformaciones que adoptaría Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9). Para ello, se identificó para Ang-(1-9) 2 conformaciones de interés cuya prevalencia corresponde al 67 y 20% respectivamente (**Figura 7, 9D**). Se realizó un análisis individual de los aminoácidos del *backbone* de la molécula. Se observó los ángulos de torsión ψ y ϕ para los residuos Arg2, Val3, Ile5, His6 y Phe8 los cuales se encontraron principalmente agrupados en el cuadrante superior izquierdo de la gráfica, área descrita para estructuras de tipo β (*extended β -strand like*) [147, 148]. Val3 presentó 2 poblaciones mayoritarias, estas forman 2 clústeres agrupados en una conformación β y una conformación de α hélice dextrógira. Tyr4 presentó 2 poblaciones preponderantes agrupadas en conformaciones de tipo α hélice dextrógira y levógira respectivamente. Ile5 presentó 2 poblaciones mayoritarias agrupadas en regiones β -*strand* y α hélice dextrógira. En contraste, de acuerdo con los datos reunidos de REMD el péptido RE-Ang-(1-9) presentó 2 estructuras de interés, cuya prevalencia corresponde al 55 y 24% respectivamente (**Figura 7, 9D**) La gráfica de Ramachandran para el *retroinverso* de Ang-(1-9) mostraron un patrón similar al ligando endógeno. Así, considerando que la configuración de los residuos que conforman el péptido D corresponde a la imagen especular de los aminoácidos L, se observó que residuos D-Phe2 tendrían principalmente una conformación β -*strand* (**Figura 7**). Por otra parte, D-His4 presentó 2 poblaciones, una de ellas agrupada hacia la formación de estructuras β mientras que la otra

se concentra en una región no permitida del diagrama. Similar a lo observado en Ile5 del ligando endógeno para D-Ile5, las principales densidades identificadas corresponden 2 poblaciones fluctúan entre regiones β -strand y α hélice dextrógira. Por otra parte, para D-Tyr6 exhibió una mayor densidad en regiones del gráfico correspondientes a conformaciones β al igual que D-Val7 y D-Phe8. Estos resultados sugieren que tanto Ang-(1-9) como RE-Ang-(1-9) tendrían preferentemente una conformación extendida que podrían ser flexibles.

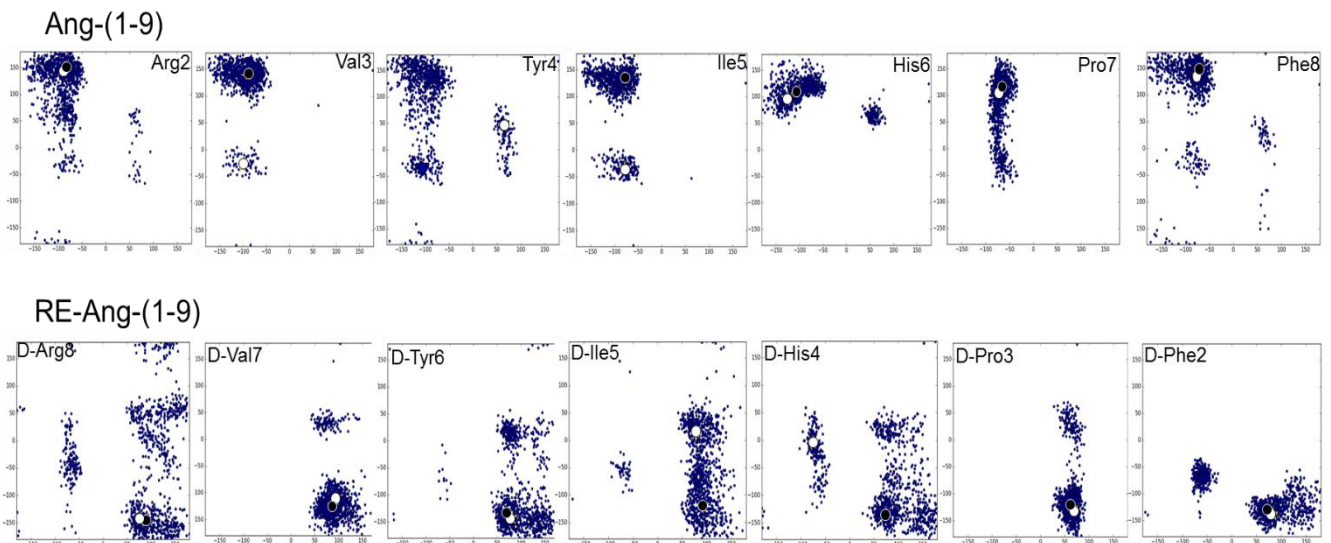


Figura 7. Gráfica de Ramachandran para los residuos que conforman el backbone de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9). Se identifica los ángulos de torsión ψ y ϕ para los residuos individuales que conforman el backbone de ambos péptidos. Se destacan mediante círculos blancos y negros las poblaciones de interés.

Posteriormente, se realizó un primer acercamiento experimental para determinar posibles conformaciones adoptadas por Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) a nivel global, evaluando ambos péptidos mediante dicroísmo circular (CD), en una solución de PBS 20 mM pH 6,0 en presencia o ausencia de trifluoroetanol (TFE) (30% v/v) el cual estabiliza la formación de estructuras secundarias en péptidos [149]. Los resultados para Ang-(1-9) muestran una banda con un mínimo registrado a 205 nm y un ligero hombro a 220 nm (**Figura 8A**). Luego de la adición de TFE, se observó un corrimiento hacia longitudes de onda más bajas, este espectro sugiere un bajo contenido de estructuras secundarias, exhibiendo una conformación aleatoria. RE-Ang-(1-9) mostró espectros de dicroísmo circular característicos de un péptido D [150], con un máximo a 205 nm (**Figura 8B**) y tras la adición de TFE, los valores de elipticidad molar cambiaron a 205 y 218 nm. Estos resultados no muestran una tendencia por parte de los péptidos estudiados a formar estructuras secundarias definidas en solución acuosa.

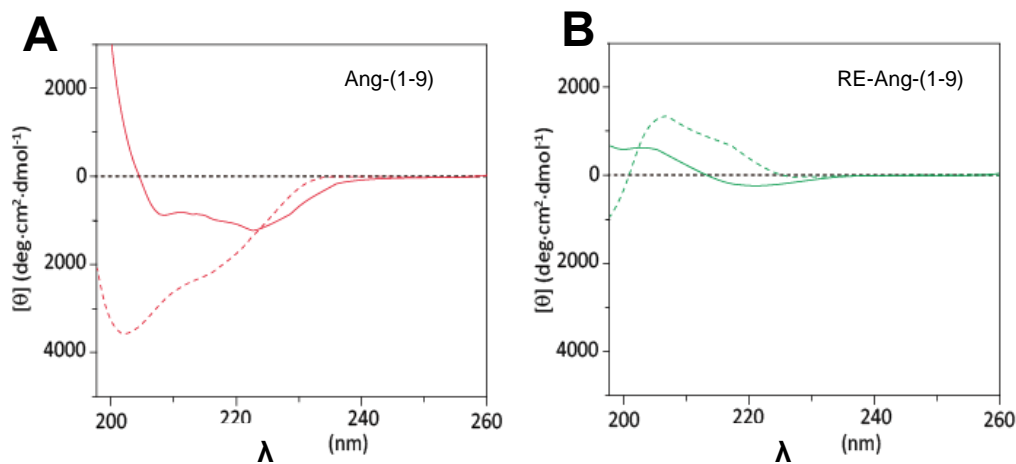


Figura 8. Espectros de dicroísmo circular de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9). A. Espectros de CD de Ang-(1-9) (rojo) en 20 mM de PBS pH 6 (línea continua) y

suplementado con trifluoroetanol (TFE) al 30 % (v/v) (línea discontinua). **B.** Espectros de dicroísmo circular de RE-Ang-(1-9) (verde) 20 mM de PBS pH 6 (línea continua) y suplementado con TFE al 30% (línea discontinua). Los espectros se registraron a 20°C y se normalizaron como elipticidad residual media $[\theta]$.

Estos resultados se correlacionaron más adelante por medio de RMN. Se obtuvo información estructural con resolución de un solo residuo en Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) mediante la combinación de técnicas espectroscópicas de 2 dimensiones: TOCSY, ROESY y abundancia natural ^1H ^{13}C HSQC. Se trató ambos péptidos en ausencia y en presencia de TFE al 30 % (**Figura 10A**). Se evaluaron los desplazamientos químicos de H_α y C_α , los valores del coeficiente de temperatura de los protones NH de amida, las constantes de acoplamiento de ($^3\text{JNHH}_\alpha$) y las conectividades de ROE. El análisis de desplazamiento químico secundario utilizando resonancias H_α , C_α y C_β ($\Delta\text{C}_\alpha - \Delta\text{C}_\beta$) indica que los péptidos Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) no muestran un orden definido (**Figura 10A**) existiendo un patrón similar entre ambos péptidos. Se determinó la constante de acoplamiento para los residuos que conforman ambos péptidos (**Figura 9**). Se obtuvo que para Ang-(1-9) a excepción del residuo Val3, valor de $^3\text{J}_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ varía en un rango de 6-7 Hz. Esta tendencia también se observó para RE-Ang-(1-9). El residuo D-Val7 registra un valor de $^3\text{JNHH}_\alpha$ de 8,56 Hz, mientras que para el resto de los residuos esta constante oscila entre los 6-7 Hz. Estos valores se encuentran dentro del rango esperado para conformaciones de tipo *random coil*.

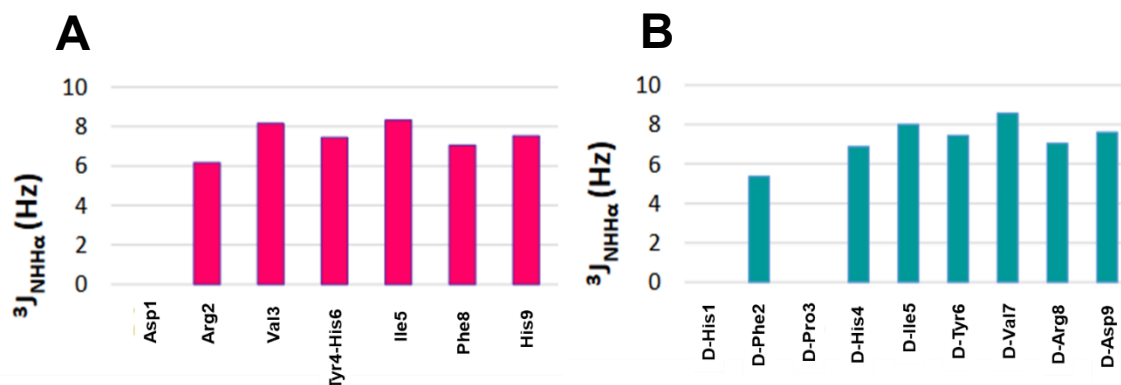


Figura 9. Constantes de acoplamiento $^3J_{\text{NHH}\alpha}$ determinada para los residuos de Ang-(1-9) y RE (1-9). A. Constante de acoplamiento de los residuos de Ang-(1-9) B. Constante de acoplamiento de los residuos de RE-Ang-(1-9). $^3J_{\text{NHH}\alpha} > 8$ Hz estructura tipo β ; $^3J_{\text{NHH}\alpha} < 4$ Hz estructura α hélice; $^3J_{\text{NHH}\alpha} \sim 6-7$ Hz random coil (r.c.)

Además, la ausencia de conectividades no secuenciales entre residuos en los espectros ROESY 2D de ambos péptidos sugiere que estos no adoptan una estructura secundaria estable en una solución acuosa. En los espectros ROESY 2D de ambos péptidos, no se observan ROEs de rango medio o largo resueltos, y solo se pueden identificar picos cruzados de ROE intra y secuenciales (d_{NN} y $d_{\alpha\text{N}}$ (i, i+1)) (Figura 10C), lo que apunta fuertemente a la falta de cualquier estructura secundaria estable en solución acuosa. La presencia de TFE no parece aumentar la estructura secundaria de Ang-(1-9) ya que solo se observan pequeños cambios de desplazamiento químico en presencia de 30% de TFE. Sin embargo, se observa una desviación negativa de los desplazamientos químicos del ^{13}C (ΔC_{α} y $\Delta C_{\alpha} - \Delta C_{\beta}$) en los residuos Val3-Ile5, lo que sugiere que este motivo puede adoptar transitoriamente una conformación de giro β . Se observan resultados similares para el péptido RE-Ang-(1-9) en presencia de TFE al 30%.

Sólo los desplazamientos químicos secundarios de ^{13}C del motivo D-Ile5-D-Val7 mostraron una desviación negativa sistemática de estos valores. Lo que sugiere que este motivo puede adoptar transitoriamente una conformación de giro β en un péptido flexible (**Figura 10B, 10D**). Estos resultados sugieren que tanto Ang-(1-9) como el péptido *retroenantio* RE-Ang-(1-9) poseen una estructura flexible y no definida. Paralelamente, por medio de los datos de REMD se observó la presencia de un *cluster* de moléculas que gráficamente poseen características estructurales encontradas mediante los experimentos de RMN y coexistirían en solución acuosa. Una de ellas corresponde a una conformación similar a la de una horquilla la cual se encuentra estabilizada por un giro- β comprendido entre los residuos Tyr4-Ile5 de Ang-(1-9) (**Figura 10D**). Esta estructura se puede observar en RE-Ang-(1-9) debido a la orientación de la D-Pro presente.

Aparentemente, se producirían interacciones intramoleculares que podrían estabilizar esta conformación.

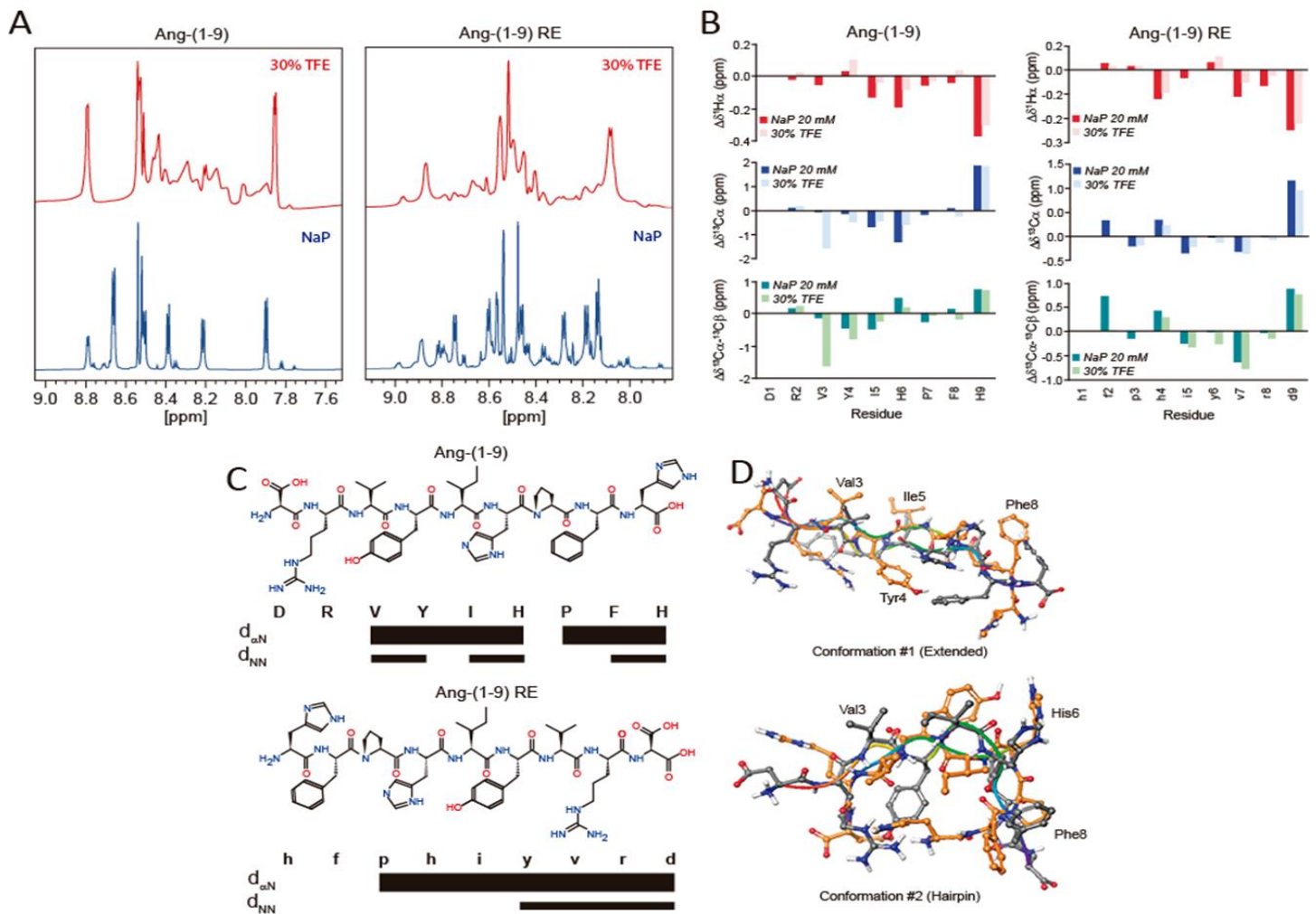


Figura 10. Análisis estructural de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) por medio de RMN y REMD. A. Espectros de RMN de Ang-(1-9) (panel izquierdo) y RE-Ang-(1-9) (panel derecho) en buffer fosfato de sodio (NaP) (20 mM, pH 6,0) (línea azul) o en presencia de 30% TFE (línea roja). **B.** Desviaciones de desplazamiento químico de los valores de resonancia *random coil* para $^1H_\alpha$; $^{13}C_\alpha$ y $^{13}C_\alpha-C\beta$ de los péptidos Ang-(1-9) (panel izquierdo) y RE-Ang-(1-9) (panel derecho) en buffer fosfato de sodio (colores claros) o en presencia de TFE al 30% (colores oscuros). **C.** Resumen de las conectividades de ROE observadas para los péptidos Ang-(1-9) (panel superior) y RE-Ang-(1-9) (panel inferior) en buffer fosfato de sodio

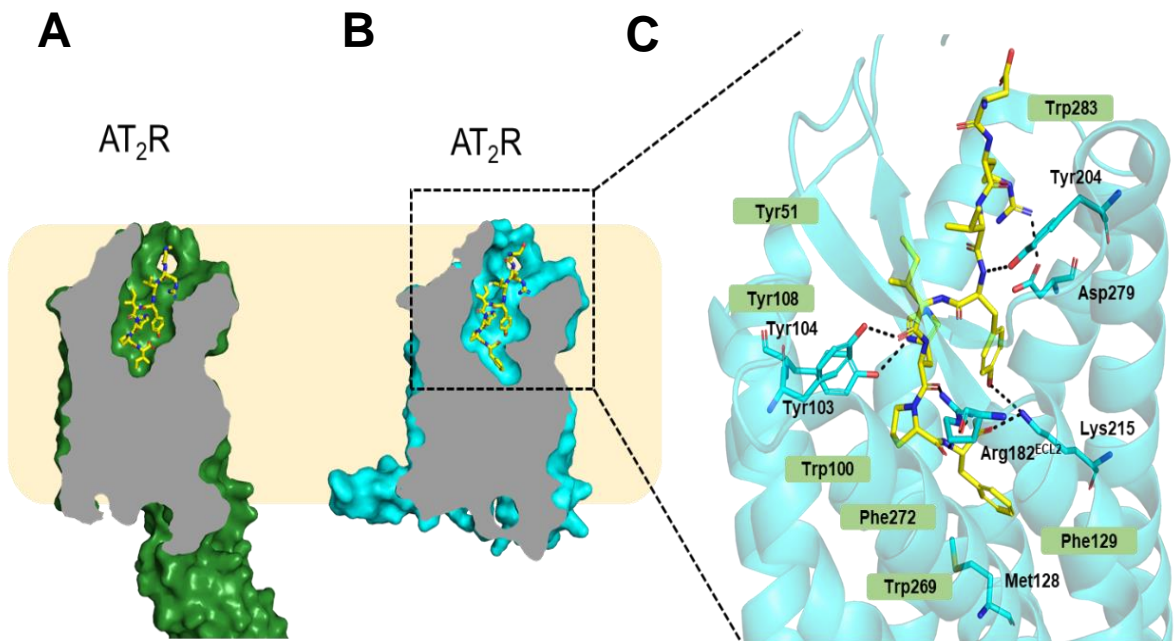
(20 mM, pH 6,0). El grosor de la barra indica la fuerza del ROE (media o fuerte). **D.** Caracterización estructural de Ang-(1-9) y RE-Ang (1-9), mostrando dos clústeres obtenidos por medio de REMD con su conformación extendida (panel superior) y horquilla (panel inferior). En ambos casos, Ang-(1-9) (gris) y RE-Ang-(1-9) (naranja) mostraron un alto grado de superposición estructural (valores RMSD de 1.9 y 3.7 Å para las conformaciones extendidas y en horquilla respectivamente).

Dadas las características conformacionales y estructurales entre ambos péptidos, es posible suponer que el posicionamiento del ligando pueda adquirir cierto grado de orden dentro del bolsillo del receptor AT₂. Para ello se realizó el armado de modelos teóricos simulando un sistema lo suficientemente robusto que pueda predecir las interacciones ligando-receptor entre Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) en el sitio ortostérico del AT₂R. Se iniciaron las simulaciones teniendo como punto de referencia estudios cristalográficos previos [72, 75].

6.2 Complejo Ang II-AT₂R

Luego de la construcción del modelo de AT₂R unido a Ang II, se refinó el sistema *ab initio* utilizando como herramienta la plataforma de *flexpepdock* basada en AMBER. El modelo obtenido cumple con las coordenadas entregadas previamente [75]. De este modo, se encontró que el esqueleto de la molécula se encuentra orientado de manera similar a la estructura cristalizada, es decir, Ang II se encuentra de forma extendida dentro del bolsillo del receptor con su extremo N-terminal hacia el espacio extracelular, mientras que el extremo C-terminal se ubica hacia el fondo del bolsillo del receptor (**Figura 11**). Al observar las interacciones entre Ang II y el sitio ortostérico de AT₂R, se registró la aparición

de un puente salino entre la cadena lateral de Arg2 del péptido con los residuos Asp279^{6.58} y Asp297^{7.32} ubicados en el bolsillo del receptor. Asimismo, es posible observar la aparición de otro puente salino entre el extremo C-terminal de Phe8 y Lys215^{5.42}. Por otra parte, se registró interacciones de tipo puente de hidrógeno entre el *backbone* de Ang II y Arg182^{ECL2}. Del mismo modo, el *backbone* de Ang II se encuentra inicialmente cercano a la cadena lateral de Tyr103^{2.63} formando un puente de hidrógeno. Más adelante, se ejecutó la dinámica molecular para el complejo AT₂R-Ang II (**Figura 11C, 14D**). El tiempo de duración de la dinámica fue de 3 μ s para todos los complejos estudiados. El complejo AT₂R-Ang II no muestra diferencias significativas respecto de lo observado desde la estructura cristalizada al finalizar la dinámica, siendo este un antecedente necesario para validar la estrategia utilizada. Las interacciones observadas, se corresponden íntegramente con las reportadas por Asada *et al.*, 2020 [75] y la orientación de las cadenas laterales del péptido se mantienen invariables a excepción de His6, la cual rota hacia el fondo del bolsillo formando un puente de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Lys215^{5.42}. Adicionalmente, la ubicación del residuo Phe8 del péptido orienta el extremo C-terminal de tal manera que se puede detectar una interacción de tipo puente salino no sólo con Lys215^{5.42} sino que también con la cadena lateral de Arg182^{ECL2}.



Asada *et al.*, 2020

Figura 11. Dinámica molecular del complejo Ang II-AT₂R. **A.** Estructura cristalográfica del complejo reportado por Asada *et al.*, 2020. **B.** Modelo creado a partir de los cálculos obtenidos de dinámica molecular. El sistema simulado por 3 μ s, mantiene posiciones similares a las de los estudios cristalográficos. **C.** Interacciones observadas entre Ang II y el sitio ortostérico de AT₂R. Se destacan en la línea punteada, los contactos polares entre los residuos del ligando y el dominio de unión a ligando del receptor.

6.3 Complejo Ang-(1-9)-AT₂R

Habiendo validado el sistema teórico anterior con los resultados cristalográficos publicados, se procedió a construir *in silico* el modelo del AT₂R unido a Ang-(1-9). Considerando las similitudes estructurales entre Ang II y Ang-(1-9), el complejo Ang II-AT₂R, se utilizó como modelo para integrar a Ang-(1-9) en el bolsillo del receptor (**Figura 12**). Luego de refinar la estructura de inicio, se obtuvo que el esqueleto de Ang-(1-9) adopta una conformación extendida en el

sitio ortostérico del AT₂R. A lo largo de la dinámica, la disposición espacial de Ang-(1-9) dentro del bolsillo del AT₂R se mantiene durante el 56.67% del tiempo de simulación (**Figura 12A**) sin embargo las variaciones observadas en el RMSD son inferiores a 0,5 Å. La superposición de los ligandos Ang II y Ang-(1-9) mostró ligeras diferencias respecto de la posición de las cadenas laterales (**Figura 12B**). Evidentemente, His9 constituye la diferencia más notoria entre los 2 péptidos. No obstante, la estructura flexible de Ang-(1-9), mantiene las interacciones reportadas para Ang II: Asp279^{6.58}, Asp297^{7.32}, Lys215^{5.42} y Arg182^{ECL2} adoptando una forma de “C” con la cadena lateral de His9 orientada hacia la porción superior del bolsillo, mientras que la cadena lateral de Tyr4 se posiciona apuntando hacia el fondo del sitio (**Figura 12C, 14E**). La conformación encontrada al finalizar el tiempo de simulación advierte algunos cambios respecto de la postura inicial de Ang-(1-9) dentro del receptor. El péptido mantiene los residuos 4-9 (⁴Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His⁹) dentro del sitio ortostérico, dejando los 3 primeros residuos (Asp1, Arg2 y Val3) en el espacio extracelular. La conformación que adopta Ang-(1-9) no constituye a un factor relevante para la pérdida de las interacciones reportadas en la estructura de inicio mencionadas anteriormente. Sin embargo, la torsión adquirida por el *backbone* de Ang-(1-9), permitiría la formación de otras interacciones polares producidas con otros residuos del receptor. De esta manera, se observó que la cadena lateral de Tyr4 forma un puente de hidrógeno con Thr276^{6.55}. Este mismo tipo de interacción se observó entre la cadena lateral de His9 y el residuo Ser208^{5.35} de AT₂R. Del

mismo modo, se registró a lo largo de la dinámica molecular, la formación de 2 interacciones con el *loop* extracelular 2 (ECL2) Tyr189 y Pro201 formado puentes de hidrógeno con la cadena lateral de His6 y el *backbone* de Asp1 respectivamente (**Figura 12C**)

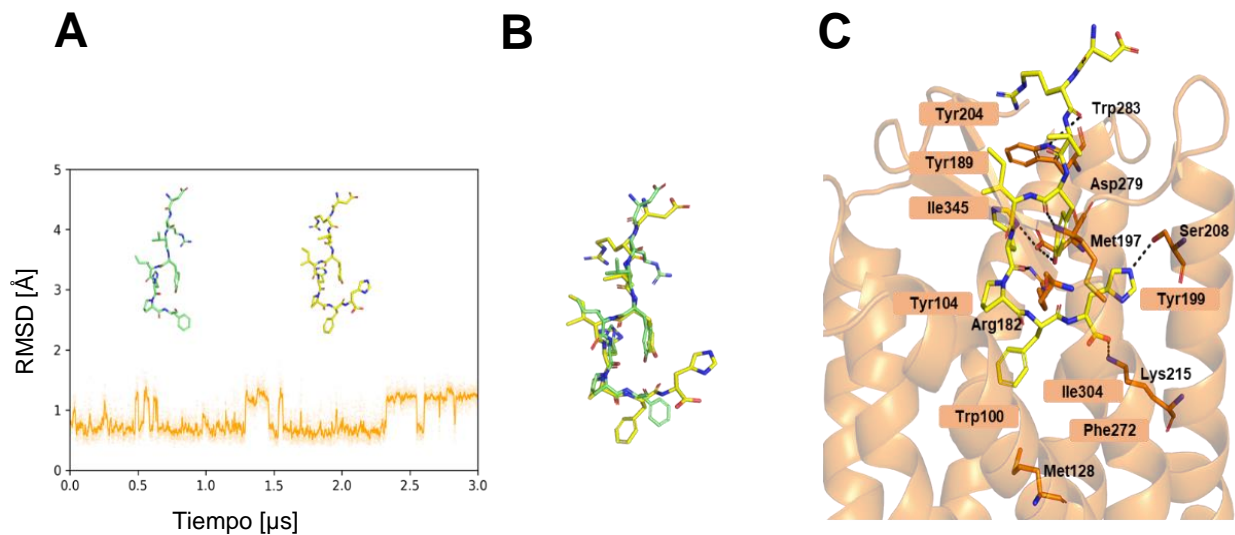


Figura 12. Dinámica molecular del complejo Ang-(1-9)-AT₂R. **A.** Gráfica RMSD vs tiempo de Ang-(1-9) dentro del bolsillo de AT₂R. Además, se muestran las diferencias entre las posturas que adoptan Ang II (verde) y Ang-(1-9) (amarillo) las cuales se superponen en el panel central (B). **B.** Superposición de los péptidos Ang II (verde) y Ang-(1-9) (amarillo). Se muestran diferencias en la orientación de las cadenas laterales. **C.** Interacciones observadas entre Ang-(1-9) y el sitio ortostérico de AT₂R. Se destacan en la línea punteada, los contactos polares entre los residuos del ligando y el dominio de unión a ligando del receptor.

6.4 Complejo RE-Ang-(1-9)-AT₂R

Utilizando los parámetros obtenidos con el modelo Ang-(1-9)-AT₂R, se insertó el péptido RE-Ang-(1-9) en el sitio ortostérico de AT₂R. Así, la conformación inicial de RE-Ang-(1-9) se encuentra extendida. Debido a las similitudes estructurales entre RE-Ang-(1-9) y el ligando endógeno, era esperable que el *retroenantio* de

Ang-(1-9) adoptara una disposición espacial similar, conservando las interacciones críticas observadas en el complejo Ang-(1-9)-AT₂R, las cuales se encuentran invariables en el complejo Ang II-AT₂R de acuerdo con los resultados cristalográficos. Sin embargo, durante la dinámica molecular se observó un cambio significativo en la estructura de RE-Ang-(1-9) dentro del bolsillo, cuya conformación se mantiene estable en un promedio de 91,77% del tiempo de simulación (**Figura 13A**). El ligando presenta interacciones intramoleculares que originan una conformación cerrada. En esta estructura, se forma un puente salino entre los extremos N-terminal y C-terminal, similar a la de una estructura cíclica (**Figura 13A-B, Figura 14F**). La torsión originada dentro de la molécula favorece otras interacciones que refuerzan el ciclo. Cabe destacar que las simulaciones muestran que estas interacciones se dan entre átomos que forman parte del *backbone* de la molécula dejando las cadenas laterales expuestas, de este modo, algunas de las interacciones intermoleculares entre los residuos del sitio ortostérico de AT₂R con los de RE-Ang-(1-9) se mantienen respecto del modelo ligando-receptor generado entre Ang-(1-9) y AT₂R. El péptido *retroenantio* no sólo adopta una conformación cerrada que se aleja del fondo del sitio ortostérico de AT₂R, sino que favorece la interacción con otros residuos dentro del bolsillo (**Figura 13C**). En el análisis efectuado destaca la formación de contactos polares entre 2 residuos que forman parte del *loop* extracelular 1 (ECL1) en este caso, parte de la cadena lateral y *backbone* de los residuos Trp110 y Tyr108 respectivamente, los cuales interactúan con la cadena lateral D-Tyr5 y el

backbone de dHis4. Por otra parte, se identificó una tercera interacción entre la cadena lateral del residuo Trp100^{2,60} y parte del *backbone* de D-Pro3.

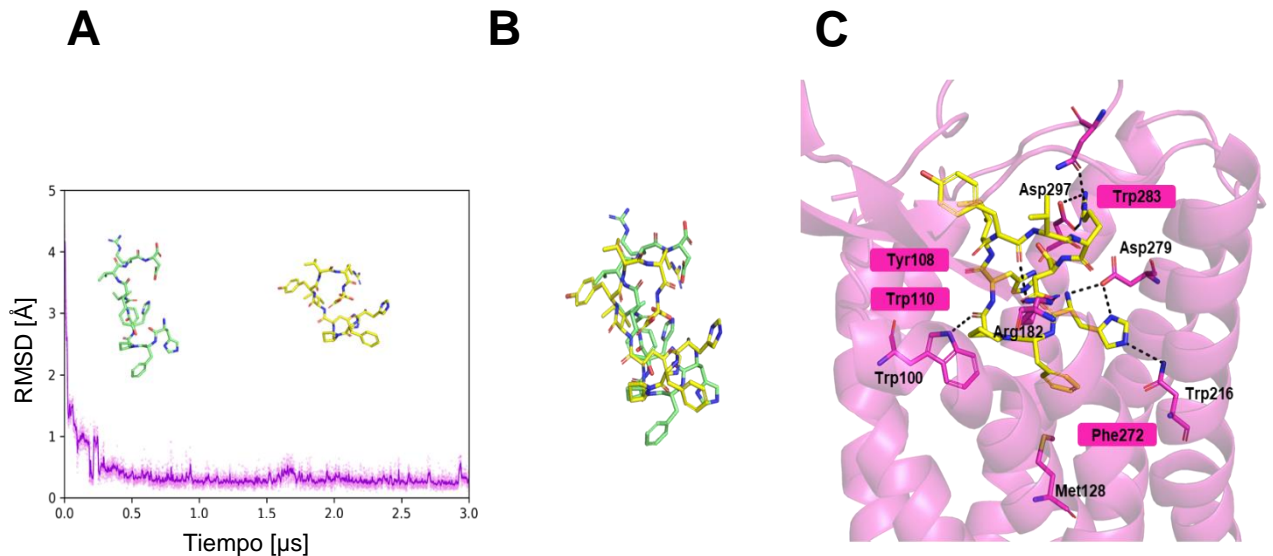
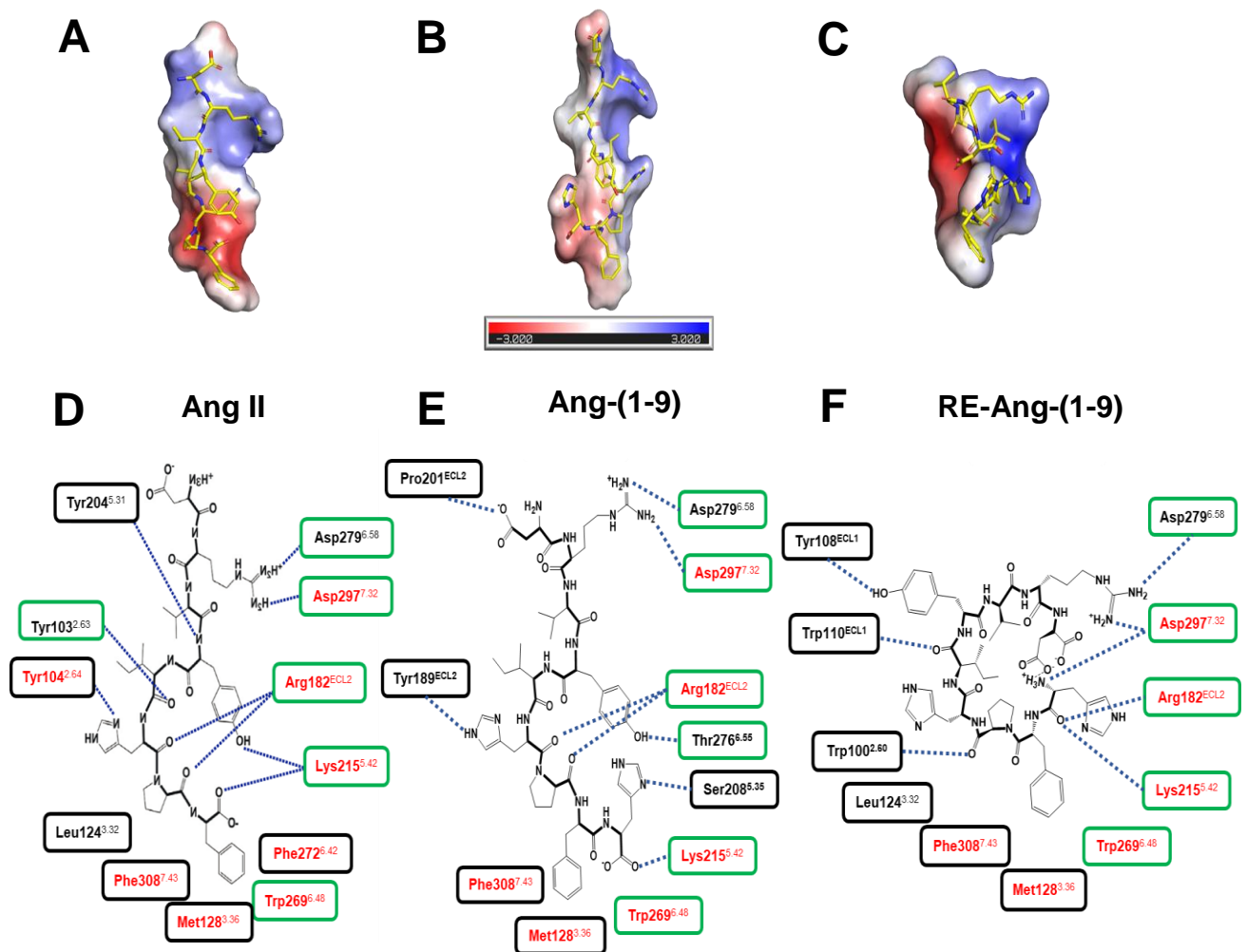


Figura 13. Dinámica molecular del complejo RE-Ang-(1-9)-AT₂R. **A.** Gráfica RMSD vs tiempo de RE-Ang-(1-9) dentro del bolsillo de AT₂R. Además, se muestran las diferencias entre las posturas que adoptan Ang-(1-9) (verde) y RE-Ang-(1-9) (amarillo) las cuales se superponen en el panel central (B). **B.** Superposición de los péptidos Ang-(1-9) (verde) y RE-Ang-(1-9) (amarillo). Se muestran diferencias en la orientación de las cadenas laterales. **C.** Interacciones observadas entre RE-Ang-(1-9) y el sitio ortostérico de AT₂R. Se destacan en la línea punteada, los contactos polares entre los residuos del ligando y el dominio de unión a ligando del receptor.

Los resultados de las simulaciones sugieren que Ang-(1-9) y RE-(1-9) podrían interactuar con el sitio ortostérico del receptor AT₂ formando el complejo ligando receptor. Las interacciones necesarias para la activación del AT₂R se mantienen a lo largo de la dinámica. Además, se advierten diferencias en el potencial electrostático obtenido entre Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) (Figura 14A-C). Se observó que las cargas negativas se encuentran distribuidas preferentemente

hacia la porción C-terminal para Ang II y Ang-(1-9) cuya orientación se encuentra hacia el fondo del bolsillo del AT₂R. En contraste, RE-Ang-(1-9) mostró esta distribución en las cargas orientadas hacia la formación del ciclo. Es claro que las contribuciones de los residuos cargados de RE-Ang-(1-9) tendrían una influencia para lograr la conformación que adopta dentro de la cavidad. Para comprender aún más la relevancia de estos análisis, es preciso realizar ensayos de actividad de RE-Ang-(1-9) que ayuden a clarificar la importancia de esta característica sobre el AT₂R y el efecto cardioprotector en un modelo de I/R.

Por otro lado, las interacciones críticas se dan en residuos del AT₂R los cuales se encuentran conservados en el AT₁R. Teniendo en cuenta este antecedente y dada la promiscuidad reportada para los péptidos derivados de Ang I, es posible hipotetizar que tanto Ang-(1-9) como RE-(1-9) podrían formar un complejo con el AT₁R. Por consiguiente, se realizó un acercamiento teórico de esta aseveración con el objetivo de contrastar la visión de un potencial mecanismo de activación mediado por el AT₁R.



Adaptado de Asada *et al.*, 2020

Figura 14. Esquema comparativo de las conformaciones de los péptidos Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) y principales interacciones dentro del bolsillo de AT₂R. **A-C.** Mapa de distribución de las cargas negativas en **A.** Ang II. **B.** Ang-(1-9) y **C.** RE-Ang-(1-9). **D.** Interacciones reportadas por Asada *et al.*, 2020 para el complejo Ang II-AT₂R. **E.** Interacciones observadas en este trabajo para el complejo Ang-(1-9)-AT₂R. **F.** Interacciones observadas en el complejo RE-Ang-(1-9)-AT₂R. En rojo, se destacan los residuos identificados como críticos para la activación del AT₂R.

6.5 Complejo Ang-(1-9)-AT₁R

Utilizando la estructura cristalográfica del complejo Ang II-AT₁R se replicó la estrategia descrita anteriormente para llevar a cabo las simulaciones. Los resultados *in silico* muestran que, en este sistema Ang-(1-9) se une al sitio ortostérico de AT₁R. En el bolsillo del receptor, se identificó una serie de interacciones análogas a las encontradas en las simulaciones con AT₂R. La estructura de partida de la simulación comprende interacciones con los residuos Lys199^{5.42}, Asp263^{6.58}, Asp281^{7.32}, Arg167^{4.64}, Tyr26^{1.30}, Tyr92^{ECL2} y Asp16^{N-Ter} (**Figura 15A**). La estructura de Ang-(1-9), se reordena dentro del bolsillo, moviendo las cadenas laterales de Asp1 y Arg2 hacia el espacio extracelular. Este péptido, muestra una forma de “C” similar a la registrada en el bolsillo de AT₂R debido a contactos polares entre las cadenas laterales. Adicionalmente, Ang-(1-9) en esta conformación, conserva algunas de las interacciones iniciales. Arg167^{4.64} forma un puente de hidrógeno con el *backbone* de la molécula. De igual manera, el extremo C-terminal de Ang-(1-9) interactúa con Lys199^{5.42}, mientras que las cadenas laterales de Tyr4 e His6 forman un puente de hidrógeno y un puente salino respectivamente, con el residuo Asp263^{6.58}. También, se encontraron interacciones entre los enlaces peptídicos de Arg2 y el residuo Tyr184^{ECL2}. Por otra parte, la disposición de la cadena lateral de Arg2 de Ang-(1-9) forma un puente salino con Asp16 ubicado en la región N-terminal de AT₁R.

Al igual que lo descrito para el AT₂R, el bolsillo de AT₁R presenta residuos polares ubicados cerca de la región extracelular mientras que, en el fondo de este receptor, predominan residuos mayormente apolares. Dadas las similitudes fisicoquímicas del sitio ortostérico entre ambos receptores, presumiblemente RE-Ang-(1-9) pudiese volver a formar una estructura cíclica similar a la observada dentro del bolsillo de AT₂R.

6.6 Complejo RE-Ang-(1-9)-AT₁R

Los resultados de las simulaciones muestran un comportamiento similar a los obtenidos en el complejo RE-Ang-(1-9)-AT₂R (**Figura 15B**). El péptido tiende a cambiar su conformación desde una estructura extendida hasta alcanzar una estructura cerrada, la cual se encuentra ligada a través de un puente salino formado por los extremos N-terminal y C-terminal de la molécula. La disposición de las cadenas laterales se mantiene hacia el exterior del ciclo y las interacciones registradas corresponden a las observadas previamente en todos los sistemas estudiados *in silico*, destacando aquellas como Arg167 con el *backbone* del ligando; Lys199^{5.42} con la cadena lateral de D-Asp9 formando un puente salino, mientras que Asp281^{7.32} interactúa de la misma manera con la cadena lateral de D-Arg8. Se detectó también interacciones de tipo puente de hidrógeno entre la cadena lateral de dHis1 y el extremo carboxilo de Lys199^{5.42} y D-Tyr6 con Thr80^{2.56} estabilizando el péptido en una posición un poco más cercana al fondo

del bolsillo. Finalmente se observó una interacción de tipo puente de hidrógeno entre la cadena lateral de D-His4 con Tyr35^{1.39}

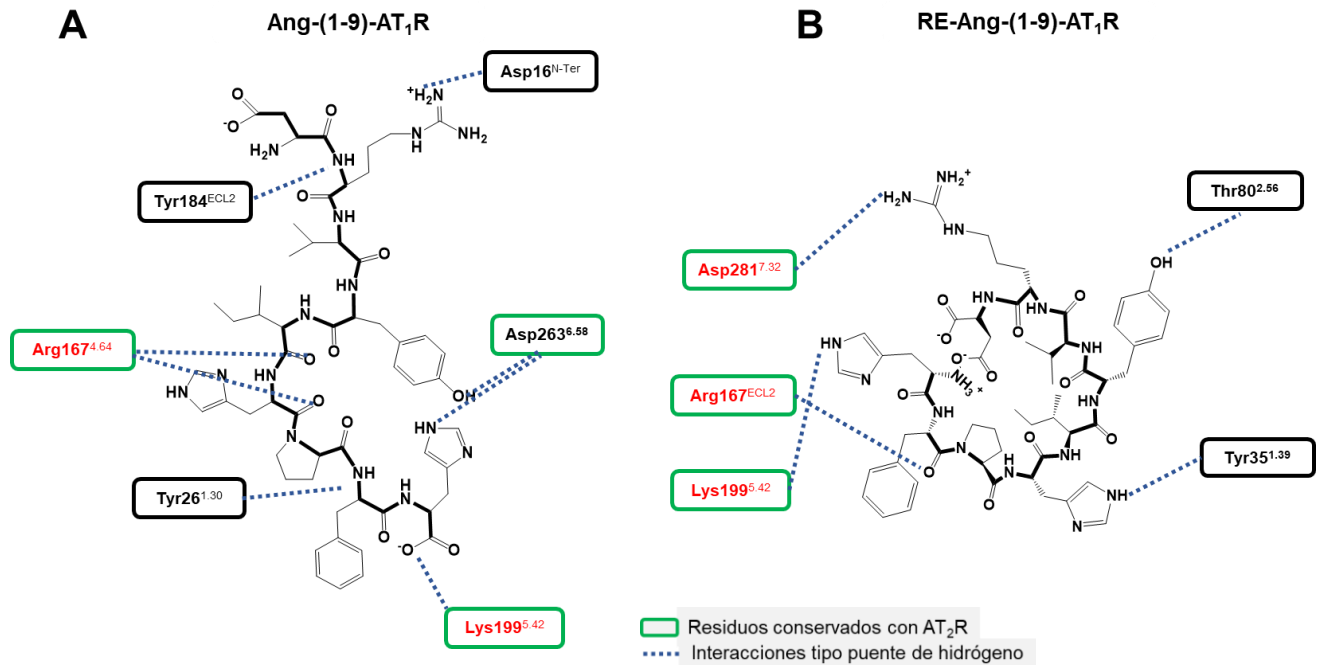


Figura 15. Interacciones observadas en el sitio ortostérico de AT₁R. **A.** Complejo Ang-(1-9)-AT₁R. **B.** Complejo RE-Ang-(1-9)-AT₁R. Se destacan en la línea punteada, los contactos polares entre los residuos del ligando y el dominio de unión a ligando del receptor. En rojo, se destacan los residuos identificados como críticos para la activación de AT₁R

6.7 Afinidades de unión teóricas de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) en los receptores AT₁ y AT₂

Basado en los resultados de dinámica molecular obtenidos y considerando interacciones observadas en los complejos estudiados, se realizó el cálculo de ΔG de las diferencias de energía de unión por medio de Mecánica Molecular con Born Generalizado y Solvatación de Área Superficial (MMGBSA) y Mecánica Molecular con Poisson-Boltzmann y solvatación del área superficial (MMPBSA) para Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) unidos a los receptores AT₁ y AT₂ (**Tabla1**). Tomando como referencia los valores de Ang II y de acuerdo con los valores de MMGBSA/MMPBSA para las moléculas unidas al AT₁R, los datos muestran una tendencia a que tanto Ang-(1-9) como RE-Ang-(1-9) tendrían una menor afinidad por el receptor que Ang II. Luego, al comparar las diferencias de afinidad entre Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9), se obtuvo que el *retroinverso* correspondería al ligando menos afín por AT₁R. Esta tendencia se mantuvo al analizar la unión de los ligandos con AT₂R. Los datos de MMGBSA/MMPBSA son concordantes respecto de una menor afinidad de RE-Ang (1-9) en contraste con Ang (1-9) en el bolsillo del AT₂R.

Sorpresivamente, al cotejar los datos de energía libre de RE-Ang-(1-9) unido a los receptores AT₁ y AT₂ se encontró que esta molécula tendría una mayor afinidad por el AT₁R. Este comportamiento también se observó en los complejos Ang-(1-9)-AT₁R y Ang-(1-9)-AT₂R, sugiriendo que ambos ligandos tienen una menor afinidad por AT₂R respecto de la unión con AT₁R.

	MMGBSA [Kcal/mol]		MMPBSA [Kcal/mol]	
	AT ₁ R	AT ₂ R	AT ₁ R	AT ₂ R
Ang II	-72,3 ± 7,5	-62,8 ± 7,9	-62,4 ± 12,4	-59,5 ± 9,8
Ang-(1-9)	-66,9 ± 11,0	-62,6 ± 7,3	-53,3 ± 13,5	-58,9 ± 9,2
RE-Ang-(1-9)	-58,2 ± 6,6	-45,5 ± 6,4	-55,6 ± 5,7	-45,0 ± 11,4

Tabla 1. Afinidades de unión calculadas. MMGBSA/MMPBSA para Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) unidos al AT₁R y AT₂R. [Kcal/mol] ± Desviación estándar.

Considerando la potencial relación estructural encontrada en este trabajo entre RE-Ang-(1-9) y AT₂R, se debe reunir evidencia que permita asociar esta relación con la actividad del péptido. Si bien los datos previos sugieren un efecto cardioprotector en modelos de hipertrofia cardiaca *in vitro* [157a], se desconoce si la administración de RE-Ang-(1-9) tendría actividad sobre parámetros fisiológicos en un modelo *ex vivo*.

6.8 Actividad Cardioprotectora *ex vivo* de Re-Ang-(1-9)

De acuerdo con los resultados obtenidos desde los sistemas teóricos, en conjunto con antecedentes sugieren que RE-Ang-(1-9) tendría actividad en el tejido cardiaco. Previamente, se mostró en nuestro laboratorio en modelos de hipertrofia que RE-Ang-(1-9) posee actividad protectora en cardiomiocitos *in vitro* tratados con NE (norepinefrina) a través de un mecanismo dependiente de AT₂R. No obstante, se desconoce si la administración de RE-Ang-(1-9) tendría un efecto preconditionante que pudiese mitigar el daño producido por un evento de I/R. Así, se probó el efecto del péptido en un modelo de I/R *ex vivo* en el sistema

Langendorff. Inicialmente, la administración de RE-Ang-(1-9), en dosis de 1,5 a 75 nM, mostró un comportamiento dosis-respuesta reduciendo el desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (LVDP). Esta reducción osciló entre $97,4 \pm 0,4$ mmHg y $26,8 \pm 0,1$ mmHg (Figura 16).

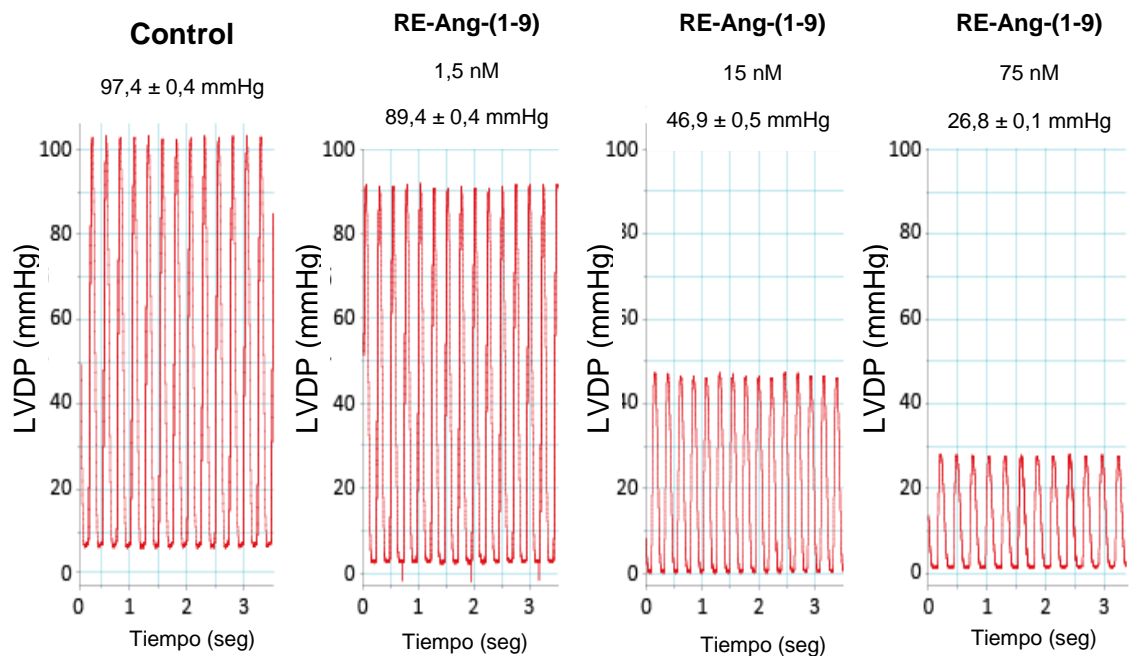


Figura 16. Actividad de RE-Ang-(1-9) ex vivo. Desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (LVDP) luego de la administración de concentraciones crecientes de RE-Ang-(1-9) (0, 1,5, 15 y 75 nM respectivamente).

Posteriormente, se procedió a emplear las condiciones de Isquemia-Reperusión (I/R) en este modelo *ex vivo* administrando previamente 1,5 nM de RE-Ang-(1-9) por 10 min. Luego de 30 min de isquemia, seguido por 1 h de reperusión, se comparó el tamaño de infarto entre el grupo tratado con RE-Ang-(1-9) vs el grupo sin tratamiento (I/R). El grupo I/R mostró un tamaño de infarto $39 \pm 2\%$ mientras que la administración de 1,5 nM de RE-Ang-(1-9) disminuyó el

tamaño a un $12 \pm 3\%$ (**Figura 17A, C**). Por otra parte, los parámetros fisiológicos evaluados en el grupo I/R mostraron que los corazones sometidos a isquemia global registraron un aumento en la presión de fin de diástole (LVEDP) en el ventrículo izquierdo hacia el final de la reperfusión, confirmando daño en el tejido cardiaco. Por el contrario, la administración de RE-Ang-(1-9) redujo significativamente la LVEDP (**Figura 15B, D**). Además, el desarrollo de presión del ventrículo izquierdo (LVDP) aumentó significativamente respecto del grupo I/R sugiriendo una mejora en la función fisiológica del corazón (Figura 10B, E). Estos resultados indican que RE-Ang-(1-9) tiene un efecto cardioprotector en el modelo de Langendorff empleado.

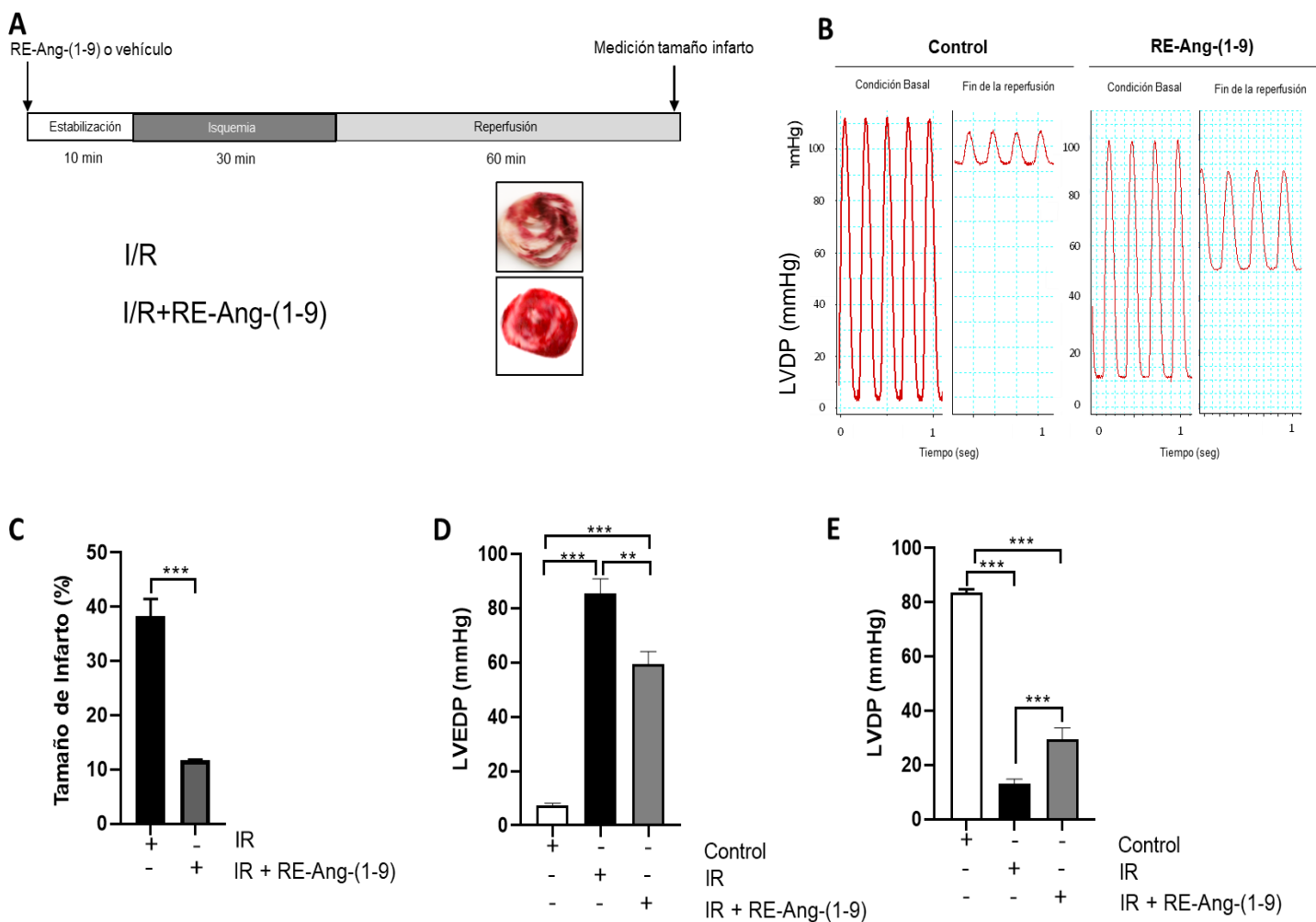


Figura 17. Análisis del efecto cardioprotector de RE-Ang-(1-9) en corazones aislados sometidos a I/R en el sistema de Langendorff. Los corazones se sometieron a isquemia total durante 30 min, seguido de 60 min de reperusión en presencia o ausencia de 1,5 nM de RE-Ang-(1-9). **A.** Esquema experimental utilizado y cortes representativos utilizados en la medición del tamaño de infarto. **B.** Registro representativo del desarrollo de la presión (LVDP) en condiciones basales y al final de la reperusión, en la ausencia (control) y en presencia de 1,5 nM de RE-Ang-(1-9). **C.** Cuantificación del tamaño del infarto (prueba Mann Whitney, $P < 0,05$). **D.** Presión de fin de diástole (LVEDP) luego de 60 min de reperusión. **E.** Cuantificación de los registros de LVDP luego de 60 min de reperusión. Los valores se expresan como media \pm SEM; Control, $N=6$; I/R $N=6$; IR+1,5 nM de RE-Ang-(1-9) $N=3$. Se analizó los datos utilizando Kruskal Wallis para comparaciones múltiples seguido de la prueba de Dunn; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

6.9 Desarrollo de un péptido Re-Ang-(1-9) cíclico basado en los resultados obtenidos en la sección 6.4

Una de las características de RE-Ang-(1-9) dentro del sitio ortostérico de AT₂R es la conformación cerrada que adopta este peptidomimético. En relación con lo anterior, una interrogante que surge a partir de esta característica es si un péptido *retroenantio* de Ang-(1-9) con una estructura cerrada tendría la misma actividad o una similar a la evaluada por medio del mismo modelo *ex vivo* reproduciendo las condiciones de I/R antes descritas. Para ello, se sintetizó una variante del péptido RE-Ang-(1-9) utilizando la estrategia *head-to-tail*. Esta variante, denominada cRE-Ang-(1-9) se encuentra ciclada mediante un enlace peptídico entre los extremos N-terminal y C-terminal de la molécula, simulando la estructura encontrada en los sistemas teóricos (**Figura 18A**). De forma paralela, se sintetizó una molécula de Ang-(1-9) utilizando la misma estrategia denominada cAng-(1-9) (**Figura 18A**). De acuerdo con el diseño, la configuración de los péptidos que conforman la estructura de cRE-Ang-(1-9) permite que las cadenas laterales de la molécula queden expuestas hacia el exterior, esta diferencia es importante respecto de cAng-(1-9). La cadena lateral de His6 de c-Ang-(1-9) se encuentra orientada hacia el interior de la estructura. De acuerdo con los datos *in silico* se espera que cAng-(1-9) no muestre actividad biológica al perder interacciones identificadas como críticas para la activación del AT₂R.

Nuevamente, para poner a prueba la actividad del péptido cRE-Ang-(1-9) se utilizó el modelo de I/R *ex vivo*. Los resultados sugieren que la administración

de 50 nM de cRE-Ang-(1-9) tiene un efecto en los parámetros fisiológicos del corazón, encontrando una disminución en la LVDP previo al evento de I/R (**Figura 18B**). No obstante, se advierte una tendencia al aumento en el tamaño de infarto de aproximadamente el doble respecto del el grupo I/R (**Figura 18D**). Al observar los corazones teñidos con la sal de tetrazolio pretratados con cRE-Ang-(1-9), se diferencia dramáticamente el daño producido en el tejido cardiaco respecto del grupo I/R (**Figura 18C**), lo que sugiere que cRE-Ang-(1-9) muestra actividad disminuyendo la presión del ventrículo izquierdo, pero falla al prevenir el daño producido en el miocardio. Adicionalmente y de acuerdo con lo esperado, la administración de 50 nM de cAng-(1-9) no mostró actividad en los parámetros fisiológicos del corazón ni el tamaño de infarto registrado (**Figura 18C-D**)

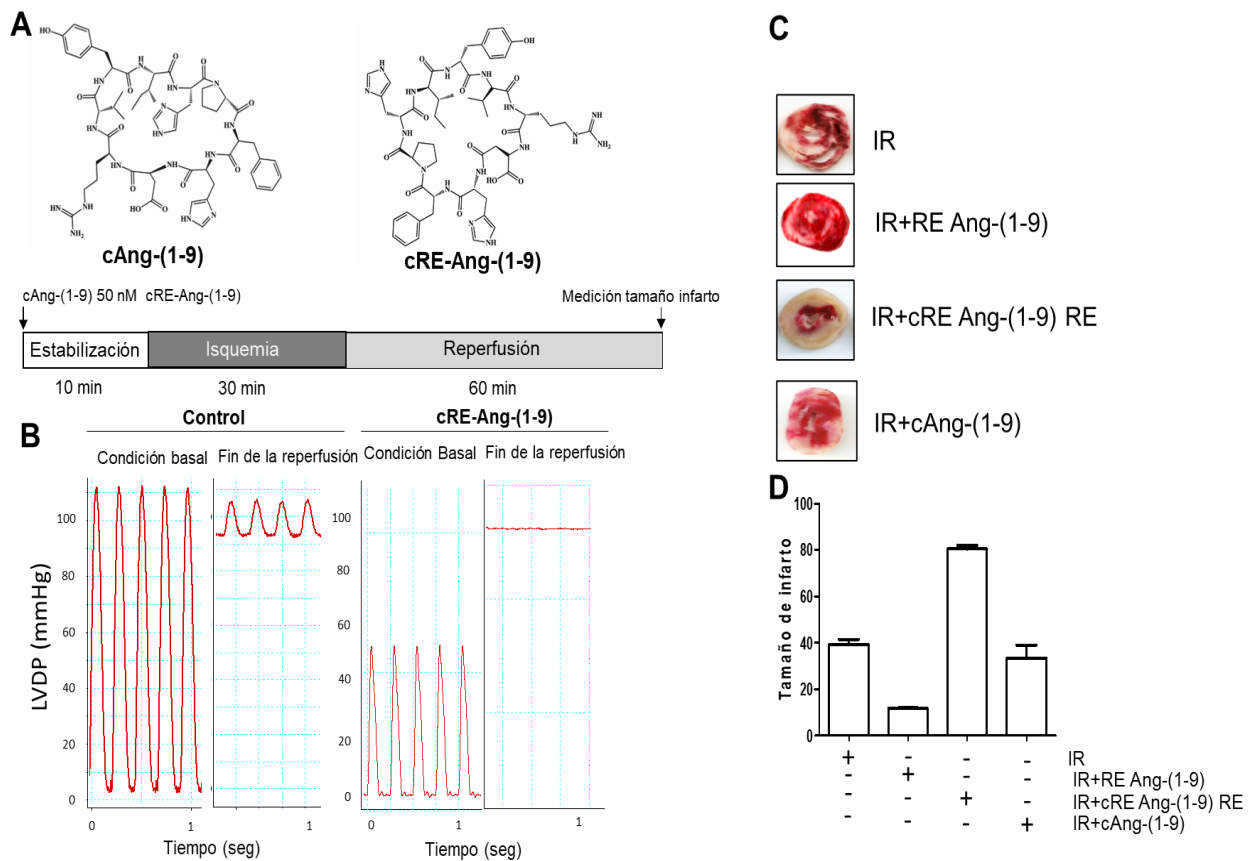


Figura 18. Análisis del efecto de cRE-Ang-(1-9) en corazones aislados sometidos a I/R en el sistema de Langendorff. Los corazones aislados en el sistema de Langendorff se sometieron a isquemia total durante 30 min, seguido de 60 min de perfusión en presencia administrando 50 nM de cAng-(1-9) o cRE-Ang-(1-9). **A.** Representación de las moléculas utilizadas cAng-(1-9) y cRE-Ang-(1-9) dentro del esquema experimental utilizado en la medición del tamaño de infarto. **B.** Registro representativo del desarrollo de la presión (LVDP) en condiciones basales y al final de la perfusión, en la ausencia (control) y en presencia de 50 nM de cRE-Ang-(1-9). **C.** Imágenes representativas del tamaño de infarto observado para las condiciones estudiadas en contraste con los grupos IR, IR+RE-Ang-(1-9), IR+cRE-Ang-(1-9) e IR+cAng-(1-9). **D.** Gráfica de la cuantificación relativa del tamaño de infarto de 2 experimentos independientes en los grupos antes mencionados.

Los datos reunidos hasta ahora apoyarían la hipótesis de que Ang-(1-9) podría unirse al receptor AT₁. Si bien los resultados teóricos sugieren que los residuos conservados entre los receptores AT₁ y AT₂ son importantes para la activación de una señalización río abajo, el antecedente en el modelo *ex vivo* utilizando el péptido cíclico da cuenta de que la actividad del cRE-Ang-(1-9) sería deletérea en el miocardio podría tener una relación con el efecto mediado vía AT₁R.

7. DISCUSIÓN

7.1 Comparación de estructuras de Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9)

Los ligandos comparados Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) presentan similitudes en su estructura primaria, una característica que llevaría a suponer que existirían similitudes en su estructura secundaria. Las aproximaciones teóricas son consistentes respecto de que ambas moléculas poseen una estructura extendida y flexible (**Figura 6 y 7**). Por un lado, los datos de dinámica molecular para los péptidos en solución muestran fluctuaciones en el movimiento del *backbone* en un intervalo de 1-3 Å respecto de la estructura de inicio durante el tiempo de simulación (1µs). Los resultados de REMD se muestran concordantes con lo expuesto anteriormente. Las diferencias de temperatura ensayadas amplían las fluctuaciones en el movimiento del *backbone* de ambas moléculas. Por otro lado, estos análisis indicarían la presencia de 2 estructuras de interés (**Figura 7 y 10D**). Considerando la longitud de los péptidos y las disposiciones en la gráfica de Ramachandran de los residuos que presentes en

el esqueleto carbonado, se infiere que la primera estructura de interés tendría una conformación extendida. La segunda estructura de interés observada para RE-Ang-(1-9) advierte la presencia de una conformación cerrada favoreciendo una interacción de tipo puente de hidrógeno entre los residuos del *backbone* de la molécula y entre los extremos N-terminal y C-terminal. Esta estructura, estaría favorecida dentro del bolsillo de AT₁R y AT₂R (Figuras 13C, 14C, 14F). Más adelante, los estudios de CD y RMN sugieren que estos péptidos no adoptarían una estructura secundaria definida en solución. Los valores ³JNHH_α para los residuos de Ang-(1-9) y RE-(1-9) se encuentran en un rango de 6-7 Hz (Figura 9) lo que indica a que la conformación de los péptidos utilizados en este estudio, muestran una tendencia a una disposición de los residuos de manera aleatoria (*random coil*) [151, 152]. Característica previamente descrita para Ang II [153]. El análisis de los desplazamientos químicos utilizando resonancias H_α, C_α y C_β ($\Delta C_{\alpha} - \Delta C_{\beta}$) mostró que la secuencia Val3-Ile5 tiende a adoptar una conformación de tipo giro- β la cual también estaría presente en D-Ile5-D-Val7 de RE-Ang-(1-9). Sin embargo, esta conformación transitoria no parece tener participación en la estructura que Ang-(1-9) adoptaría en la cavidad de AT₁R y AT₂R o la formación del ciclo en el *retroinverso* (Figura 14E, 14F). Se ha propuesto que estos giros pudieran ser relevantes para la actividad biológica de algunos péptidos de conformación extendida favoreciendo el reconocimiento del receptor [154, 155]. En contraposición, los resultados de las interacciones observadas en los complejos formados entre Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) con AT₁R y AT₂R apoyan lo

reportado en los datos cristalográficos para Ang II [72, 75]. Entre ellos, se ha descrito la importancia de la interacción con el residuo de Arg182^{ECL} para el reconocimiento del ligando el cual interactúa mediante un puente de hidrógeno con el motivo His-Pro-Phe [72, 75].

De acuerdo con lo anterior, estas similitudes estructurales entre Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) representarían una ventaja en términos de la formación del complejo ligando-receptor. Dada la flexibilidad de RE-Ang-(1-9), se espera que este conserve las interacciones reportadas en el complejo Ang II-AT₂R [72, 75] teniendo un efecto mimético sobre la señalización río abajo.

7.2 Interacciones observadas en el sitio ortostérico del complejo Ang-(1-9)-AT₂R versus RE-Ang-(1-9)-AT₂R

Las simulaciones mostraron diferencias significativas entre la conformación que adopta Ang-(1-9) dentro del bolsillo de AT₂R y la disposición que adquiere RE-Ang-(1-9) en el mismo sitio. Se observó que Ang-(1-9) mantiene la conformación flexible, conserva las interacciones identificadas como críticas para la activación del receptor y que, algunas de estas se encuentran compartidas por AT₁R y AT₂R (Arg184^{ECL2}, Lys215^{5.42}, y Asp297^{7.32}) (**Figura 2**) además de otras interacciones (Asp279^{6.58}). A su vez, las interacciones observadas en el complejo Ang-(1-9)-AT₂R presentan diferencias respecto de las reportadas en el complejo Ang II-AT₂R por Asada *et al.*, 2020 [75]. Los autores, además de incluir información sobre los residuos críticos antes mencionados, lograron la

identificación de otros residuos que participan en la activación de AT₂R, que no están presentes en AT₁R, entre ellos Tyr103^{2.63}, Tyr204^{5.31} y Tyr104^{2.64}. De acuerdo con esta publicación, la mutación Tyr104A no registró actividad, concluyendo que la interacción entre Tyr104^{2.64} y Ang II es necesaria para la activación del receptor, además de ser una pista potencial para esclarecer las bases del agonismo selectivo de AT₂R [75]. El complejo Ang II-AT₂R muestra una interacción de tipo puente de hidrógeno entre Tyr104^{2.64} y la cadena lateral del residuo His6 del octapéptido. En contraste, la dinámica molecular ejecutada para el complejo Ang-(1-9)-AT₂R indica que, en el tiempo evaluado esta interacción se pierde, sugiriendo que existen diferencias entre los contactos polares producidos entre Ang II y Ang-(1-9) dentro del bolsillo del receptor y que estos serían suficientes para la activación AT₂R. Este resultado, refuerza la hipótesis que propone que dentro del sitio ortostérico de AT₂R existiría una capacidad reducida de residuos del ligando que podrían acoplarse e interactuar en el fondo del bolsillo. Estudios anteriores, sugieren que la arquitectura del bolsillo de AT₂R soportaría 7 residuos en su interior [72]. En nuestras aproximaciones teóricas, se observó que los residuos Asp1, Arg2 y Val3 de Ang-(1-9) quedan expuestos en el extremo extracelular fuera del bolsillo del receptor. Paralelamente, la cadena lateral de His9 se mueve posicionando el anillo imidazol cerca del residuo Thr276^{6.55} formando un puente de hidrógeno. Así, Ang-(1-9) se aleja levemente del fondo del sitio, no obstante, las cadenas laterales de la molécula tienden a orientarse de manera similar a lo descrito para el complejo Ang II-AT₂R,

conservando la mayor parte de las interacciones. Si bien la longitud de Ang-(1-9) parece ser un factor relevante para formación de interacciones dentro del sitio ortostérico de AT₂R, la contribución de 1 residuo cargado en el extremo C-terminal, podría tener un rol sobre el efecto río abajo. Al respecto, es importante recalcar que la diferencia fundamental entre Ang II y Ang-(1-9) radica en el residuo His9, el cual exhibe interacciones no reportadas hasta la fecha (**Figura 14E**). Esta característica podría definir la relación estructura-actividad de Ang-(1-9) vs Ang II, proporcionar información determinante sobre la selectividad funcional del AT₂R y a su vez proponer nuevas interrogantes del agonismo selectivo del AT₁R. Adicionalmente, estos hallazgos explicarían superficialmente las razones por las cuales angiotensina I no presentaría actividad sobre los AT₁R y AT₂R.

Por el contrario de lo esperado, RE-Ang-(1-9) muestra dentro del sitio ortostérico de AT₂R una conformación cerrada, presentando contactos intramoleculares que favorecen la formación de una estructura semejante a la de un péptido cíclico (**Figura 14F**). En ella destaca la interacción entre los extremos N-terminal y C-terminal de la molécula unidos mediante un puente salino. Se observó además que, las cadenas laterales del péptido se encuentran dispuestas hacia el exterior de la estructura. Dada la configuración de los residuos que forman parte de RE-Ang-(1-9) esta conformación permite mantener las interacciones conservadas entre AT₁R y AT₂R y que son necesarias para la activación de ambos receptores. Una de las principales diferencias identificadas

entre los complejos Ang-(1-9)-AT₂R y RE-Ang-(1-9)-AT₂R corresponde a las interacciones entre los residuos del ligando con aquellos que forman parte de un *loop* extracelular (ECL1 o ECL2). Anteriormente, se reportó que Arg182^{ECL2} tendría una función sobre la formación del complejo ligando-receptor y se postula que este residuo funcionaría como un punto de anclaje para Ang II y s-Ang II orientando su posición dentro del bolsillo de AT₂R [71, 72, 75]. Concordante con lo anterior, nuestros resultados sugieren que tanto Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) conservarían esta interacción a lo largo de la simulación, pero además de Arg182, Ang-(1-9) estaría interactuando con otros 2 residuos ubicados en el ECL2: Tyr189 y Pro201. En contraste, RE-Ang-(1-9) presenta 2 diferentes interacciones, pero esta vez ubicadas en el ECL1: Tyr108 y Trp110. Al igual que la función propuesta para Arg182^{ECL2} es posible que las interacciones con los residuos que forman parte de los *loops* extracelulares puedan tener un rol sobre la formación del complejo ligando receptor. Subsecuentemente, algunas de las interacciones dentro del dominio de unión a ligando difieren de las observadas en el complejo Ang-(1-9)-AT₂R, entre ellas la cadena lateral del residuo Trp100^{2.60} formando un puente de hidrógeno con el *backbone* de RE-Ang-(1-9). Esta interacción, permitiría la estabilización de la molécula al interior del sitio ortostérico de AT₂R, manteniendo la orientación de la cadena lateral de D-Phe2 del péptido hacia el fondo del bolsillo. De acuerdo con la información obtenida de las estructuras cristalinas de AT₁R y AT₂R, el dominio de unión a ligando en ambos receptores está compuesto por residuos polares localizados en la parte superior del bolsillo

y residuos apolares ubicados en el fondo del sitio, pudiendo distinguir 1 región polar y otra apolar [72, 75]. Si bien, este antecedente considera que las interacciones polares en la parte superior cumplen una función sobre el posicionamiento del péptido al interior del bolsillo y la activación del receptor, se ha sugerido que también las interacciones apolares son esenciales para el mismo efecto. Por ejemplo, se identificó que los residuos Phe272^{6.51}, Trp269^{6.48}, Met128^{3.36} y Phe308^{7.43} tienen una importante participación en la activación del receptor y que esta sería dependiente de la interacción con el anillo del residuo Phe8 de Ang II, concluyendo que el movimiento de la cadena lateral de Met128^{3.36} representaría un elemento crucial en la activación de AT₂R [72, 75]. Nuestros resultados sugieren que el residuo D-Phe2 de RE-Ang-(1-9) mantendría la interacción reportada para Ang II con Met128^{3.36} al igual que Ang-(1-9).

7.3 Agonismo selectivo del AT₂R y similitudes con AT₁R

Para entender la relación existente entre las interacciones ligando-receptor y el agonismo selectivo de AT₂R es necesario establecer un punto de comparación con AT₁R. Los resultados sugieren que tanto Ang-(1-9) como RE-Ang-(1-9) serían capaces de acoplarse a AT₁R. Asimismo, es razonable suponer que las semejanzas en la estructura primaria entre Ang II, Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) serían un factor determinante para la torsión del *backbone* del péptido dentro del bolsillo del AT₁R de forma similar entre ellos. No se observaron diferencias importantes entre las interacciones registradas en los complejos Ang II-AT₁R y

Ang-(1-9)-AT₁R en los sistemas teóricos. Sin embargo, las simulaciones del complejo RE-Ang-(1-9)-AT₁R aportaron con nuevas perspectivas respecto de la activación de este receptor. De forma interesante, la estructura cerrada que adopta RE-Ang-(1-9) dentro del bolsillo de AT₁R presenta un puente de hidrógeno el cual se forma entre la cadena lateral de D-His4 del péptido y la cadena lateral de Tyr35^{1.39}. Además, se detectó otra interacción de tipo puente de hidrógeno entre los residuos D-Tyr6 y Thr80^{2.56}. Estas interacciones han sido descritas entre AT₁R y olmesartán, agonista inverso para AT₁R del cual están bien descritos los efectos [71, 156]. Nuestros resultados con RE-Ang-(1-9) se apoyan en los datos descritos para olmesartán, sugiriendo que los residuos de Tyr35^{1.39} y Thr80^{2.56} de AT₁R ubicados en el dominio de unión a ligando, tendrían una participación sobre el agonismo inverso y la selectividad funcional de este receptor. Así, es posible hipotetizar que RE-Ang-(1-9) tendría una función sobre AT₁R como agonista inverso, lo cual explicaría de forma parcial una sinergia mediante la unión con AT₁R y AT₂R potenciando el efecto observado. En oposición a lo antes mencionado, estudios recientes evaluaron la selectividad funcional en AT₁R mostraron una relación entre las interacciones dentro del bolsillo del receptor y la presencia del residuo de Phe8 de Ang II con la activación de una señalización río abajo a través de Gq o β -arrestina, indicando que esta última tendría un efecto cardioprotector [157]. Similar a lo observado en la cavidad de AT₂R, la unión de Ang II en el bolsillo de AT₁R permite el posicionamiento de Phe8 en el fondo del bolsillo, induciendo un cambio conformacional en Leu112^{3.36} favoreciendo la

activación del receptor vía proteína Gq. No obstante, debido a la conformación flexible del AT₁R unido a Ang II es posible observar un balance entre la respuesta mediada por proteína G o β -arrestina [157]. Así, esta respuesta podría ser similar para el complejo Ang-(1-9)-AT₁R debido a la flexibilidad del ligando a diferencia de RE-Ang-(1-9) dentro de la cavidad, cuya estructura sería más rígida.

7.4 Afinidades de Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) con AT₁R y AT₂R

Los resultados teóricos mostrados en el capítulo 6.7 sugieren una menor afinidad de RE-Ang-(1-9) por los receptores AT₁ y AT₂ comparado con Ang-(1-9) para los mismos receptores. Esta tendencia es consistente entre los valores de ΔG calculados mediante MMGBSA/MMPBSA ([Tabla1](#)). Sin embargo, al contrastar los datos obtenidos para los complejos Ang-(1-9)-AT₁R y Ang-(1-9)-AT₂R se observó discrepancias respecto de los valores de ΔG entre estas aproximaciones. Las energías calculadas mediante MMGBSA sugieren que Ang-(1-9) tendría una mayor afinidad por AT₁R que por AT₂R. Sin embargo, este escenario se invierte al contrastar con los valores obtenidos por MMPBSA. Si bien se ha propuesto a estas 2 metodologías como complementarias, existen diferencias entre ambas aproximaciones en las que se destacan algunas desventajas respecto de los valores de energía calculados mediante MMPBSA [158-161]. Este método tiene un mejor desempeño para el cálculo de energías absolutas, pero no necesariamente para la estimación de energías relativas [158]. Además, se ha visto que el cálculo de las energías de unión utilizando esta estrategia presenta una baja precisión, es más sensible a las perturbaciones de

los campos de fuerza y tiende a mostrar dificultades con ligandos grandes [162]. Probablemente, la diferencia registrada tenga relación con las características fisicoquímicas de la interfaz de unión. En este sentido, MMGBSA provee información de mayor relevancia para la estimación de afinidad entre ligando y receptor [158]. Pese a las diferencias antes mencionadas, los cálculos de MMGBSA sugieren que tanto Ang-(1-9) y RE-(1-9) tendrían una mayor afinidad por AT₁R. Sin embargo, esta tendencia ya ha sido reportada para Ang-(1-9) apoyando los datos observados en las simulaciones [163]. En relación con lo anterior, es necesario señalar, que más allá de las contribuciones de las interacciones polares observadas y el cálculo de las energías de unión en los complejos simulados, existen otras características que favorecen la afinidad de un ligando por el receptor, entre ellas destacan la flexibilidad del ligando, la solvatación de este, la contribución individual de las moléculas de agua en la interfaz y las fuerzas de repulsión presentes en la cavidad [164].

7.5 Efecto cardioprotector de RE-Ang-(1-9) vs cRE-Ang-(1-9)

Los resultados utilizando el modelo de I/R *ex vivo* indican que RE-Ang-(1-9) presenta una actividad cardioprotectora, reduciendo significativamente el tamaño de infarto respecto del grupo sin tratamiento (**Figura 17**). Como se mencionó anteriormente, las simulaciones del complejo RE-Ang-(1-9)-AT₂R mostraron que esta molécula adopta una estructura cerrada dentro del bolsillo del receptor, pero al intentar obtener esta estructura de forma sintética [cRE-Ang-(1-9)] y probarla

en el mismo sistema, se observó paradójicamente el efecto opuesto (**Figura 18**). De esta manera, es posible abordar este resultado tomando en cuenta algunos aspectos. Al unir los extremos C-terminal y N-terminal de RE-Ang-(1-9), el enlace peptídico formado haría que las contribuciones de los extremos se pierdan, con ello, probablemente interacciones importantes para la activación y/o señalización vía AT₂R. También es posible suponer que la distancia de un enlace peptídico limite los grados de libertad de cRE-Ang-(1-9) en el bolsillo del receptor, dificultando otras interacciones. Estos resultados apoyan fuertemente la idea de que el RE-Ang-(1-9) tiene una conformación extendida y que es necesaria para generar un efecto vía AT₂R.

Finalmente, los análisis efectuados sugieren la posibilidad de que cRE-Ang-(1-9) pueda unirse a AT₁R, dado el efecto reportado en este trabajo. No obstante, tampoco es posible descartar la interacción de cRE-Ang-(1-9) con algún otro receptor.

8. CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que las similitudes estructurales entre Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) podrían favorecer las interacciones descritas en AT₂R.
- Los nonapéptidos Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) no muestran una estructura secundaria definida en los modelos estudiados.
- Los resultados de las simulaciones sugieren que Ang-(1-9) y RE-Ang-(1-9) conservarían las interacciones reportadas como críticas para la activación de AT₂R. Por otro lado, el complejo Ang-(1-9)-AT₂R presenta interacciones con los residuos Tyr189, Pro201, Ser208 y Thr276.
- En los modelos teóricos se observaron diferencias en las interacciones ligando-receptor en el complejo RE-Ang-(1-9)-AT₂R respecto de Ang-(1-9)-AT₂R; destacando las interacciones con los residuos Trp100, Trp110 y Tyr108.
- RE-Ang-(1-9) exhibió una conformación cerrada dentro del bolsillo de AT₂R. También se observó una conformación cerrada de este péptido en el complejo RE-Ang-(1-9)-AT₁R el cual muestra interacciones de tipo puente de hidrógeno entre los residuos dTyr6 y Thr80^{2,56} este último, ha sido descrito como parte de la interacción con olmesartán.
- RE-Ang-(1-9) mostró un efecto cardioprotector *ex vivo*, mientras que la administración de la forma cíclica de este péptido, cRE-Ang-(1-9) mostró un efecto deletéreo sobre el tejido cardiaco.
- Los estudios teóricos sugieren que al igual que RE-Ang-(1-9), Ang-(1-9) también podría unirse al sitio ortostérico de AT₁R.

- Estos antecedentes podrían dar nuevas pistas sobre la relación estructura-actividad de ligandos y selectividad funcional del AT₂R.

9. REFERENCIAS

1. Braathen, B. and T. Tonnessen, *Cold blood cardioplegia reduces the increase in cardiac enzyme levels compared with cold crystalloid cardioplegia in patients undergoing aortic valve replacement for isolated aortic stenosis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **139**(4): p. 874-80.
2. Parker, M.D., et al., *Ischemia- reperfusion injury and its influence on the epigenetic modification of the donor kidney genome*. Transplantation, 2008. **86**(12): p. 1818-23.
3. Piot, C.A., et al., *Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo*. Circulation, 1997. **96**(5): p. 1598-604.
4. Motayagheni, N., *Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: Improved heart quality and decreased risk of ischemia*. MethodsX, 2017. **4**: p. 508-512.
5. Rodrigo, R., et al., *Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(10): p. 625-34.
6. Rodrigo, R., J.C. Prieto, and R. Castillo, *Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications*. Clin Sci (Lond), 2013. **124**(1): p. 1-15.
7. Becker, L.B., *New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 461-70.
8. Forman, M.B. and E.K. Jackson, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(23): p. 2408; author reply 2409-10.
9. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
10. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
11. Rodrigo, G.C. and N.J. Samani, *Ischemic preconditioning of the whole heart confers protection on subsequently isolated ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(1): p. H524-31.
12. Rodrigo, R., et al., *Prevention of atrial fibrillation following cardiac surgery: basis for a novel therapeutic strategy based on non-hypoxic myocardial preconditioning*. Pharmacol Ther, 2008. **118**(1): p. 104-27.
13. Weydert, C.J. and J.J. Cullen, *Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue*. Nat Protoc, 2010. **5**(1): p. 51-66.
14. Kankofer, M., J. Wawrzykowski, and M. Hoedemaker, *The presence of SOD 1 and GSH-Px in bovine retained and properly released foetal membranes*. Reprod Domest Anim, 2013. **48**(4): p. 699-704.

15. Schubert, A.C., et al., *Oxidative state and oxidative metabolism of the heart from rats with adjuvant-induced arthritis*. Exp Mol Pathol, 2016. **100**(3): p. 393-401.
16. Khanna, P., et al., *Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death*. Nanomaterials (Basel), 2015. **5**(3): p. 1163-1180.
17. Briasoulis, A., et al., *The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure*. Heart Fail Rev, 2016. **21**(2): p. 169-76.
18. Chaszczewska-Markowska, M., M. Sagan, and K. Bogunia-Kubik, *The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) - physiology and molecular mechanisms of functioning*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016. **70**(0): p. 917-927.
19. Marques-Neto, S.R., et al., *AT1 and aldosterone receptors blockade prevents the chronic effect of nandrolone on the exercise-induced cardioprotection in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion*. Cardiovasc Drugs Ther, 2014. **28**(2): p. 125-35.
20. Rodriguez-Lara, S.Q., L. Garcia-Benavides, and A.G. Miranda-Diaz, *The Renin-Angiotensin-Aldosterone System as a Therapeutic Target in Late Injury Caused by Ischemia-Reperfusion*. Int J Endocrinol, 2018. **2018**: p. 3614303.
21. Schulz, R. and G. Heusch, *Review: AT 1-receptor blockade in experimental myocardial ischaemia/reperfusion*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2001. **2**(1_suppl): p. S136-S140.
22. Su, Q., et al., *Renin-angiotensin system acting on reactive oxygen species in paraventricular nucleus induces sympathetic activation via AT1R/PKCgamma/Rac1 pathway in salt-induced hypertension*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43107.
23. Yang, J., et al., *Renin-angiotensin system activation accelerates atherosclerosis in experimental renal failure by promoting endoplasmic reticulum stress-related inflammation*. Int J Mol Med, 2017. **39**(3): p. 613-621.
24. Yang, K.K., et al., *Interaction of renin-angiotensin system and adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling pathway in renal carcinogenesis of uninephrectomized rats*. Tumour Biol, 2017. **39**(5): p. 1010428317699116.
25. Yang, T. and C. Xu, *Physiology and Pathophysiology of the Intrarenal Renin-Angiotensin System: An Update*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(4): p. 1040-1049.
26. Samani, N.J. and J.D. Swales, *Molecular biology of the vascular renin-angiotensin system*. Blood Vessels, 1991. **28**(1-3): p. 210-6.
27. Pessina, A.C. and G. Rossi, *[Molecular biology and cardiac and vascular changes in hypertension: focus on the renin-angiotensin system]*. Ann Ital Med Int, 1994. **9** Suppl: p. 5S-14S.

28. De Mello, W.C., *Local Renin Angiotensin Aldosterone Systems and Cardiovascular Diseases*. Med Clin North Am, 2017. **101**(1): p. 117-127.
29. Mann, S., et al., *Effects of acute angiotensin II on ischemia reperfusion injury following myocardial infarction*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2015. **16**(1): p. 13-22.
30. Pendergrass, K.D., et al., *The angiotensin II-AT1 receptor stimulates reactive oxygen species within the cell nucleus*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **384**(2): p. 149-54.
31. Ocaranza, M.P., et al., *Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis*. J Hypertens, 2014. **32**(4): p. 771-83.
32. Kawai, T., et al., *AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system*. Pharmacol Res, 2017. **125**(Pt A): p. 4-13.
33. Song, M.A., C. Dasgupta, and L. Zhang, *Chronic Losartan Treatment Up-Regulates AT1R and Increases the Heart Vulnerability to Acute Onset of Ischemia and Reperfusion Injury in Male Rats*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132712.
34. Flynn, J.D. and W.S. Akers, *Effects of the angiotensin II subtype 1 receptor antagonist losartan on functional recovery of isolated rat hearts undergoing global myocardial ischemia-reperfusion*. Pharmacotherapy, 2003. **23**(11): p. 1401-10.
35. Cheng, H.F., et al., *Angiotensin II upregulates type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2012-9.
36. Yang, B.C., et al., *Critical role of AT1 receptor expression after ischemia/reperfusion in isolated rat hearts: beneficial effect of antisense oligodeoxynucleotides directed at AT1 receptor mRNA*. Circ Res, 1998. **83**(5): p. 552-9.
37. Garrido, A.M. and K.K. Griendling, *NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **302**(2): p. 148-58.
38. Anupama, V., et al., *Molecular mechanisms in H₂O₂-induced increase in AT1 receptor gene expression in cardiac fibroblasts: A role for endogenously generated Angiotensin II*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **97**: p. 295-305.
39. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
40. El-Adawi, H., et al., *The functional role of the JAK-STAT pathway in post-infarction remodeling*. Cardiovasc Res, 2003. **57**(1): p. 129-38.
41. Qiu, X., et al., *Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation*. Cell Metab, 2010. **12**(6): p. 662-7.
42. Yoshiyama, M., et al., *Cardioprotective effect of the angiotensin II type 1 receptor antagonist TCV-116 on ischemia-reperfusion injury*. Am Heart J, 1994. **128**(1): p. 1-6.

43. Zughuib, M.E., J.Z. Sun, and R. Bolli, *Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on myocardial ischemia/reperfusion injury: an overview*. Basic Res Cardiol, 1993. **88 Suppl 1**: p. 155-67.
44. Kobara, M., et al., *Effects of ACE inhibition on myocardial apoptosis in an ischemia-reperfusion rat heart model*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **41(6)**: p. 880-9.
45. Scholkens, B.A. and W. Linz, *[ACE inhibition: mechanisms of "cardioprotection" in acute myocardial ischemia]*. Klin Wochenschr, 1991. **69 Suppl 24**: p. 1-5.
46. Scholkens, B.A., W. Linz, and P.A. Martorana, *Experimental cardiovascular benefits of angiotensin-converting enzyme inhibitors: beyond blood pressure reduction*. J Cardiovasc Pharmacol, 1991. **18 Suppl 2**: p. S26-30.
47. Volpe, M., A. Battistoni, and V. Mastromarino, *Natriuretic peptides and volume handling in heart failure: the paradigm of a new treatment*. Eur J Heart Fail, 2016. **18(4)**: p. 442-4.
48. Volpe, M., M. Carnovali, and V. Mastromarino, *The natriuretic peptides system in the pathophysiology of heart failure: from molecular basis to treatment*. Clin Sci (Lond), 2016. **130(2)**: p. 57-77.
49. Der Sarkissian, S., et al., *ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases*. Prog Biophys Mol Biol, 2006. **91(1-2)**: p. 163-98.
50. Kittana, N., *Angiotensin-converting enzyme 2-Angiotensin 1-7/1-9 system: novel promising targets for heart failure treatment*. Fundam Clin Pharmacol, 2018. **32(1)**: p. 14-25.
51. Cha, S.A., B.M. Park, and S.H. Kim, *Angiotensin-(1-9) ameliorates pulmonary arterial hypertension via angiotensin type II receptor*. Korean J Physiol Pharmacol, 2018. **22(4)**: p. 447-456.
52. Gonzalez, L., et al., *Angiotensin-(1-9) reduces cardiovascular and renal inflammation in experimental renin-independent hypertension*. Biochem Pharmacol, 2018. **156**: p. 357-370.
53. Ocaranza, M.P., et al., *Recent insights and therapeutic perspectives of angiotensin-(1-9) in the cardiovascular system*. Clin Sci (Lond), 2014. **127(9)**: p. 549-57.
54. Donoghue, M., et al., *A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9*. Circ Res, 2000. **87(5)**: p. E1-9.
55. Westermeier, F., et al., *Novel players in cardioprotection: Insulin like growth factor-1, angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9)*. Pharmacol Res, 2015. **101**: p. 41-55.
56. Drummer, O.H., S. Kourtis, and H. Johnson, *Effect of chronic enalapril treatment on enzymes responsible for the catabolism of angiotensin I and formation of angiotensin II*. Biochem Pharmacol, 1990. **39(3)**: p. 513-8.
57. Norambuena-Soto, I., et al., *Angiotensin-(1-9) in hypertension*. Biochem Pharmacol, 2022. **203**: p. 115183.

58. Delbridge, L.M., L.A. Bienvenu, and K.M. Mellor, *Angiotensin-(1-9): New Promise for Post-Infarct Functional Therapy*. J Am Coll Cardiol, 2016. **68**(24): p. 2667-2669.
59. Mendoza-Torres, E., et al., *Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion injury by angiotensin-(1-9) through an AT2R and Akt-dependent mechanism*. Pharmacol Res, 2018. **135**: p. 112-121.
60. Ocaranza, M.P., et al., *Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro*. J Hypertens, 2010. **28**(5): p. 1054-64.
61. Namsolleck, P., et al., *AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications*. Curr Hypertens Rep, 2014. **16**(2): p. 416.
62. Widdop, R.E., et al., *Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype?* Br J Pharmacol, 2003. **140**(5): p. 809-24.
63. Ali, Q., S. Patel, and T. Hussain, *Angiotensin AT2 receptor agonist prevents salt-sensitive hypertension in obese Zucker rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **308**(12): p. F1379-85.
64. Ali, Q., Y. Wu, and T. Hussain, *Chronic AT2 receptor activation increases renal ACE2 activity, attenuates AT1 receptor function and blood pressure in obese Zucker rats*. Kidney Int, 2013. **84**(5): p. 931-9.
65. Lange, C., et al., *AT2R (Angiotensin AT2 Receptor) Agonist, Compound 21, Prevents Abdominal Aortic Aneurysm Progression in the Rat*. Hypertension, 2018. **72**(3): p. e20-e29.
66. Matavelli, L.C. and H.M. Siragy, *AT2 receptor activities and pathophysiological implications*. J Cardiovasc Pharmacol, 2015. **65**(3): p. 226-32.
67. Matavelli, L.C., R. Zatz, and H.M. Siragy, *A nonpeptide angiotensin II type 2 receptor agonist prevents renal inflammation in early diabetes*. J Cardiovasc Pharmacol, 2015. **65**(4): p. 371-6.
68. Ocaranza, M.P., et al., *Effect of hypertension on angiotensin-(1-7) levels in rats with different angiotensin-I converting enzyme polymorphism*. Life Sci, 2006. **78**(14): p. 1535-42.
69. Karnik, S.S., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli [corrected]*. Pharmacol Rev, 2015. **67**(4): p. 754-819.
70. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 415-72.
71. Zhang, H., et al., *Structural basis for selectivity and diversity in angiotensin II receptors*. Nature, 2017. **544**(7650): p. 327-332.
72. Asada, H., et al., *Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog*. Nat Struct Mol Biol, 2018. **25**(7): p. 570-576.
73. Patel, S.N., et al., *Angiotensin II Type 2 Receptor and Receptor Mas Are Colocalized and Functionally Interdependent in Obese Zucker Rat Kidney*. Hypertension, 2017. **70**(4): p. 831-838.

74. Hallberg, M., J. Savmarker, and A. Hallberg, *Angiotensin Peptides as AT2 Receptor Agonists*. *Curr Protein Pept Sci*, 2017. **18**(8): p. 809-818.
75. Asada, H., et al., *The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone*. *Structure*, 2020. **28**(4): p. 418-425 e4.
76. Suomivuori, C.M., et al., *Molecular mechanism of biased signaling in a prototypical G protein-coupled receptor*. *Science*, 2020. **367**(6480): p. 881-887.
77. Wingler, L.M., et al., *Angiotensin and biased analogs induce structurally distinct active conformations within a GPCR*. *Science*, 2020. **367**(6480): p. 888-892.
78. Porrello, E.R., L.M. Delbridge, and W.G. Thomas, *The angiotensin II type 2 (AT2) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009. **14**(3): p. 958-72.
79. Ahmed, H.A., et al., *Angiotensin receptor (AT2R) agonist C21 prevents cognitive decline after permanent stroke in aged animals-A randomized double-blind pre-clinical study*. *Behav Brain Res*, 2019. **359**: p. 560-569.
80. Cotter, G., et al., *Relationship between baseline systolic blood pressure and long-term outcomes in acute heart failure patients treated with TRV027: an exploratory subgroup analysis of BLAST-AHF*. *Clin Res Cardiol*, 2018. **107**(2): p. 170-181.
81. Vasile, S., et al., *Evolution of Angiotensin Peptides and Peptidomimetics as Angiotensin II Receptor Type 2 (AT2) Receptor Agonists*. *Biomolecules*, 2020. **10**(4).
82. Noda, K., Y. Saad, and S.S. Karnik, *Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(48): p. 28511-4.
83. Gao, J., et al., *Ontogeny of angiotensin type 2 and type 1 receptor expression in mice*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2012. **13**(3): p. 341-52.
84. Wang, X., et al., *Cross-talk between inflammation and angiotensin II: studies based on direct transfection of cardiomyocytes with AT1R and AT2R cDNA*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012. **237**(12): p. 1394-401.
85. Horiuchi, M., J.Y. Lehtonen, and L. Daviet, *Signaling Mechanism of the AT2 Angiotensin II Receptor: Crosstalk between AT1 and AT2 Receptors in Cell Growth*. *Trends Endocrinol Metab*, 1999. **10**(10): p. 391-396.
86. De Paolis, P., et al., *Functional cross-talk between angiotensin II and epidermal growth factor receptors in NIH3T3 fibroblasts*. *J Hypertens*, 2002. **20**(4): p. 693-9.
87. Yang, J., et al., *Angiotensin II AT(2) receptor decreases AT(1) receptor expression and function via nitric oxide/cGMP/Sp1 in renal proximal tubule cells from Wistar-Kyoto rats*. *J Hypertens*, 2012. **30**(6): p. 1176-84.
88. AbdAlla, S., et al., *The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(43): p. 39721-6.

89. Zavadil, J., et al., *Epithelial-mesenchymal transition*. *Cancer Res*, 2008. **68**(23): p. 9574-7.
90. Galindo, M., et al., *Coexpression of AT1 and AT2 receptors by human fibroblasts is associated with resistance to angiotensin II*. *Peptides*, 2005. **26**(9): p. 1647-53.
91. Kaschina, E., P. Namsolleck, and T. Unger, *AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases*. *Pharmacol Res*, 2017. **125**(Pt A): p. 39-47.
92. Savoia, C., L. Sada, and M. Volpe, *Blood pressure control versus atrial fibrillation management in stroke prevention*. *Curr Hypertens Rep*, 2015. **17**(6): p. 553.
93. Chen, Q., et al., *JNK/PI3K/Akt signaling pathway is involved in myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats: effects of salvianolic acid A intervention*. *Am J Transl Res*, 2016. **8**(6): p. 2534-48.
94. Potteti, H.R., et al., *Nrf2-AKT interactions regulate heme oxygenase 1 expression in kidney epithelia during hypoxia and hypoxia-reoxygenation*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016. **311**(5): p. F1025-F1034.
95. Zhang, W., et al., *Diterpene ginkgolides protect against cerebral ischemia/reperfusion damage in rats by activating Nrf2 and CREB through PI3K/Akt signaling*. *Acta Pharmacol Sin*, 2018. **39**(8): p. 1259-1272.
96. Xu, X., et al., *Neuroprotective effect of humanin on cerebral ischemia/reperfusion injury is mediated by a PI3K/Akt pathway*. *Brain Res*, 2008. **1227**: p. 12-8.
97. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. *J Cell Mol Med*, 2005. **9**(1): p. 59-71.
98. Bao, S., et al., *Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(4): p. 329-39.
99. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. *Cell*, 1997. **91**(2): p. 231-41.
100. Peso, L.d., et al., *Interleukin-3-Induced Phosphorylation of BAD Through the Protein Kinase Akt*. 1997. **278**(5338): p. 687-689.
101. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. *Science*, 2002. **298**(5600): p. 1911-2.
102. Kim, A.H., et al., *Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(3): p. 893-901.
103. Burgering, B.M. and R.H. Medema, *Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty*. *J Leukoc Biol*, 2003. **73**(6): p. 689-701.
104. Barkett, M. and T.D. Gilmore, *Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors*. *Oncogene*, 1999. **18**(49): p. 6910-24.
105. Kane, L.P., et al., *Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase*. *Curr Biol*, 1999. **9**(11): p. 601-4.

106. Lauder, A., A. Castellanos, and K. Weston, *c-Myb transcription is activated by protein kinase B (PKB) following interleukin 2 stimulation of T cells and is required for PKB-mediated protection from apoptosis*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(17): p. 5797-805.
107. Oren, M., *Decision making by p53: life, death and cancer*. Cell Death Differ, 2003. **10**(4): p. 431-42.
108. Zheng, L., et al., *Downregulation of wild-type p53 protein by HER-2/neu mediated PI3K pathway activation in human breast cancer cells: its effect on cell proliferation and implication for therapy*. Cell Res, 2004. **14**(6): p. 497-506.
109. Mayo, L.D. and D.B. Donner, *A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11598-603.
110. Gottlieb, T.M., et al., *Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(8): p. 1299-303.
111. Fosgerau, K. and T. Hoffmann, *Peptide therapeutics: current status and future directions*. Drug Discov Today, 2015. **20**(1): p. 122-8.
112. Otvos, L., Jr. and J.D. Wade, *Current challenges in peptide-based drug discovery*. Front Chem, 2014. **2**: p. 62.
113. Matsui, T., et al., *Tissue distribution of antihypertensive dipeptide, Val-Tyr, after its single oral administration to spontaneously hypertensive rats*. J Pept Sci, 2004. **10**(9): p. 535-45.
114. Alminana, N., et al., *Synthesis and physicochemical study of the laminin active sequence: SIKVAV*. J Colloid Interface Sci, 2003. **263**(2): p. 432-40.
115. Alminana, N., et al., *In vitro effects of SIKVAV retro and retro-enantio analogues on tumor metastatic events*. Peptides, 2004. **25**(2): p. 251-9.
116. Ben-Yedidia, T., et al., *A retro-inverso peptide analogue of influenza virus hemagglutinin B-cell epitope 91-108 induces a strong mucosal and systemic immune response and confers protection in mice after intranasal immunization*. Mol Immunol, 2002. **39**(5-6): p. 323-31.
117. Grillo-Bosch, D., et al., *Retro-enantio N-methylated peptides as beta-amyloid aggregation inhibitors*. ChemMedChem, 2009. **4**(9): p. 1488-94.
118. Prades, R., et al., *Applying the retro-enantio approach to obtain a peptide capable of overcoming the blood-brain barrier*. Angew Chem Int Ed Engl, 2015. **54**(13): p. 3967-72.
119. Rai, J., *Retroinverso mimetics of S peptide*. Chem Biol Drug Des, 2007. **70**(6): p. 552-6.
120. Rai, J., *Interaction energy analysis of peptide can predict the possibilities of mimetics by its retroinverso isomer*. Chem Biol Drug Des, 2009. **74**(5): p. 483-7.
121. Rai, J., *Peptide and protein mimetics by retro and retroinverso analogs*. Chem Biol Drug Des, 2019. **93**(5): p. 724-736.

122. Fletcher, M.D. and M.M. Campbell, *Partially Modified Retro-Inverso Peptides: Development, Synthesis, and Conformational Behavior*. Chem Rev, 1998. **98**(2): p. 763-796.
123. Feng, Z. and B. Xu, *Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches*. Biomol Concepts, 2016. **7**(3): p. 179-87.
124. Guichard, G., et al., *Antigenic mimicry of natural L-peptides with retro-inverso-peptidomimetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9765-9.
125. Schumacher, T.N., et al., *Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display*. Science, 1996. **271**(5257): p. 1854-7.
126. Liu, M., et al., *D-Peptides as Recognition Molecules and Therapeutic Agents*. 2016. **16**(4): p. 1772-1786.
127. Van Regenmortel, M.H. and S. Muller, *D-peptides as immunogens and diagnostic reagents*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(4): p. 377-82.
128. Ghaleb, A., et al., *Discovery of Novel 1, 2, 3-Triazole Analogues as Anti-Tuberculosis agents Using 3D QSAR, Molecular Docking, and In Silico ADMET Screening*. 2019. **6**(1): p. -.
129. Salomon-Ferrer, R., et al., *Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald*. J Chem Theory Comput, 2013. **9**(9): p. 3878-88.
130. Lee, J., et al., *CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans*. J Chem Theory Comput, 2019. **15**(1): p. 775-786.
131. Preto, M.A.C., et al., *Molecular Dynamics Simulations of Angiotensin II in Aqueous and Dimethyl Sulfoxide Environments*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(37): p. 17743-17751.
132. Berendsen, H., et al., *Molecular-Dynamics with Coupling to An External Bath*. The Journal of Chemical Physics, 1984. **81**: p. 3684.
133. Aumelas, A., et al., *Studies on angiotensin II and analogs: impact of substitution in position 8 on conformation and activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(7): p. 1881-5.
134. Lintner, K., et al., *Circular dichroism studies of angiotensin II and analogs: effects of primary sequence, solvent, and pH on the side-chain conformation*. Biochemistry, 1977. **16**(4): p. 806-812.
135. Sakarellos, C., et al., *Conformation of the central sequence of angiotensin II and analogs*. 1983. **22**(2): p. 663-687.
136. Piriou, F., et al., *Amino acid side chain conformation in angiotensin II and analogs: Correlated results of circular dichroism and ¹H nuclear magnetic resonance*. 1980. **77**(1): p. 82-86.
137. Zhou, N., G.J. Moore, and H.J. Vogel, *Proton NMR studies of angiotensin II and its analogs in aqueous solution*. Journal of Protein Chemistry, 1991. **10**(3): p. 333-343.

138. Case, D.A., et al., *The Amber biomolecular simulation programs*. J Comput Chem, 2005. **26**(16): p. 1668-88.
139. Bairoch, A. and R. Apweiler, *The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(1): p. 49-54.
140. Ghanouni, P., et al., *The effect of pH on beta(2) adrenoceptor function. Evidence for protonation-dependent activation*. J Biol Chem, 2000. **275**(5): p. 3121-7.
141. Jo, S., et al., *CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation*. J Comput Chem, 2017. **38**(15): p. 1114-1124.
142. Lee, J., et al., *CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field*. J Chem Theory Comput, 2016. **12**(1): p. 405-13.
143. Jo, S., et al., *CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM*. J Comput Chem, 2008. **29**(11): p. 1859-65.
144. Hopkins, C.W., et al., *Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2015. **11**(4): p. 1864-1874.
145. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
146. Riquelme, J.A., et al., *Dexmedetomidine protects the heart against ischemia-reperfusion injury by an endothelial eNOS/NO dependent mechanism*. Pharmacological Research, 2016. **103**: p. 318-327.
147. Okumura, H. and Y. Okamoto, *Temperature and pressure dependence of alanine dipeptide studied by multibaric-multithermal molecular dynamics simulations*. J Phys Chem B, 2008. **112**(38): p. 12038-49.
148. Milorey, B., et al., *Short peptides as predictors for the structure of polyarginine sequences in disordered proteins*. Biophys J, 2021. **120**(4): p. 662-676.
149. Roccatano, D., et al., *Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study*. 2002. **99**(19): p. 12179-12184.
150. Luo, Z., X. Zhao, and S. Zhang, *Structural dynamic of a self-assembling peptide d-EAK16 made of only D-amino acids*. PLoS One, 2008. **3**(5): p. e2364.
151. Barnwal, R.P., et al., *Rapid measurement of 3J(H N-H alpha) and 3J(N-H beta) coupling constants in polypeptides*. J Biomol NMR, 2007. **39**(4): p. 259-63.
152. Arranz-Gibert, P., et al., *Immunosilencing peptides by stereochemical inversion and sequence reversal: retro-D-peptides*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 6446.
153. Tzakos, A.G., et al., *On the molecular basis of the recognition of angiotensin II (AII). NMR structure of AII in solution compared with the X-*

- ray structure of All bound to the mAb Fab131. Eur J Biochem, 2003. **270**(5): p. 849-60.
154. de Brevern, A.G., *Extension of the classical classification of beta-turns*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 33191.
 155. Whitby, L.R., et al., *Design, synthesis, and validation of a beta-turn mimetic library targeting protein-protein and peptide-receptor interactions*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(26): p. 10184-94.
 156. Miura, S., et al., *Molecular mechanism underlying inverse agonist of angiotensin II type 1 receptor*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 19288-95.
 157. Zhang, D., et al., *Structural insights into angiotensin receptor signaling modulation by balanced and biased agonists*. EMBO J, 2023. **42**(11): p. e112940.
 158. Hou, T., et al., *Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations*. J Chem Inf Model, 2011. **51**(1): p. 69-82.
 159. Sun, H., et al., *Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 7. Entropy effects on the performance of end-point binding free energy calculation approaches*. Phys Chem Chem Phys, 2018. **20**(21): p. 14450-14460.
 160. Sun, H., et al., *Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 4. Accuracies of MM/PBSA and MM/GBSA methodologies evaluated by various simulation protocols using PDBbind data set*. Phys Chem Chem Phys, 2014. **16**(31): p. 16719-29.
 161. Weng, G., et al., *Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 9. Prediction reliability of binding affinities and binding poses for protein-peptide complexes*. Phys Chem Chem Phys, 2019. **21**(19): p. 10135-10145.
 162. Genheden, S. and U. Ryde, *The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities*. Expert Opin Drug Discov, 2015. **10**(5): p. 449-61.
 163. Flores-Munoz, M., et al., *Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 4): p. 939-51.
 164. Bissantz, C., B. Kuhn, and M. Stahl, *A medicinal chemist's guide to molecular interactions*. J Med Chem, 2010. **53**(14): p. 5061-84.
 165. Flores, Y., Zapata-Torres, G., Nuñez, A., Matthies, DJ., Alemán, L., Hernández-Fuentes, CP., Sánchez, G., Araya, E., Guzman, F., Guardiola, S., Varesse, M., Giralt, E., Chiong, M., Hill, J., Ocaranza, MP., Kogan, M., Lavandero, S. *Angiotensin-(1-9) Retro-enantio Peptide with Cardio-protective Activity. Circulation*. 2023. Under revision (#: CIRCULATIONAHA/2022/061322). Este trabajo fue escrito según el de los autores citados, además del trabajo de las siguientes tesis de pregrado y magíster:

- 165.a. Nuñez, Agustín (2019). Evaluación de estabilidad y bioactividad del péptido retro-enantio análogo de angiotensina-(1-9), Tesis de pregrado para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile.
- 165.b. Alemán, Larissa (2021). Estudio de la acción del enantio-retro de angiotensina-(1-9) en la muerte del cardiomiocito inducida por reperfusión posterior a isquemia simulada. Tesis de postgrado para optar al grado de Magíster en Fisiología, Universidad de Chile.