



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Evaluación de estabilidad y bioactividad del péptido retro-enantio análogo de angiotensina-(1-9)

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

AGUSTIN ANDRES NUÑEZ ALISTE

Profesor patrocinante

Dr. Sergio Lavandero González

Laboratorio de Transducción de Señales
del Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular

Directores de memoria

Dr. Marcelo Kogan

Laboratorio de Nanotecnología Departamento de
Química Farmacológica y Toxicológica

Dr. Sergio Lavandero González

Laboratorio de Transducción de Señales del
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

SANTIAGO DE CHILE

2019

Esta memoria de pregrado se llevó a cabo en los Laboratorios de Nanotecnología del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, dirigido por Dr. Marcelo J. Kogan, y de Transducción de Señales, dirigido por el Dr. Sergio Lavandero, los cuales pertenecen al Centro Avanzado en Enfermedades Crónicas (ACCDiS) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Para su realización, este trabajo contó con el apoyo y financiamiento del proyecto FONDAP 15130011 a SL y MK

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por darme la oportunidad de estudiar y porque estuvo conmigo cada día de este periodo.

A mis directores de tesis al Profesor Marcelo Kogan y al Profesor Sergio Lavandero por la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto por su experiencia entregada y por la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo.

Al laboratorio de transducción de señales que fue donde pase la mayor cantidad de tiempo en la realización de mi tesis, gracias por la buena onda por integrarme al grupo y por ayudarme siempre que lo necesite. Un agradecimiento especial a Valeria Garrido quien fue la persona que me recibió y entregó los conocimientos necesarios para la realización de mis experimentos.

A mis amigos de la universidad que siempre fue un agrado tenerlos a mi lado no solo en el estudio sino también en los momentos de dispersión y apoyo mutuo. En especial a Braulio, Ignacio y Felipe que fue con los que me mantuve hasta el final de la carrera.

A Walter y Bridgette por su amistad y amor entregado hacia mí estando en todo este proceso, por apoyarme y animarme, desafiándome a dar todo de mí y cumplir mis metas.

A Felipe y Dorita por sus sabios consejos y amistad incondicional que he logrado compartir en estos últimos años. A Cesar y Manuel por el apoyo y amistad que compartíamos sobre todo en nuestros momentos de recreación. En general a todo el grupo de jóvenes vida abundante por las alegrías y momentos vividos.

A Loreto mi novia que sin esperarlo se convirtió en mi compañera en este largo proceso y en mi vida, siendo la persona de la cual me enamore, por ayudarme en cada momento, por su amor y compañía incondicional.

Finalmente, a mi familia, mi hermana Rocío por el apoyo y su amor, agradecerles infinitamente a mis Padres, Claudio y Rosa, por la crianza que me dieron por el apoyo brindado a mi vida. Todo lo que he logrado es fruto del esfuerzo y amor que han depositado en mí.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Enfermedades cardiovasculares	12
1.2. Hipertrofia cardiaca.....	13
1.3. Sistema renina-angiotensina (SRA) clásico.....	15
Figura 2. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Vías canónica y alternativa.	16
1.4. Sistema renina angiotensina alternativo	16
1.5. Angiotensina-(1-9).....	17
1.6. Angiotensina-(1-9) e hipertrofia cardiaca.....	18
1.7 Estrategias para aumentar la estabilidad de los péptidos en sistemas biológicos	19
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVO GENERAL	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. METODOLOGÍA.....	24
Reactivos	24
Síntesis de péptidos	24

Tratamiento de la resina	25
Acople del primer aminoácido	25
Evaluación de la estabilidad de los péptidos por HPLC	26
Modelo experimental.....	27
Cultivos primarios de cardiomiocitos ratas neonatas.	27
Estímulo hipertrófico	28
Preparación de extractos totales.	28
Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.	29
Western blot.....	29
Microscopia de epifluorescencia.	30
Análisis estadístico.....	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Objetivo 1: evaluar estabilidad de retro-enantio Ang-(1-9) en suero humano y compararla con la de Ang-(1-9).....	32
6.2. Objetivo 2: Estudiar la actividad antihipertrófica del retro-enantio Ang-(1-9) en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata y si esta actividad depende del AT2R.	37
6.3. Comparación de actividad de Ang-(1-9) vs retro-enantio Ang-(1-9).	41
6.4. Evaluación del papel del receptor AT2R y Mas en los efectos del retro-enantiómero Ang-(1-9)	43
7. DISCUSIÓN	48
Modificación retro-enantio de Ang-(1-9) como metodología para aumentar su estabilidad.....	50
Bioactividad del péptido retro-enantio de Ang-(1-9).....	51
Evaluación de la participación de AT2R y Mas en la acción del retro-enantio Ang-(1-9).....	53
8. Conclusiones	55
9. Bibliografía.....	56
10. Figuras suplementarias	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del cardiomiocito en la hipertrofia e insuficiencia cardiaca..	13
Figura 2. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Vías canónica y alternativa.	16
Figura 3. Ilustración esquemática de la influencia de transformaciones peptídicas en la orientación de cadenas laterales en un tetra péptido.	22
Figura 4. Estructura química de los péptidos utilizados en los experimentos de estabilidad.....	33
Figura 5. Cromatogramas representativos Angiotensina-(1-9) y retro-enantio de Angiotensina-(1-9).	35
Figura 6. Porcentaje remanente de péptidos ..	36
Figura 7. Efecto de RE-(1-9) en distintas concentraciones sobre los niveles de β-MHC y ANP.	38
Figura 8. Efecto del RE-(1-9) en los aumentos del área y perímetro de cardiomiocitos estimulados con NE.	40
Figura 9. Comparación Ang-(1-9) y RE-(1-9).	42
Figura 10. Participación del ATR2 en la actividad antihipertrófica del retro-enantio de Ang-(1-9).....	45
Figura 11. Participación del Receptor Mas en la actividad antihipertrófica del retro-enantiómero de Ang-(1-9).	47

ABREVIATURAS

µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
µM	: Micromolar
Ang I	: Angiotensina I
Ang II	: Angiotensina II
Ang-(1-9)	: Angiotensina (1-9)
Ang-(1-7)	: Angiotensina (1-7)
ANP	: Péptido natriurético auricular
AT1R	: Receptor de angiotensina subtipo 1
AT2R	: Receptor de angiotensina subtipo 2
β-MHC	: Cadena pesada de la beta-miosina
DCM	: Diclorometano
DIEA	: Diisopropiletilamina
DME	: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	: N.N'-Dimetilformamida
ECA	: Enzima convertidora de angiotensina I
ECA2	: Enzima homóloga a convertidora de angiotensina I
ECV	: Enfermedades cardiovasculares
FBS	: Suero fetal bovino
HC	: Hipertrofia cardiaca
MM	: Medio de mantención
NE	: Norepinefrina
PBS	: Tampón de fosfato salino
SFB	: Suero fetal bovino
RE-(1-9)	: Retro-enantiómero de angiotensina-(1-9)
SCV	: Sistema Cardiovascular
SRA	: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

RESUMEN

Las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo, y cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Estas enfermedades tienen como característica común un crecimiento hipertrófico inicial del tejido cardíaco en respuesta a una mayor demanda de trabajo. La hipertrofia patológica se asocia con deterioro de la función ventricular junto con las diversas alteraciones en la estructura del miocardio, evolucionando habitualmente a insuficiencia cardíaca, por lo que es de vital importancia su prevención o progresión. El descubrimiento de los péptidos angiotensina-(1-7) y angiotensina-(1-9) de la vía no canónica del sistema renina-angiotensina-aldosterona (sistema hormonal que regula la homeostasis cardiovascular) y sus acciones anti-fibrótica, anti-hipertensiva y anti-hipertrófica, los han posicionado como potenciales agentes terapéuticos y como una nueva alternativa para el tratamiento de ECV, incluyendo la hipertrofia cardíaca patológica. Sin embargo, la mayoría de los péptidos aunque son moléculas muy activas poseen una vida media corta, siendo degradados fácilmente por enzimas, lo que dificulta sus aplicaciones en terapia. Una estrategia para diseñar péptidos estables a la degradación de proteasas es la síntesis de análogos retro-enantio, que consiste en unir D-aminoácidos, no naturales y, además, invertir el orden de los aminoácidos respecto a la secuencia original. De esta forma los D-aminoácidos no son reconocidos por las proteasas aumentándose así su vida media. El objetivo del presente estudio consistió en determinar si el péptido retro-enantio de angiotensina-(1-9) aumenta su estabilidad en suero, manteniendo su actividad anti-hipertrófica e investigar

si sus efectos son mediados a través del receptor AT2. Los resultados mostraron que el péptido retro-enantio de angiotensina-(1-9) presenta una mayor estabilidad a la hidrólisis por suero con respecto al péptido original. Además, el retro-enantio de angiotensina-(1-9) previno el efecto prohipertrófico de norepinefrina en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata. La pre-incubación con el antagonista del receptor MAS A779 mantuvo la actividad anti-hipertrófica del péptido retro-enantio, no así la pre-incubación con el antagonista del receptor AT2 PD 123:319.

En conclusión, el péptido retro-enantio de angiotensina-(1-9) presenta una mayor estabilidad a la degradación enzimática y conserva su actividad anti-hipertrófica, siendo esta última acción dependiente del receptor AT2.

ABSTRACT

Evaluation of stability and bioactivity of the retro-enantio analog of angiotensin-(1-9)

CVD is the leading cause of death worldwide, and more people die every year from CVD than from any other cause. The common feature of these diseases is an initial hypertrophic growth of cardiac tissue in response to a greater demand for work. Pathological hypertrophy is associated with deterioration of ventricular function along with various alterations in the structure of the myocardium, usually evolving to heart failure, so its prevention or progression is of vital importance. The discovery of the angiotensin- (1-7) and angiotensin- (1-9) peptides of the non-canonical pathway of the renin angiotensin-aldosterone system (the hormonal system that regulates cardiovascular homeostasis) and its anti-fibrotic, anti-hypertensive actions and anti-hypertrophic, they have positioned them as potential therapeutic agents and as a new alternative for the treatment of CVD, including pathological cardiac hypertrophy. However, most of the peptides, although they are very active molecules, have a short half-life, being easily degraded by enzymes, which makes their applications in therapy difficult. One strategy for designing stable peptides to the degradation of proteases is the synthesis of retro-enantio analogs, which consists of binding D-amino acids, not natural and, in addition, reversing the order of the amino acids with respect to the original sequence. In this way the D-amino acids are not recognized by the proteases, thus increasing their half-life. The objective of the present study was to determine if the retro-enantio peptide of angiotensin- (1-9) increases its stability in serum, maintaining its anti-hypertrophic activity and investigating if its effects are mediated

through the AT2 receptor. The results showed that the retro-enantio peptide of angiotensin- (1-9) has a greater stability to the hydrolysis by serum with respect to the original peptide. In addition, the retro-enantio of angiotensin- (1-9) prevented the prohypertrophic effect of norepinephrine in primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes. The pre-incubation with the MAS A779 receptor antagonist maintained the anti-hypertrophic activity of the retro-enantio peptide, but not the pre-incubation with the AT2 receptor antagonist PD 123.319.

In conclusion, the retro-enantio peptide of angiotensin- (1-9) has a greater stability to enzymatic degradation and retains its anti-hypertrophic activity, the latter action being dependent on the AT2 receptor

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en todo el mundo; cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa según cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS) **(OMS. Nota descriptiva. 2015.)** Estas corresponden a un grupo de patologías crónicas que afectan al corazón y/o vasos sanguíneos, entre las que se cuentan a la hipertensión arterial, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca, angina, infarto del miocardio, cardiopatía congénita, entre otras. Todas tienen en común el crecimiento hipertrófico del corazón en respuesta a una mayor demanda de trabajo o estrés celular **(Mishra et al., 2010)** **(Figura 1)**, cuya etapa final es la insuficiencia cardíaca, patología altamente incapacitante asociada a una elevada mortalidad, necesidad de hospitalizaciones, deterioro en la calidad de vida y consumo de recursos **(Castro et al., 2004)**. Siendo la hipertrofia cardíaca uno de los factores de riesgo para el desarrollo de insuficiencia cardíaca, es importante la prevención de su progresión **(Ministerio de Salud 2015; Nakamura & Sadoshima. 2018)**.

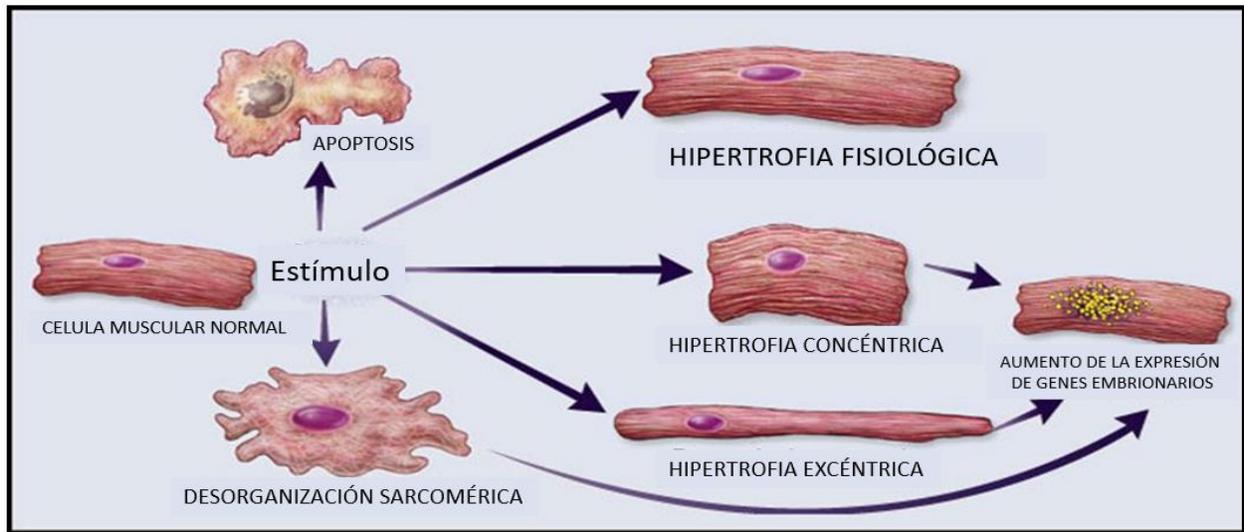


Figura 1. Morfología del cardiomiocito en la hipertrofia e insuficiencia cardiaca. Modificado de JJ Hunter & KR Chien. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure, New England Journal of Medicine 341; 1276-1283, 1999.

1.2. Hipertrofia cardiaca

Biológicamente, la hipertrofia cardiaca (HC) se define como el aumento individual del tamaño del cardiomiocito que trae como consecuencia un incremento en el tamaño y el peso del corazón (**Morales et al., 1999**).

El tejido cardíaco está compuesto por distintos tipos celulares entre los cuales se distinguen principalmente cardiomiocitos, células endoteliales y en menor proporción células vasculares del endotelio y fibroblastos (**Zhou et al., 2016**). Los cardiomiocitos son los responsables del trabajo contráctil y conforman entre el 30-40 % del número total de células, pero ocupan aproximadamente un 75 % del volumen cardíaco (**Vliegen et al., 1991, Van Wamel et al., 2001**). Estas células proliferan activamente durante la etapa fetal, manifestando capacidad contráctil a muy temprana edad. Sin embargo, su actividad mitótica disminuye en etapas tardías de la embriogénesis, para reducirse casi

completamente después del nacimiento (**Nadal-Ginard 2001**). Si bien los cardiomiocitos pierden la capacidad de proliferar tempranamente luego del nacimiento, por ser células altamente diferenciadas (**Reiss et al., 1993; Kajtura et al., 1994**), responden a estímulos que promueven su crecimiento, lo que se conoce como proceso hipertrófico (**Sadoshima et al., 1997, Russel et al., 2000**). Factores tanto de tipo mecánico como y/o neurohumorales circulantes o locales (provenientes de las mismas células cardíacas: comunicación autocrina y/o paracrina) inducen la activación de señales intracelulares (**Komuro 2001**), promoviendo el aumento de la síntesis de proteínas estructurales y contráctiles y la formación de nuevos sarcómeros, que le permiten generar mayor trabajo contráctil de la bomba cardíaca. De esta manera los cardiomiocitos crecen en longitud y/o diámetro, dependiendo la naturaleza del estímulo (**Mima et al., 1995; Ahuja et al., 2007**).

Se pueden diferenciar dos tipos de hipertrofia. La de tipo *fisiológica*, observada en individuos con acondicionamiento atlético y embarazadas, la que se caracteriza por ser reversible y por presentar un aumento del tamaño de los cardiomiocitos, con incremento proporcional de los elementos estructurales del miocardio, sin aumento de la fibrosis intersticial ni compromiso funcional (**Nakamura & Sadoshima 2018**). Por otro lado, la hipertrofia *patológica* se desarrolla en estados patológicos del SCV y se acompaña de aumento de la fibrosis intersticial, mayor incidencia de muerte de cardiomiocitos por apoptosis, disminución de la densidad capilar (**Van Empel et al., 2004**), activación de la expresión de los genes de repuesta temprana (c-jun, c-fos, c-myc) y de los genes fetales tales como el péptido natriurético auricular (ANP), la cadena pesada de la β -miosina (β -MHC) y la alfa-actina esquelética (SKA), entre otros. Estos son considerados y utilizados

como marcadores de respuesta hipertrófica (**Sadoshima et al., 1997; McMullen & Jennings 2007**).

Se han descrito distintos estímulos inductores de hipertrofia patológica del cardiomiocito tales como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y catecolaminas como la norepinefrina (NE) (**Heineke et al., 2006**). El crecimiento del cardiomiocito por estimulación por NE procede a través de la estimulación de receptores acoplados a proteína G, entre los que destacan los receptores α 1-adrenérgicos para epinefrina y norepinefrina, los cuales han sido relacionados con el desarrollo de HC patológica y su eventual progreso a insuficiencia cardíaca (**Carreño et al., 2006**).

Aunque la hipertrofia es un proceso inicialmente beneficioso, permitiendo un mejor trabajo cardíaco, finalmente es perjudicial pues evoluciona a insuficiencia cardíaca y a muerte súbita (**McKinsey & Olson 1999**).

1.3. Sistema renina-angiotensina (SRA) clásico

Este sistema hormonal regula la homeostasis cardiovascular (**Passos-Silva et al., 2015; Fattah et al., 2016**). La vía canónica del SRA comienza con el angiotensinógeno (una alfa-2-globulina) producido principalmente por el hígado e hidrolizado por renina, enzima expresada en el riñón y liberada en el torrente sanguíneo, formándose angiotensina I, un decapeptido inactivo; éste por acción de enzima convertidora de angiotensina I (ECA) se transforma en el octapeptido angiotensina II (Ang II) (**Gralinski et al., 2016**) (Figura 2), principal mediador de las diversas funciones biológicas del SRA (**Ocaranza et al., 2010; Ocaranza et al., 2014**).

Diversos estudios indican que el SRA y su principal efector Ang II, están relacionados con el desarrollo de la hipertrofia e insuficiencia cardíaca (**Steckelings & Unger 2012; Patel et al., 2016**), donde la mayor parte de sus efectos (incluyendo vasoconstricción, estimulación de liberación de aldosterona y los efectos natriuréticos en el riñón), se llevan a cabo por medio de los receptores de angiotensina II subtipo 1 (ATR1) (**Ocaranza et al., 2014**). Por esta razón hoy en día, los inhibidores de la ECA y los antagonistas del receptor Ang-II subtipo 1 (AT1R) son terapias de primera línea para suprimir las acciones de angiotensina II en la vía canónica del SRA (**Fattah et al., 2016**).

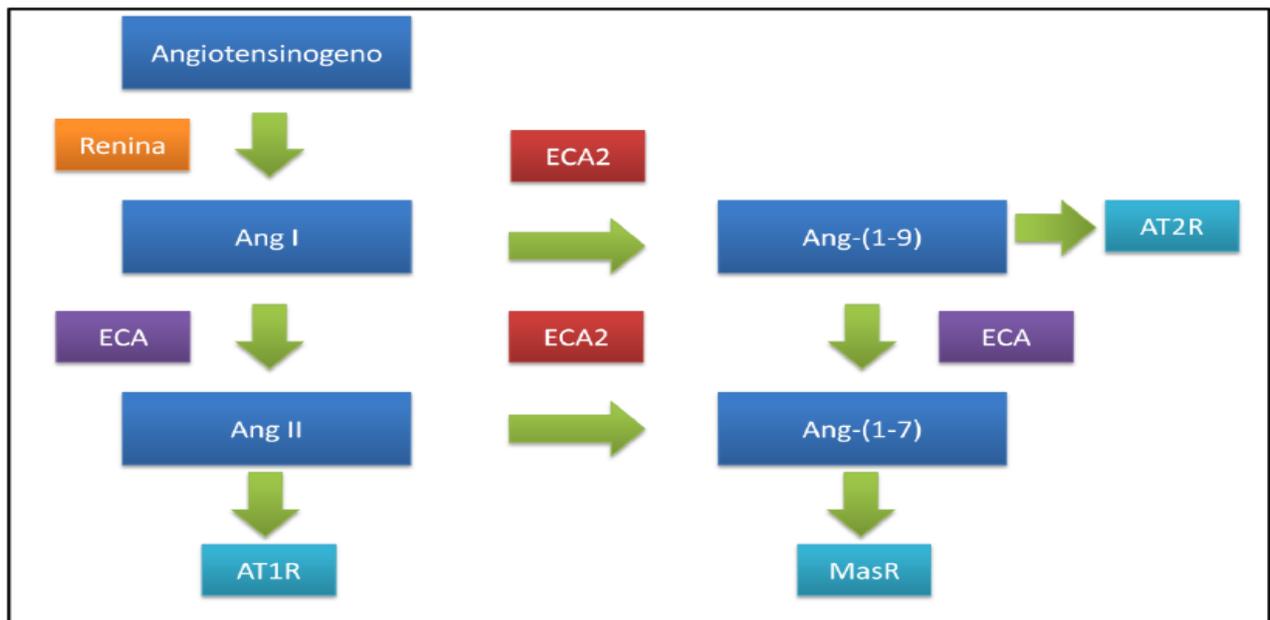


Figura 2. Sistema renina-angiotensina-aldosterona. Vías canónica y alternativa.

1.4. Sistema renina angiotensina alternativo

Si bien el SRA se asocia principalmente con la regulación de la presión y volumen sanguíneo; y patológicamente con el desarrollo de hipertensión arterial (**Steckelings & Unger 2012**), también tiene un papel clave en la iniciación y progresión del daño tisular en las ECV, las cuales son mediados por el AT1R (**Unger 2002**). El SRA es un sistema

más complejo del que originalmente se consideró. Recientemente, la comprensión de los componentes del SRA alternativo se ha expandido progresivamente. Diversas endopeptidasas y procesos enzimáticos de descarboxilación están implicados en la generación de péptidos relacionados a angiotensina, entre los que se incluyen a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] y angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)], que influyen en la activación / inhibición de múltiples subtipos de receptores (AT2R, Mas, y posiblemente MrgD) **(Lea M.D et al., 2016)**, los que se caracterizan por mostrar efectos opuestos en comparación con el receptor AT1 **(Steckelings & Unger. 2012; Wagenaar et al., 2013; Fattah et al., 2016)**.

La señalización celular y los efectos dependientes del AT2R están menos estudiados que los de AT1, pero se ha mostrado que tiene efectos vasodilatadores, anti-proliferativos y anti-inflamatorios. Estudios más recientes han concluido que el AT2R también regula la presión arterial, hipertrofia y fibrosis cardíaca y la muerte celular post-infarto del miocardio **(Westermeier et al., 2015)**. Estos efectos del AT2R se han asociado con las acciones protectoras del SRA sobre el sistema cardiovascular que dependen de la vía no canónica **(Passos-Silva et al., 2015)**

El estudio de la vía no canónica y sus péptidos han acaparado la atención en los últimos años, con el fin de contrarrestar los efectos negativos producidos por la vía canónica.

1.5. Angiotensina-(1-9)

El descubrimiento de los péptidos Ang-(1-7) y Ang-(1-9) ha mostrado una acción contrarreguladora de los efectos de Ang II **(Westermeier et al., 2015)**. En año 1989, se

estableció que el tratamiento crónico con inhibidores de la ECA produce una disminución de la producción de Ang II, pero concomitantemente un incremento de los niveles circulantes de Ang-(1-9). Esto llevó a pensar que sus efectos podrían no estar asociados exclusivamente en la disminución de la producción de Ang II, sino que también con algún efecto complementario y positivo de Ang-(1-9) (**Drummer et al., 1990**). Ang-(1-9) es un péptido de 9 aminoácidos (H₂N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-OH) (**Ocaranza et al., 2014**), generado a través de la hidrólisis del aminoácido terminal leucina de Ang I por la ECA2 (**Donoghue, 2000**). Ang-(1-9) está presente en pacientes voluntarios sanos, en pacientes o en ratones tratados con inhibidores de ECA (iECAs) o antagonistas de AT1R y sus niveles circulantes aumentan en etapas tempranas post-infarto al miocardio (**Ocaranza & Jalil, 2012**). Estos antecedentes han motivado nuevas investigaciones y su posible rol en este tipo de patologías.

1.6. Angiotensina-(1-9) e hipertrofia cardiaca

Se ha observado que Ang-(1-9) disminuye la hipertensión arterial y mejora el daño cardiovascular en dos modelos experimentales hipertensivos. Uno de los modelos empleados fue ratas tratadas Ang II, mediante el uso de minibombas que infundían el péptido y el otro modelo Goldblatt 2K-1C, que consiste en el pinzamiento de la arteria renal en ratas. Los resultados mostraron que la administración crónica de Ang-(1-9) a ratas hipertensas redujo la presión arterial sistólica, mejoró la función cardíaca y endotelial así como el remodelado cardiovascular y el estrés oxidativo (**Ocaranza et al.,**

2014). Ang-(1-9) también atenuó la fibrosis en ratas espontáneamente hipertensas **(Flores-Muñoz et al., 2011).**

La administración de Ang-(1-9) por medio de una mini bomba osmótica a ratas infartadas por ligación de la arteria coronaria izquierda, previno la hipertrofia cardiaca, evaluada por la disminución en los siguientes marcadores: niveles de mRNA de ANF (factor natriurético auricular), niveles proteicos de β -MHC (cadena pesada de la beta miosina) y morfológicos (área y perímetro del cardiomiocito) **(Ocaranza et al., 2010).** Dado que Ang-(1-9) podría ser convertida a Ang-(1-7) por acción de ECA y producir los efectos antes mencionados, la administración del antagonista del receptor MAS (receptor por el cual actúa Ang-(1-7)) A779, mostró que no hubo cambios en la prevención de la hipertrofia inducida por Ang-(1-9) y que no se requiere su conversión a Ang-(1-7). En este mismo estudio, estudios *in-vitro* en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata hipertrofiados mediante el tratamiento con NE, Ang-(1-9) mostró los mismos efectos anti hipertróficos observados *in-vivo*, el cual no se modificó por A779 **(Ocaranza et al., 2010).**

Todas estas evidencias han despertado un gran interés en el conocimiento de éste péptido y si podría llegar a convertirse en una alternativa real como tratamiento o profilaxis del remodelado cardiaco.

1.7 Estrategias para aumentar la estabilidad de los péptidos en sistemas biológicos

Si bien los péptidos presentan una gran bioactividad y una alta especificidad con pocos o nulos efectos secundarios, como es el caso de Ang-(1-9), la mayoría de los péptidos

son moléculas de corta duración, debido a que son degradados fácilmente por enzimas, con poco o ningún uso terapéutico **(Liu et al., 2016)**. El elevado número de peptidasas presentes en la sangre hace que su vida media en el plasma sea muy corta, del orden de un minuto **(Segura-Campos et al., 2010)**. Por lo que la estrategia para convertir estas moléculas en fármacos útiles, a menudo consiste en transformar los compuestos candidatos en peptidomiméticos **(Murray & Wong 2005)**. Una estrategia para diseñar péptidos estables a la degradación de proteasas es la síntesis de análogos retro-enantio, que consiste en unir D-aminoácidos, no naturales, a diferencia del péptido original compuesto por L-aminoácidos y además invertir el orden de los aminoácidos respecto a la secuencia original. Resultando así teóricamente, un péptido que contiene una orientación de sus cadenas laterales muy similar a la de la estructura original **(Van Regenmortel & Muller 2005)**, como se muestra en la **Figura 3**.

Los D-aminoácidos representan imágenes reflejas conformacionales de los L-aminoácidos naturales, los que se encuentran en las proteínas naturales presentes en los sistemas biológicos. Los péptidos que contienen D-aminoácidos tienen ventajas sobre los péptidos que solo contienen L-aminoácidos. En general, estos tipos de péptidos son menos susceptibles a la degradación proteolítica y tienen un tiempo efectivo más prolongado cuando se usan como productos farmacéuticos. Además, la inserción de D-aminoácidos en regiones de secuencia entre L-aminoácidos seleccionadas como bloques de secuencias o que contienen solo D-aminoácidos, permite el diseño de fármacos basados en péptidos que son bioactivos y poseen una mayor biodisponibilidad además de ser resistentes a proteólisis **(Matthew & Malcolm 1998)**.

Si se diseñan apropiadamente, los péptidos retro-enantio pueden tener características de unión similares a los péptidos L, donde gracias a la utilización de la metodología enantio y retro como fusión se podría garantizar la estabilidad estructural, la orientación espacial, la topología de la cadena lateral y, en consecuencia, la bioactividad del péptido, pero conservaría su resistencia a la degradación enzimática característica de los péptidos D **(Goodman & Chorev 1979)**. Si bien las síntesis de los D-aminoácidos requiere tiempo altos costos, lo que puede desalentar su aplicación en ensayos clínicos, las síntesis de los péptidos retro-enantio no lo son **(Cardoso et al., 2018)**, lo que los hace alternativas atractivas para ser utilizados como productos farmacéuticos.

Con los antecedentes presentados se propone la estrategia retro-enantio para obtener el péptido Ang-(1-9) estable, bioactivo y con un gran potencial en el tratamiento de distintas ECV. En este trabajo se evaluará la estabilidad del péptido retro-enantio así como su bioactividad antihipertrófica

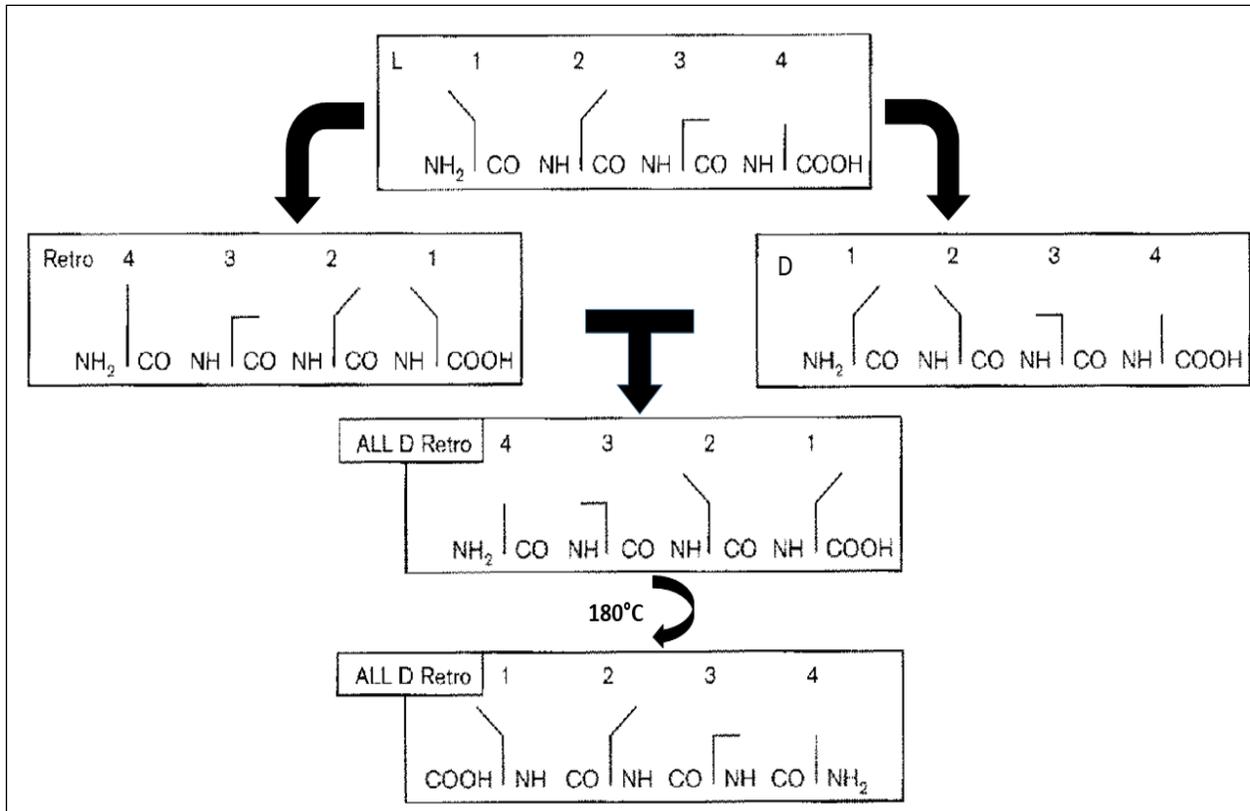


Figura 3. Ilustración esquemática de la influencia de transformaciones peptídicas en la orientación de cadenas laterales en un tetra péptido. En la parte superior el péptido-L se dibuja de acuerdo con la convención habitual con su residuo amino-terminal a la izquierda. Luego abajo a la izquierda se dibuja en el sentido inverso del orden de los aminoácidos (retropéptido) mientras que a la derecha se muestra el péptido con todos sus aminoácidos-D en vez de -L (enantiopéptido). Abajo cuando el péptido se sintetiza en el orden inverso (retropéptido) y además usando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos, se obtiene un retropéptido all-D en el que la orientación de las cadenas laterales es la misma que en el péptido original. Esto se ve claramente cuando el retropéptido all-D se dibuja con su residuo amino terminal a la derecha. Modificado de Van Regenmorte & Muller. Current Opinion in Biotechnology. 9. 377-82, 1998.

2. HIPÓTESIS

“El péptido retro-enantio análogo de angiotensina-(1-9) es estable en suero y presenta una acción antihipertrófica a través del AT2R en el cardiomiocito.”

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estabilidad en suero humano, y la bioactividad anti-hipertrofica del péptido retro-enantio de Ang-(1-9), en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y sintetizar el péptido retro-enantio Ang-(1-9)
- Evaluar la estabilidad del péptido retro-enantio Ang-(1-9) en suero humano y compararla con la de Ang-(1-9).
- Estudiar la actividad antihipertrófica de Ang-(1-9) retro-enantio en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata, y si esta actividad depende del receptor AT2R.

5. METODOLOGÍA

Reactivos. Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) medio Hank's, medio DME, medio 199 (M199), pancreatina, gelatina, triton X-100, 5-bromo-2'-deoxiuridina y PD 123,319. FBS (suero fetal bovino) se adquirió en Biological Industries (04-121-1A). A779 se adquirió en Bachelet (Bubenfort, Switzerland). Los anticuerpos utilizados fueron: anti β -tubulina (T4026, Sigma), anti pro-Anp (ab180649, Abcam) y beta-MHC (VPMP667, Vector). El péptido angiotensina-(1-9) y el péptido retro-enantio angiotensina-(1-9) se adquirieron en el Núcleo Biotecnología Curauma (NBC) de la Pontificia Universidad Católica de Chile. El cocktail de inhibidores de proteasas complete Mini (11-836-170-001) y el cocktail inhibidores de fosfatasas PhosSTOP (04-906-837-001) se adquirieron en Roche Applied Science (Penzberg, Alemania). Los anticuerpos secundarios anti IgG de conejo y ratón conjugados a peroxidasa se obtuvieron en Calbiochem (La Jolla, USA). El medio de montaje para fluorescencia DAKO se compró en DAKO Corporation (Carpinteria, USA). La albúmina de suero bovino (BSA) se adquirió en Winkler Ltda. (Santiago, Chile)

Síntesis de péptidos: Ang-(1-9) y el péptido retro-enantio Ang-(1-9) fueron proporcionados por el Núcleo Biotecnología Curauma (NBC) de la Pontificia Universidad Católica de Chile y sintetizados a través del siguiente procedimiento: Se tomó el volumen deseado de solvente y se agregó a un tubo con alúmina y se agitó. Se activó el tamiz, llevándolo a 50 °C por 15 min. Finalmente, se secó el tamiz molecular y se agregó el

solvente proveniente del tubo con alúmina. Todos los solventes usados se secaron con alúmina y tamiz molecular

Tratamiento de la resina: se pesó la cantidad de resina necesaria para un reactor y lavó dos veces con DCM luego de drenar el reactor y añadir DCM, dejando 10 min para el *swelling*. Luego se drenó el reactor.

Acople del primer aminoácido: se pesaron 1,6 mmoles (un exceso de la carga normal de la resina que es 1,6 mmol/g) del aminoácido Fmoc por cada gramo de resina pesada (o menos, según se requiera menos sustitución final) y se disolvieron en el mínimo posible de DCM. Se añadieron 3 equivalentes (respecto al aminoácido) de DIEA, se agitó por 15 min, se añadieron otros 2 equivalentes de DIEA y se agitó por 1-2 h. Luego se añadieron 0,5 mL de metanol por gramo de resina y se agitó por 5 min. Posteriormente se lavó 3 veces con DCM, 2 veces con DMF y 2 veces más con DCM y secar la resina.

Determinación de la sustitución: se pesaron 5-10 mg de resina-aminoácido seca (mínimo en duplicado) y se añadió 1 mL de piperidina 20 % (sin Tritón X-100). Se agitó por 20 min y se tomaron 30 μ L de esta solución y posteriormente se llevaron a 3 mL con DMF en una celda de cuarzo. Luego se midió la absorbancia de las muestras a 290-300 nm en un espectrofotómetro (usando DMF como blanco) y se calculó el grado de sustitución con la fórmula $(101 \times A)/(7.8 \times w)$ donde A= Absorbancia w= mg de resina.

Síntesis desde el segundo aminoácido: se lavó la resina con DMF. Se eliminó el Fmoc con 20 % de piperidina / DMF y se lavó con DMF y luego con DMF y DCM. Se realizó la prueba de Kaiser (con una muestra de peptide resina). Posteriormente se lavó con DMF.

La escisión del péptido se realizó mediante acidólisis con ácido trifluoroacético (TFA), utilizando trietilsilano y agua como eliminadores (94:3:3, v/v/v) durante 60–90 min. El TFA se eliminó con una corriente de N₂ y el residuo oleoso se precipitó con terc-butil éter seco. El péptido en bruto se recuperó por centrifugación y decantación de la fase de terc-butil éter. Posteriormente se realizaron controles con cromatograma-espectro masas y detector PDA ([Figura suplementaria 1](#))

Evaluación de la estabilidad de los péptidos por HPLC. Los péptidos se disolvieron en PBS para obtener una concentración final de 1 mM. De este stock se tomó una alícuota de 50 µL y se llevó a 450 µL con suero humano (Sigma Aldrich from human male AB plasma, USA origin, sterile-filtered) a 37 °C en agitación, para la obtención de una concentración inicial de 20 µM y se incubó por 48 h. Se extrajeron Alícuotas de 50 µL a distintos tiempos y fueron llevadas a 200 µL de metanol a 4 °C para precipitar proteínas del suero durante 30 min. Luego las muestras se centrifugaron a 13.000 g en Hermle Cooling Centrifuge Z 326 K 311.00 V01 a 4 °C por 30 min. Se obtuvo el sobrenadante (aprox. 200 µL) en viales y posteriormente llevadas al HPLC. Todos los análisis se realizaron en el HPLC flexar Perkin Elmer auto sampler, utilizando una columna 4,6 x 100 mm de fase reversa con un tamaño de partícula de 3,5 µM (Waters XBridge Peptide BEH C18 Column). Fase móvil A constituida acetonitrilo 100 % y la fase B por TFA 0.0004 % en agua Milli-Q. La composición inicial de eluyente fue 5 % A y 95 % B por 1 min y luego una gradiente lineal para llegar a 100 % A en 19 min y luego volver a la composición inicial en 4 min, con un tiempo total de corrida de 25 min. El flujo de eluyente fue de 0,9 mL/min y la temperatura de la columna se ajustó a 26 °C. La medición se realizó a una señal UV de longitud de onda de 220 nm. Donde se Inyectaron 50 µL por muestra. Los

péptidos se identificaron en base a su tiempo de retención en el respectivo cromatograma obtenido en el programa Chromera-HPLC flexar.

Modelo experimental. Se utilizaron como modelo experimental cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonatas, los cuales se obtuvieron a partir de ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Todos los animales se trataron siguiendo las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de experimentación: Guide for the Use of Laboratory Animals (NIH, Publication No. 85-23, revised 1996), siendo los protocolos experimentales además aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Cultivos primarios de cardiomiocitos ratas neonatas. Para el aislamiento y cultivo de los cardiomiocitos, los corazones de rata neonata se removieron y lavaron a 37 °C en medio Hank's estéril, para luego ser desprovistos de sus aurículas, y los ventrículos se disgregaron mecánicamente y posteriormente homogenizados con el fin de comenzar con la digestión enzimática sucesiva con colagenasa tipo II (0,02 g/100 mL Hank's) y pancreatina (0,06 g/100 mL Hank's), la cual permite obtener las células aisladas. Para obtener una fracción enriquecida en cardiomiocitos se aprovechó la adhesión diferencial que presentan los fibroblastos a las superficies plásticas, obteniendo los sobrenadantes que es donde se mantienen los cardiomiocitos. Una vez finalizada la digestión, las células se preplaquearon durante 2 h en medio MM 10% FBS. La concentración celular se determinó mediante microscopía, usando como colorante azul de tripán, el cual permite

visualizar y contar las células vivas y muertas en una cámara de Neubauer. Conocida su concentración, los cardiomiocitos se sembraron en MM 5 % FBS-10 %, en presencia de 5-bromo-2-deoxiuridina 100 μ M, sobre placas de cultivo cubiertas previamente con una monocapa de gelatina (2 % p/v). Las placas sembradas se mantuvieron en incubadores termostregulados a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ y 95 % aire. Luego de 18 h, se lavaron 3 veces con PBS y dejaron las células con MM sin SFB, por 24 h antes de exponerlos a cualquier estímulo.

Estímulo hipertrófico. Para inducir hipertrofia en los cardiomiocitos se utilizó norepinefrina (NE), la cual se empleó a 10 μ M previa incubación con RE-(1-9) a 1, 10 ó 100 μ M por 1 h y mantenidos por 48 h. Los antagonistas PD123319 (4 μ M) y A779 (10 μ M) se agregaron 30 min previos a incubación con RE-(1-9) y se mantuvieron durante los estímulos. Esta sobrecarga adrenérgica conduce a la activación de la expresión de los genes fetales (factor natriurético auricular: ANP, cadena pesada de la β - miosina: β -MHC y alfa-actina esquelética: SKA, entre otros), lo cual se evaluó por determinación de los niveles proteicos de ANP y β -MHC así como su área y perímetro celular (**Sadoshima et al., 1997**).

Preparación de extractos totales. Los cardiomiocitos se sembraron en placas de 35 mm a una densidad de 1 x 10⁶ células/placa. Una vez finalizado el estímulo, las células se lavaron con solución de PBS a 4°C y luego se lisaron con 50 μ L de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1 %; Tritón X-100 1 % v/v) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasa (Roche). El homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 12.000

r.p.m. durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante o extracto de proteínas se recuperó en un tubo nuevo y se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, USA). Finalmente el extracto se desnaturó en tampón SDS-PAGE 4x, para ser almacenado posteriormente a -20 °C.

Electroforesis y electrotransferencia de proteínas. La separación de las proteínas en base a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. En todos los casos, se cargaron alrededor de 30 µg de extracto proteico total. El gel concentrador se preparó al 3 % y el separador en gradiente del 5 al 20 % de poliacrilamida. La electroforesis se realizó en tampón de electroforesis (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1 %) a un voltaje constante de 80 V, hasta que el frente alcanzara el gel separador y luego a 110 V hasta el final de la corrida electroforética (2 h). Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF a amperaje constante de 400 mA por 90 min, en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM).

Western blot. Una vez realizada la electrotransferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau por 1 min, lo cual permite confirmar la correcta transferencia de las proteínas y para cortar la membrana e incubar con varios anticuerpos distintos. Luego se bloquea la membrana con solución de leche 5 % p/v (TBS 1x; Tween-20 0,1 %) durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario según corresponda el corte (anti β-MHC 1:2.000; anti pro-ANP 1:2.000; anti tubulina 1:5.000) en tampón de incubación (TBS 1x; Tween-20 0,1 %; leche descremada 5 % p/v) toda la noche a 4 °C. Luego, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS 1x;

Tween-20 al 0,1 %, y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón, según corresponda, conjugado con peroxidasa de rabanito a una dilución de 1:5.000 en tampón de incubación. Para la detección, las membranas, previamente lavadas, se incubaron durante 1 min en la solución de sustrato quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL y se expusieron en el equipo de revelado G:BOX XT4 (Syngene), donde se obtuvieron imágenes digitales, las cuales fueron analizadas con la ayuda del programa Image J (NIH, USA).

Microscopia de epifluorescencia. Los cardiomiocitos se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de $0,25 \times 10^6$ células/pocillo, sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro cubiertos de gelatina (2 %). Luego del estímulo, las células se lavaron con PBS frío, se fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS por 20 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1 % en PBS por 10 min y se bloquearon con BSA al 1 % en PBS (filtrado) durante 30 min. Por otro lado, para determinar el área y perímetro celular, las células se trataron con la sonda faloidina-rodamina (dilución 1:500) y Hoechst (dilución 1:1.000) para visualizar los núcleos. Finalmente, las células se montaron en los portaobjetos respectivos, utilizando DAKO como medio de montaje siendo examinadas posteriormente en microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 63x, obteniendo imágenes digitales a las cuales se les determinó el perímetro y área celular relativa, utilizando el programa ImageJ, trazando el contorno de cada célula en forma manual. Se analizaron entre 50 y 100 células para cada condición.

Análisis estadístico. Dependiendo del tipo de experimento, los resultados se muestran como figuras representativas o como promedios \pm SEM de, al menos, tres experimentos independientes. Los datos se analizaron por ANOVA para determinar la significancia estadística de los resultados, considerándose como significativo un $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Objetivo 1: evaluar estabilidad de retro-enantio Ang-(1-9) en suero humano y compararla con la de Ang-(1-9).

Ang-(1-9) siendo uno de los péptidos del eje contrarregulatorio del RAS, modulador de los efectos patológicos del Ang II en el corazón y la vasculatura y ya que la degradación proteolítica de fármacos de tipo peptídico se considera como una de las principales debilidades que limitan sus aplicaciones terapéuticas sistémicas, fue fundamental conocer algunos datos de estabilidad tanto de angiotensina-(1-9) como del péptido análogo retro-enantio. Para este fin y con la colaboración las Dras. Fanny Guzmán y Eyleen Araya, se obtuvieron los peptidos Ang-(1-9) y el péptido análogo retro-enantio de Ang-(1-9), representados en su estructura en la **Figura 4**. En ella se observa que al utilizar los péptidos D junto con la inversión del orden, si bien se afecta la estructura “normal” del péptido, sus cadenas laterales mantienen la misma disposición.

Para dilucidar ciertos parámetros de estabilidad, los péptidos se disolvieron en suero humano a temperatura fisiológica durante 48 h, obteniéndose alícuotas a tiempo 0, 5, 10 min y 1, 3, 6, 24 y 48 h para luego ser analizados por HPLC. La **Figura 5** muestra una imagen representativa de una sección de los cromatogramas HPLC de ambos péptidos.

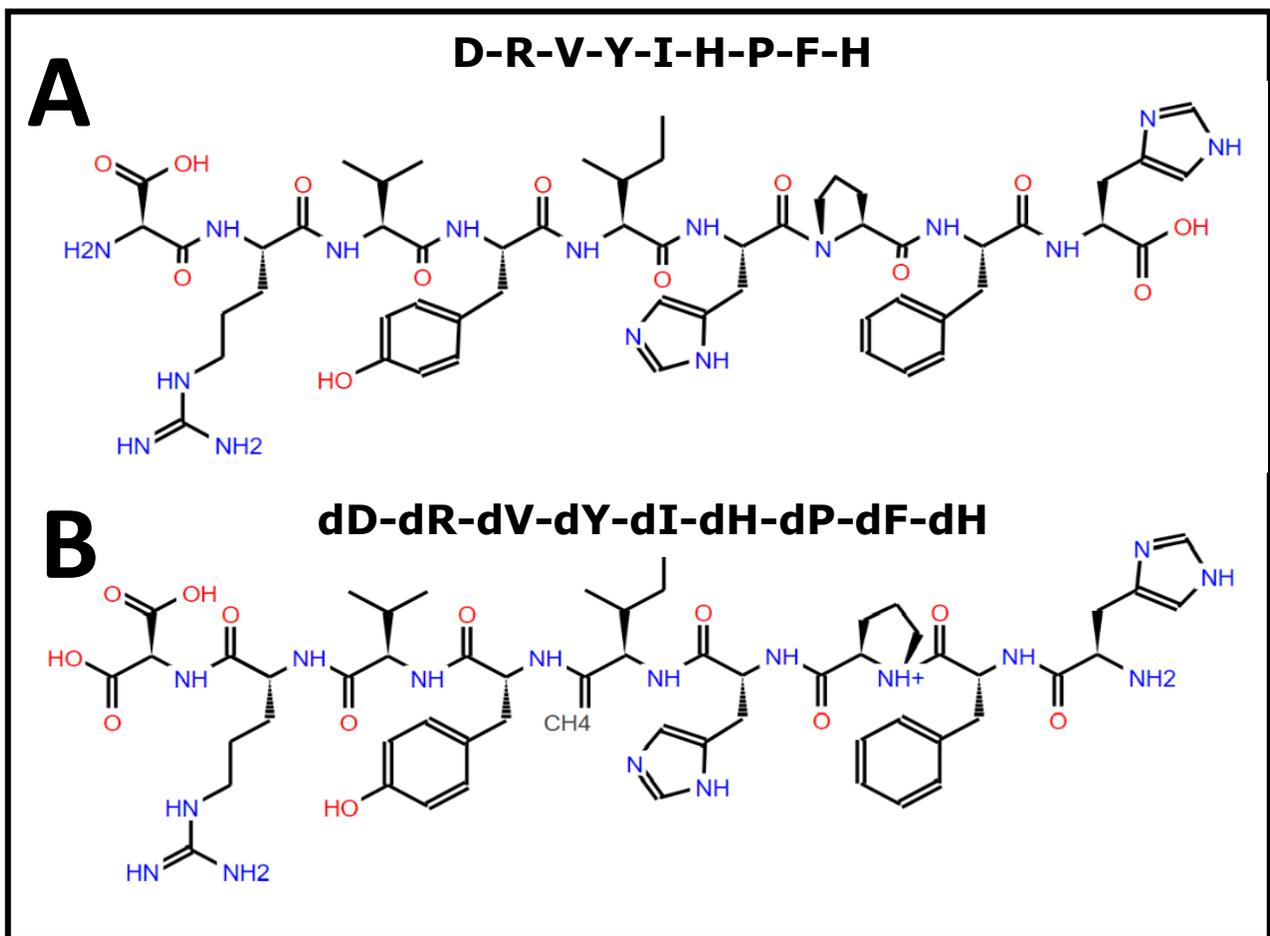


Figura 4. Estructura química de los péptidos utilizados en los experimentos de estabilidad. A) Estructura química del péptido Ang-(1-9) con su secuencia de aminoácidos abreviada. B) Estructura química retro-enantio con respectiva secuencia de d-aminoácidos.

En la **Figura 5A**, se observa que la señal mostrada en el tiempo 0 correspondió a una alícuota obtenida inmediatamente después de mezclar la solución del péptido con el suero a 37 °C. La señal correspondiente al péptido desapareció completamente a las 3 h. En la **Figura 5B** se observa que la señal del péptido retro-enantio de Ang-(1-9) se mantiene durante 48 h sin un cambio apreciable. Estos resultados dan cuenta de la estabilidad del péptido retro-enantio. La **Figura 5C** muestra el cromatograma de la solución de suero sin el péptido, como control para mostrar la ausencia de la señal de los

péptidos. Para poder realizar un análisis más objetivo de esta observación, se determinaron las áreas bajo la curva correspondientes a la señal obtenida en el cromatograma en distintas repeticiones del mismo experimento (**Figura 6**), cuantificando el porcentaje remanente de cada péptido comparado con el de su tiempo 0. En esta figura se aprecia claramente la diferencia en cuanto a la cantidad remanente del péptido a través del tiempo. Ang-(1-9) a las 3 h prácticamente se encuentra en porcentajes menores al 10 % remanente mientras que el RE-(1-9) mantiene porcentajes remanentes de péptido alrededor del 70-80 % a las 48 h. Este resultado es un indicativo de que la metodología retro-enantio aumentó la estabilidad del péptido en suero humano. Adicionalmente al péptido retro-enantio, se generó un péptido análogo que contaba con aminoácidos retro-enantio pero con un grupo terminal amida en vez de carboxilo. Teóricamente se esperaba que su estabilidad aumentaría pero tal vez con una reducción de su bioactividad lo que fue demostrado en experimentos de bioactividad (**Figura suplementaria 2**).

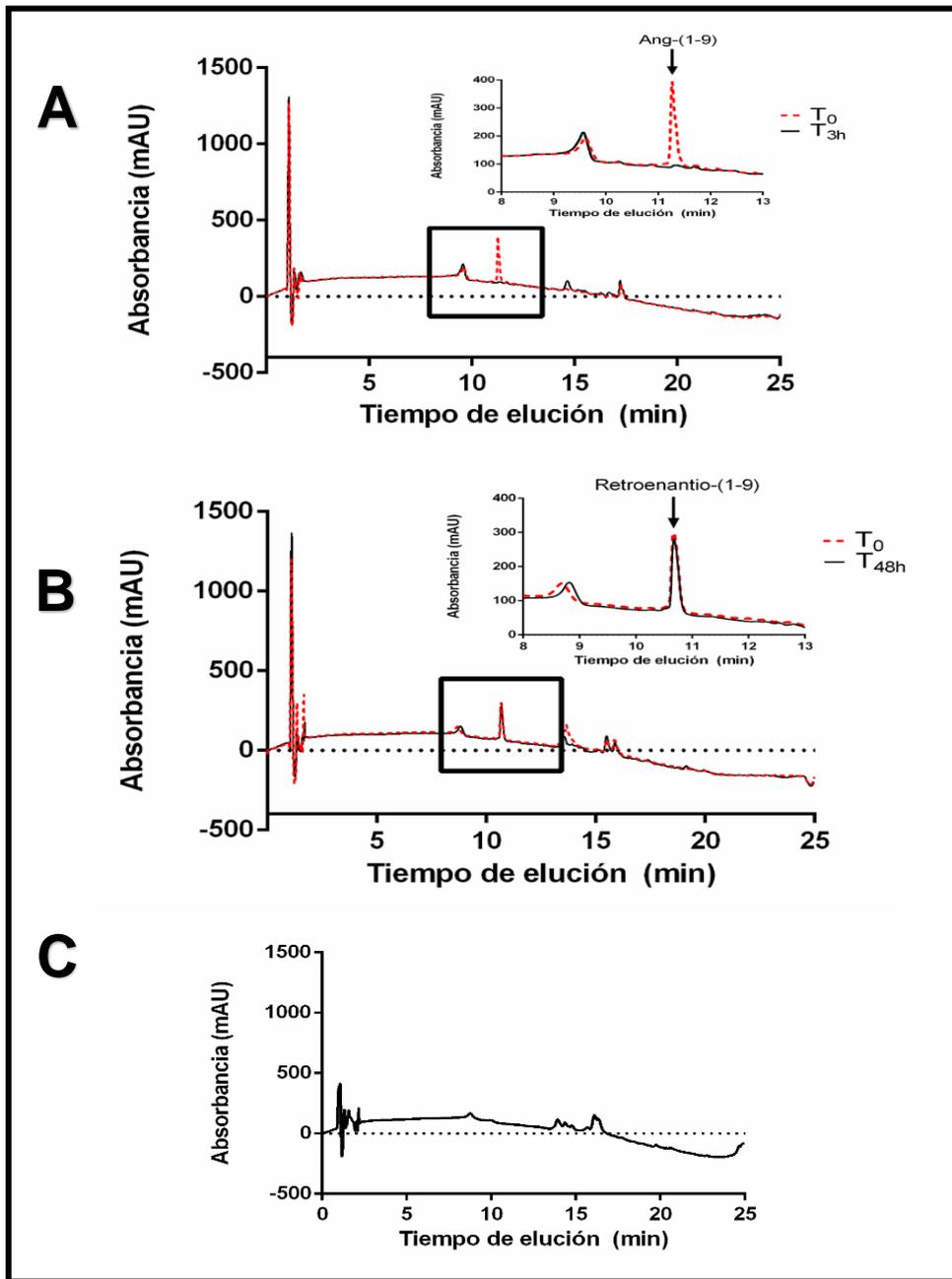


Figura 5. Cromatogramas representativos Angiotensina-(1-9) y retro-enantio de Angiotensina-(1-9). (A) Cromatograma del péptido Ang-(1-9) a tiempo 0 y 3 h, B) Retro-enantio-Ang-(1-9) a tiempo 0 y 48 h y C) Cromatograma de suero procesado sin el péptido como control.

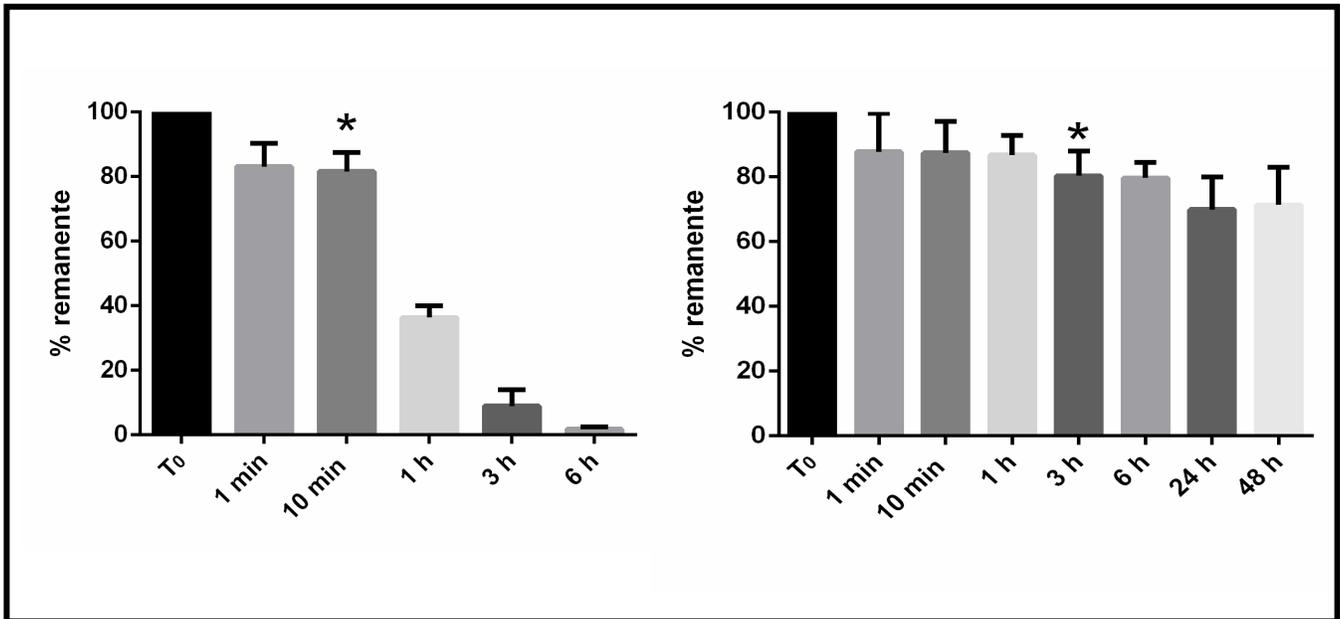
Ang-(1-9)**Retro-enantio-Ang-(1-9)**

Figura 6. Porcentaje remanente de péptidos. Porcentajes remanentes de los péptidos Ang-(1-9) y del péptido retro-enantio-Ang-(1-9) a diferentes tiempos, luego de su incubación en suero humano a 37 °C, T₀= tiempo inicial de medición. Los valores corresponden al promedio \pm SEM *p<0,05 vs T₀, n=4.

6.2. Objetivo 2: Estudiar la actividad antihipertrófica del retro-enantio Ang-(1-9) en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata y si esta actividad depende del AT2R.

Diversos estudios han documentado la bioactividad de angiotensina-(1-9), pero no hay certeza de que su análogo retro-enantio tenga la misma actividad, ya que existe en la literatura casos en el que los péptidos análogos con conformaciones retro-enantioméricas han perdido su acción (**Metzger 1982**). A fin de evaluar su actividad biológica, se procedió a investigar si este nuevo péptido mantenía *in vitro* la acción anti-hipertrófica del péptido original Ang-(1-9). Para este fin, se realizaron experimentos en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata, a los cuales se les incubó con los correspondientes péptidos, previos a un estímulo hipertrófico con NE 10 μM por 24 h según bibliografía (**Pennanen et al., 2012**). Estos experimentos se realizaron a través de la técnicas *western blot* con concentraciones de Re-(1-9) 1, 10 y 100 μM . Se determinó la expresión de los marcadores de hipertrofia β -MHC y ANP, observando que a las concentraciones de 10 y 100 μM se encuentra una reducción estadísticamente significativa de los niveles proteicos de ambos marcadores de hipertrofia con respecto a NE (**Figura 7**).

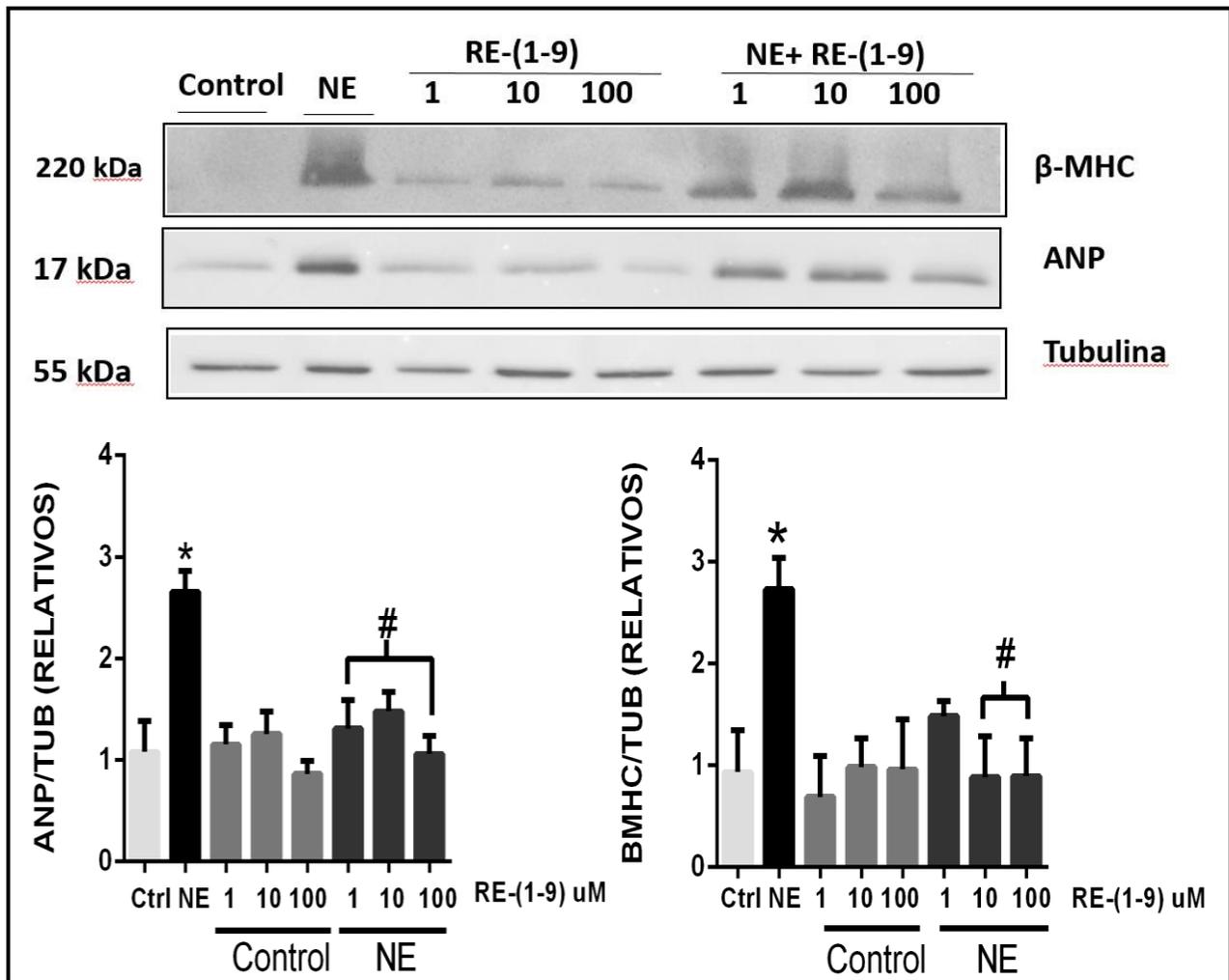


Figura 7. Efecto de RE-(1-9) en distintas concentraciones sobre los niveles de β -MHC y ANP. Las células se estimularon con NE (10 μ M) 48 h, luego se obtuvieron los extractos proteicos totales y mediante western blot se determinaron los niveles de las proteínas β -MHC y ANP, como marcador de la hipertrofia y se utilizó como control de carga tubulina. A) se muestra un western blot representativo para cada proteína. B) El respectivo análisis densitométrico de cada marcador; Los valores corresponden al promedio \pm SEM * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,05$ vs NE; $n = 3$.

Dado que RE-(1-9) 10 μ M previno el aumento de los marcadores de hipertrofia ANP y β -MHC inducida por NE en cardiomiocitos, se utilizó esta concentración para realizar los experimentos de microscopía, donde se midió el área y perímetro celular, marcadores

fenotípicos de la hipertrofia cardiaca. La **Figura 8** muestra que el RE-(1-9), previno el aumento del área y perímetro celular inducidos por NE en cardiomiocitos, evidenciando la actividad protectora del RE-(1-9); similares a los resultados observados anteriormente con los marcadores de hipertrofia, que también se mantenían sin diferencias significativas respecto al control, no así con la condición con NE.

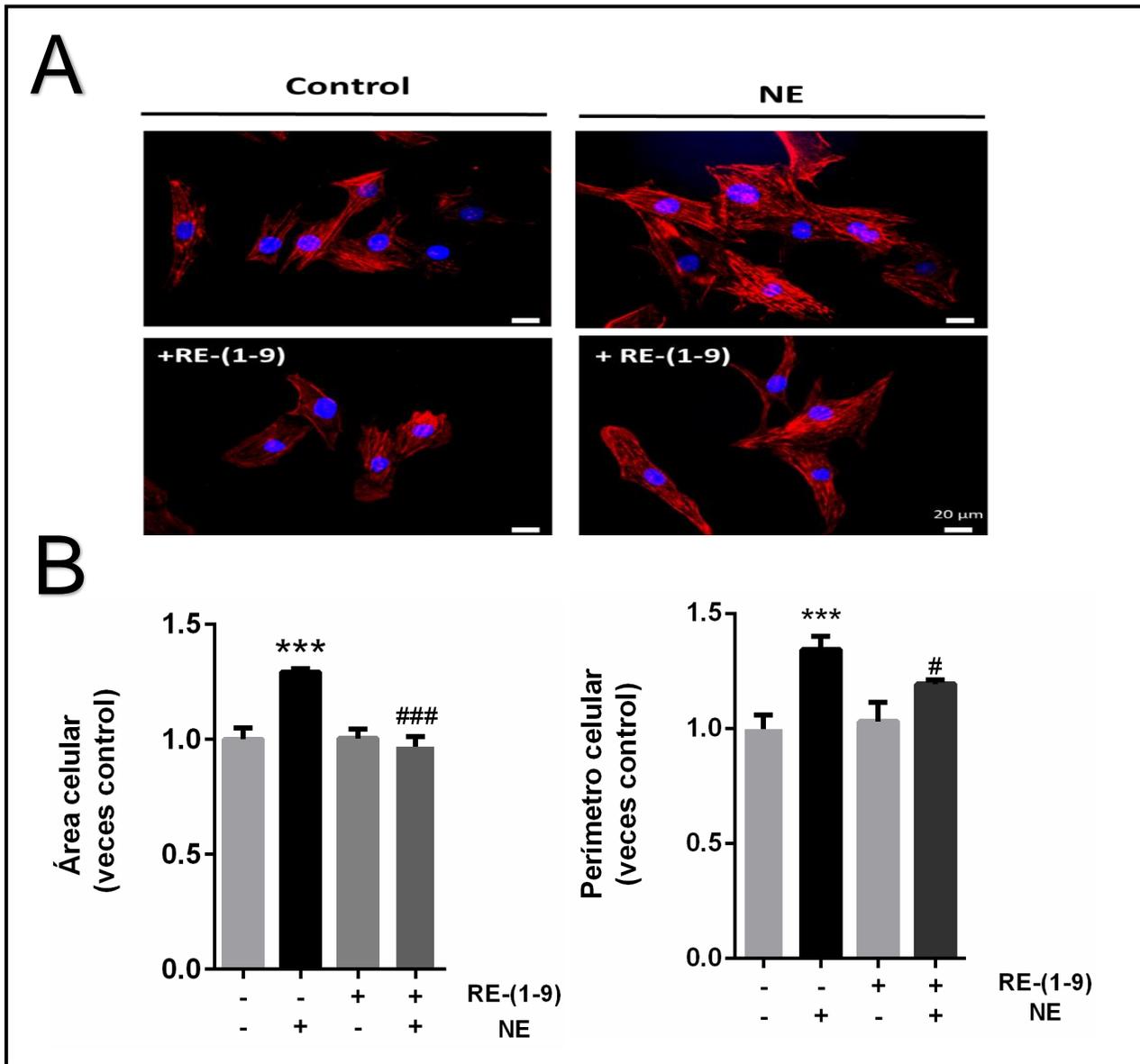


Figura 8. Efecto del RE-Ang-(1-9) en los aumentos del área y perímetro de cardiomiocitos estimulados con NE. Luego del tratamiento con NE (10 μ M) por 48 h, los cardiomiocitos se fijaron y permeabilizaron para ser incubados con la sonda faloidina-rodamina (color rojo) y con H \ddot{o} echst para visualizar los núcleos celulares. A) Imágenes de microscopía de epifluorescencia para cuantificar su área y perímetro B) Gráficos con la cuantificación de parámetros indicativos de hipertrofia. NE = norepinefrina; RE-(1-9) = retro-enantio Ang-(1-9). Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=4 experimentos independientes, al menos 50 células por n); ***p<0,0002 vs control. # p<0,05 respecto a NE, ###p<0,0002 respecto de NE.

6.3. Comparación de actividad de Ang-(1-9) vs retro-enantio Ang-(1-9).

Ya comprobada la actividad anti-hipertrófica del RE-(1-9), otra interrogante a evaluar fue si esta actividad era distinta a la de Ang-(1-9). Se seleccionó la concentración de 10 μ M del péptido retro-enantio para comprobar si a esta concentración ambos protegían del estímulo hipertrófico NE por 48 h, tanto con los marcadores de hipertrofia β -MHC y ANP como con el área y perímetro celular. Los gráficos de la **Figura 9** muestran que no existen diferencias significativas entre ambos péptidos en ninguno de los experimentos. La concentración de 10 μ M del péptido retro-enantio de Ang-(1-9) tiene una actividad anti-hipertrófica equiparable a la del péptido nativo, lo que da cuenta de una potencia similar de ambos compuestos.

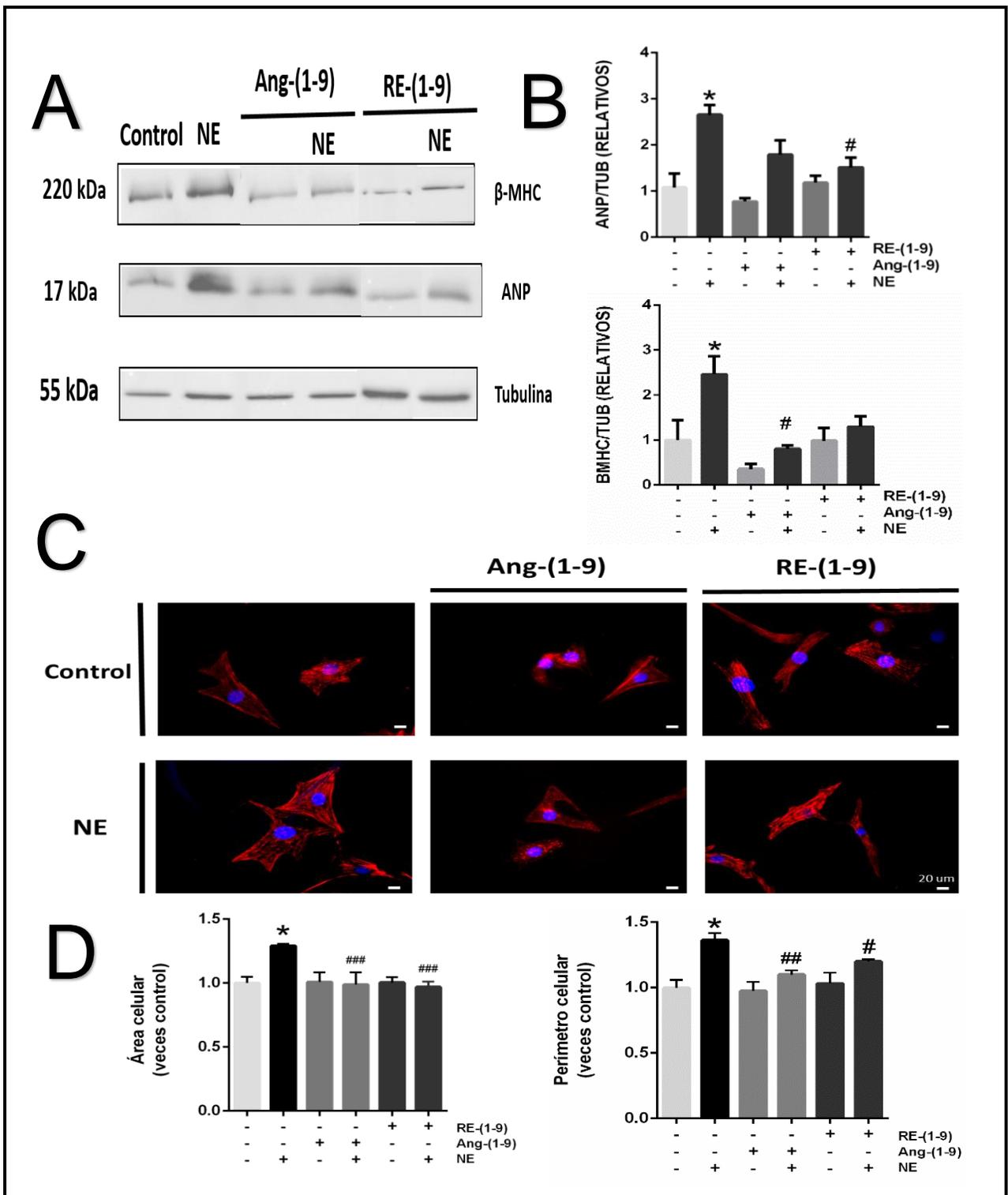


Figura 9. Comparación Ang-(1-9) y RE-(1-9). A) Se muestra un western blot representativo para cada proteína. B) El respectivo análisis densitométrico de cada marcador; Los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=3$ experimentos independientes); * $p<0,05$ vs su respectivo control, # $p<0,05$ vs NE y C) Imágenes de microscopía de epifluorescencia para cuantificar su área y perímetro D) Gráficos con la

cuantificación de parámetros indicativos de hipertrofia; (n=4 experimentos independientes); *p<0,05 vs control, #p<0,05, ###p<0,001, ####p< 0,0002 vs NE.

6.4. Evaluación del papel del receptor AT2R y Mas en los efectos del retro-enantiómero Ang-(1-9)

Siendo Ang II, el principal efector del SRA, que participa íntegramente en la regulación del tono vascular, la presión arterial y en el equilibrio electrolítico, efectos mediados por AT1R, activando múltiples cascadas de señalización que conducen a vasoconstricción, proliferación, retención de sodio y estrés oxidativo, hipertrofia, entre otros, procesos involucrados en la patogénesis de las ECV y ya que la activación de AT2R contrarresta la mayoría de los efectos de AT1R, por ejemplo la hipertrofia cardiovascular se realizó el estudio del papel del receptor AT2R en los efectos del retro-enantiómero Ang-(1-9). Nuestros estudios han mostrado que Ang-(1-9) actúa a través del receptor AT2R, ya que su acción era anulada al utilizar el bloqueador del receptor AT2R PD123319, no así cuando se utiliza A779, el bloqueador del receptor Mas, otro de los receptores efectores del SRA

Se investigó si la acción anti-hipertrofica del retro-enantiómero de angiotensina-(1-9) también depende del AT2R. Para este fin se realizaron experimentos utilizando las mismas condiciones anteriormente descritas, pero esta vez con los antagonistas PD123319 (4 µM) y A779 (10 µM) y de los receptores AT2 y MAS, respectivamente, incubados 1 h antes de agregar el RE-(1-9). La **Figura 10** muestra que la pre-incubación con PD 123319

bloqueó el efecto anti-hipertrófico inducido por Ang-(1-9), evidenciado por un aumento de los marcadores β -MHC y ANP (**Figura 10B**), así como en el área y perímetro del cardiomiocito (**Figura 10C**) y cuantificados en la **Figura 10D**. La **Figura 11** muestra la réplica del experimento anterior pero esta vez agregando el bloqueador del receptor Mas, A779, observándose que no modificó los efectos anti-hipertróficos del retro-enantio de angiotensina-(1-9) respecto a los controles (**Figuras 11A y C**), indicando que este efecto sería mediado por el AT2R.

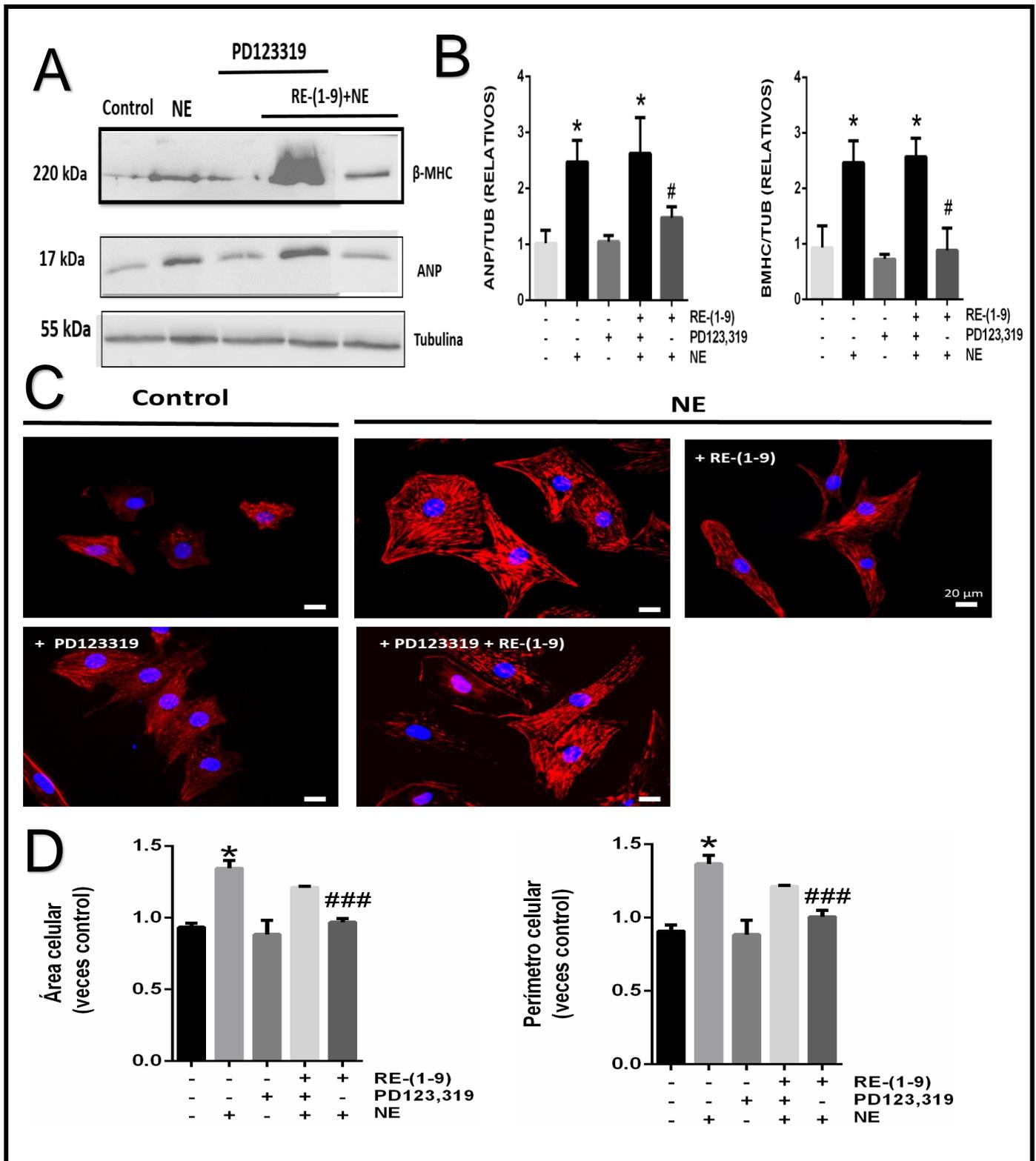


Figura 10. Participación del ATR2 en la actividad antihipertrófica del retro-enantio de Ang-(1-9). A) Western blot representativo para cada proteína. B) Respectivo análisis

densitométrico de cada marcador. Los valores corresponden al promedio \pm SEM * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,05$ vs NE $n=3$. . C) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia para cuantificar su área y perímetro celular. D) Gráficos con la cuantificación de parámetros indicativos de hipertrofia. NE = norepinefrina; RE-(1-9) = retro-enantio de angiotensina-(1-9). Los valores corresponden al promedio \pm SEM ($n=4$ experimentos independientes, al menos 50 células por n); * $p < 0,05$ vs su respectivo control. #### $p < 0,0002$ respecto a NE.

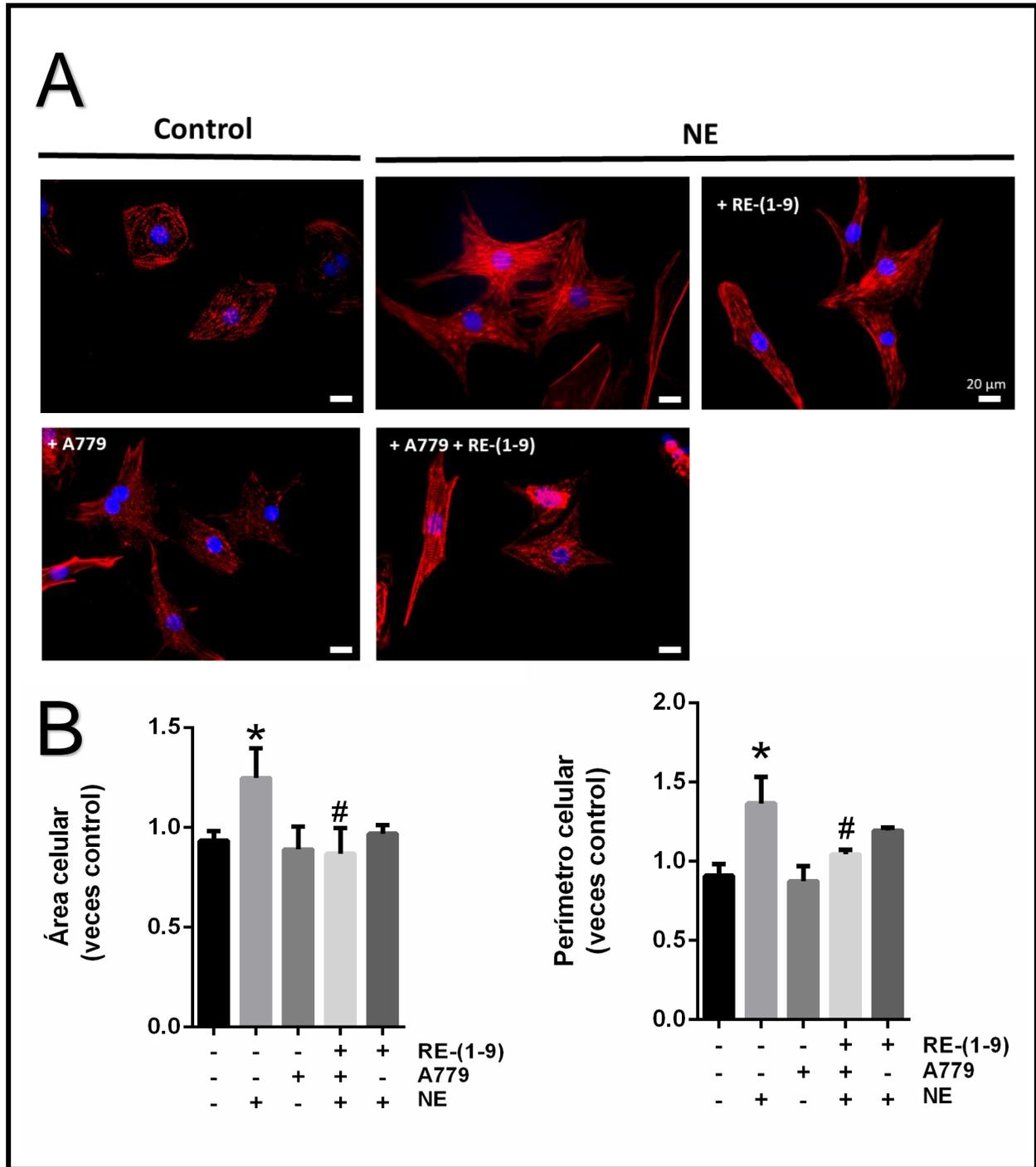


Figura 11. Participación del Receptor Mas en la actividad antihipertrófica del retro-enantiómero de Ang-(1-9). A) Imágenes representativas de microscopía de epifluorescencia para cuantificar su área y perímetro celular. B) Gráficos con la cuantificación de parámetros indicativos de hipertrofia, NE = norepinefrina; RE-(1-9) = retro-enantiómero de angiotensina-(1-9). Los valores corresponden al

*promedio ± SEM (n=4 experimentos independientes, al menos 50 células por n); *p<0,05 vs control. #p<0,05 vs NE.*

7. DISCUSIÓN

Aunque ya en su inicio desde los siglos XVIII y XIX la hipertrofia cardiaca fue catalogada como fisiológica, importantes clínicos y patólogos reconocían la asociación entre agrandamiento cardíaco y reducción de la expectativa de vida, así como la existencia de diferentes patrones de hipertrofia, en lo que podría considerarse un proceso mal adaptativo (**Morales et al., 1999; Nakamura et al., 2018**). Actualmente, se sabe que esta acción inicialmente compensadora, se ve sobrepasada por el estrés biomecánico (**Morales et al., 1999**), conduciendo a alteraciones en la estructura y función del miocardio que derivan al establecimiento de insuficiencia cardíaca, una condición patológica. (**Morales et al., 1999; Escudero et al., 2004**). Es por esta razón que la hipertrofia cardiaca se ha convertido en un potencial tema de estudio, para buscar nuevos blancos que puedan ayudar al tratamiento de esta enfermedad.

En el SRA clásico Ang II el componente activo central señala principalmente a través del AT1R (**Clayton et al., 2015**), relacionado activamente con la fisiopatología de la hipertrofia e insuficiencia cardíaca (**Ocaranza et al., 2010; Clarke et al., 2013; Clayton et al., 2015**). Actualmente se utiliza una gran variedad de medicamentos contra la hipertensión y otras ECV involucradas principalmente en intervención del SRA , como los inhibidores de la ECA (captopril, enalapril) y los antagonistas/bloqueadores del AT1R (losartan, valsartan), y los antagonistas de renina (aliskiren, remikiren). Las respuestas individuales y los perfiles de efectos secundarios son muy variables, y a menudo es

necesario un régimen terapéutico mixto **(Clayton et al., 2015)**. Esto es atribuible en gran medida a la complejidad de SRA, el nivel de interferencia entre moléculas clave como Ang II, sus productos de escisión así como los distintas interacciones de los efectores en ACE2, AT1R, AT2R y receptor Mas **(Santos et al., 2003)**. Esta complejidad del sistema ha expandido la visión clásica de SRA, con los péptidos Ang-(1-7) y Ang-(1-9), que presentan una acción contrarreguladora de Ang II **(Clarke et al., 2013; Westermeier et al., 2015; Passos-Silva et al., 2015)**. Es por esto que una gran variedad de estudios se han llevado a cabo en la intervención de la vía no clásica del SRA y sus productos finales activos (Ang-1-7, Ang-(1-9)), donde este último péptido ha demostrado amplia diversidad de efectos como vasodilatación, anti-fibrotico, anti-inflamatorio, anti-proliferativo y anti-hipertrofico, abriendo nuevas posibilidades de intervención en las ECV **(Flores-Muñoz et al., 2011; Clarke et al., 2013; Passos-Silva et al., 2015; Westermeier et al., 2015)**

A pesar de lo prometedor de las acciones anti-hipertróficas que tiene el péptido Ang-(1-9), en general, la vida media en circulación de los péptidos es baja debido a la degradación enzimática, y también muestran una baja biodisponibilidad en tejidos y órganos, lo que limitaría la utilidad de los péptidos **(Adessi & Soto 2002)**, y consecuentemente, la del péptido Ang-(1-9) como agente terapéutico. Para superar este inconveniente se han reemplazando los péptidos estándar con pseudopéptidos o peptidomiméticos, que imitan la secuencia o estructura del péptido natural.

Modificación retro-enantio de Ang-(1-9) como metodología para aumentar su estabilidad.

La degradación proteolítica de los fármacos basados en péptidos a menudo se considera como una debilidad importante, que limita las aplicaciones terapéuticas sistémicas **(Böttger et al., 2017)**. Es así como en 1979, Goodman y Chorev propusieron la modificación retro-enantio, que consiste en un péptido lineal con D-aminoácidos (Enantio modificación) montado en orden inverso (retro modificación). Esta conformación presenta una orientación lateral de las cadenas muy similar a la de la estructura original. Tal enfoque peptidomimético aporta péptidos con una mayor estabilidad metabólica, ya que la mayoría de las proteasas naturales, no pueden escindir residuos de D-aminoácidos y enlaces no peptídicos **(Cardoso et al., 2017)**. Trabajos con péptidos retro-enantio realizados por Li et al., han demostrado un aumento en su estabilidad en suero humano en comparación con el péptido L, que se degradó rápidamente con una pérdida completa de integridad en 45 minutos, el péptido retro-enantio se mantuvo intacto al 100 % a las 2 horas y 80 % a las 24 horas **(Li et al., 2015)**, trabajos realizados por Prades et al., también demostraron que la vida media de las versiones enantio y retro-enantio estaban por encima de las 24 horas **(Prades et al., 2015)**.

Trabajos *in vivo* con Ang-(1-9) han demostrado un efecto anti-hipertrofico, así como la reducción del remodelado cardiovascular sin una modificación del péptido Ang-(1-9); sin embargo, estos experimentos se han realizado utilizando mini bombas osmóticas y no con dosis únicas, por lo que la concentración de Ang-(1-9) se mantenía dentro de ciertos niveles **(Ocaranza et al., 2010; Ocaranza et al., 2014)**, por lo que no se puede asegurar su efecto con una dosis única, ya que este sería degradado rápidamente.

Los datos obtenidos en este trabajo se condicen con los antecedentes mostrados anteriormente para otros péptidos retro-enantio (**Li et al., 2015; Prades et al., 2015**), donde este muestra una disminución significativa a las 3h y un remanente cercano al 80% a las 48 h mientras que el péptido L a los 10 min presenta una disminución significativa respecto a la inicial mientras que 1 y 3 h después, la cantidad de péptido remanente en suero alcanzó el 40 y 10 %, respectivamente. Estos datos confirman la hipótesis de que la modificación retro-enantio aumenta significativamente la estabilidad *in vitro* en suero humano de Ang-(1-9). Además, se evaluó la estabilidad de otro péptidomimético, el retro-enantio de Ang-(1-9) con un grupo terminal amida en vez de COOH. Los resultados mostraron que este péptido también presentó un porcentaje remanente mayor del péptido que Ang-(1-9) (**Figura Suplementaria 2**) y parecido al péptido RE-(1-9). Por otro lado, los resultados de estabilidad *in vitro* no se pueden extrapolar a un modelo *in vivo* o a otras matrices celulares (sangre, plasma), ya que en estos modelos existen procesos farmacocinéticos como la distribución y acumulación de fármacos, parámetros que no son medidos en los modelos *in vitro*; sin embargo, da un indicio de que la modificación retro-enantio es una herramienta útil en el aumento de estabilidad de péptidos.

Bioactividad del péptido retro-enantio de Ang-(1-9)

Tal como se mencionó previamente, diversos estudios han establecido un papel antihipertrófico de Ang- (1–9) en la rama no canónica del SRA, entre los que se incluyen trabajos *in vitro* (**Flores-Muñoz et al., 2011**) e *in vivo* (**Ocaranza et al., 2010**), utilizando cardiomiocitos de rata neonata o el modelo de infarto de miocardio. Si bien en este trabajo se demostró que hay una mayor estabilidad del retro-enantio en suero humano,

no existen evidencias de que el péptido retro-enantio de Ang-(1-9) mantenga la misma actividad anti-hipertrófica del péptido nativo. Esto debido a que la metodología utilizada para la síntesis del retro-enantio puede generar diferentes efectos a nivel estructural, los que podrían afectar su bioactividad. Por ejemplo, esta estrategia de síntesis genera un péptido isómero retro-inverso del péptido L, el cual pese a tener una topología de cadena lateral similar, presenta diferencias inherentes a nivel de estructura secundaria y terciaria **(Chon li et al., 2010)**. Además, genera enlaces peptídicos invertidos respecto al péptido nativo, lo que podría afectar la unión de este péptido con su receptor, lo que se vería evidenciado en un defecto en su bioactividad. **(Fischer et al., 2003)**.

Otra limitante que podría afectar su bioactividad es la presencia de prolina en la cadena aminoacídica de la Ang-(1-9), aminoácido considerado incompatible con esta metodología retro-enantio, debido a que su cadena lateral se encuentra unida con la cadena central, por lo que al transformar este aminoácido a uno retro-enantio la cadena lateral no queda exactamente en la misma disposición, como si ocurre con las otras cadenas laterales, afectando o incluso anulando su bioactividad **(Fischer et al., 2003)**.

Un buen ejemplo de un retro-enantiomero compuesto por prolina es la antamanida, un antagonista de la faloidina (un veneno del hongo *Amanita phalloides*), un ciclodecapéptido que contiene cuatro residuos Pro, donde sin embargo el análogo retro-enantio Tyr⁶-antamanida no mostró una actividad in vivo disminuida **(Fischer et al., 2003)**.

Nuestros resultados mostraron que el péptido RE-(1-9) mantuvo la actividad anti-hipertrófica del péptido nativo Ang-(1-9), lo que indicaría que la estrategia retro-enantio no afectó su bioactividad. Esto junto con la estabilidad son resultados prometedores para

la utilización de este péptido en el tratamiento de ECV, donde el siguiente paso sería comprobar esta estabilidad y actividad en modelos *in vivo*.

Evaluación de la participación de AT2R y Mas en la acción del retro-enantio Ang-(1-9)

Como se mencionó anteriormente, el SRA es un sistema más complejo de lo que originalmente se pensaba, teniendo en su vía canónica dos péptidos como principales efectores Ang-(1-9) y Ang-(1-7). Este último péptido se puede generar a partir de Ang-(1-9), por la acción de endopeptidasa neutra y ECA, y actuar a través del receptor Mas para regular la vasodilatación, función endotelial, hipertrofia y fibrosis cardiaca **(Fyhrquist & Saijonmaa 2008)**. En experimentos previos realizados con Ang-(1-9) se utilizó el bloqueador A779 para corroborar que sus efectos anti-hipertróficos eran por su directa acción y no a través de su conversión a Ang-(1-7) **(Ocaranza et al., 2010; Flores-Muñoz et al., 2011)**. También se utilizó en esos estudios al bloqueador del receptor AT2 PD123319 con los mismos objetivos. Así se mostró que al bloquear el receptor AT2R, los efectos de Ang-(1-9) desaparecieron y se concluyó que son mediados por activación de AT2R **(Flores-Muñoz et al., 2011; Ocaranza et al., 2014; Moya et al., 2015)**. Los resultados mostraron que la acción anti-hipertrófica del RE-(1-9) se perdió al utilizar el bloqueador PD123319, siendo indicativo de que su actividad es mediada por el receptor AT2, lo que explicaría su acción anti-hipertrofica asociada con este receptor **(Clarke et al., 2013)** y tampoco a través del receptor Mas. Estudios realizados por Clayton et al., sugieren que la selectividad y unión a AT1R como AT2R puede ser controlada tanto por las propiedades fisicoquímicas de aminoácidos específicos en Ang II y también la

manipulación de la propiedades conformacionales del péptido **(Clayton et al., 2015)**, demostrando además que AT2R es menos dependiente de la estructura secundaria y / o presentación de la cadena lateral de aminoácidos en comparación con la unión de AT1R **(Clayton et al., 2015)**, lo que también es un dato importante al momento de utilizar peptidomiméticos en este receptor, por lo que una proyección importante a revisar es si la conformación del RE-(1-9) difiere del péptido nativo y por ende pudiera afectar su unión al receptor. Esto último también sería interesante conocer, ya que con esta información se pueden realizar otro tipo de modificaciones en las estructura del péptido con mayor bioactividad, con el fin de darle una utilidad clínica.

Los resultados mostraron que el péptido mimético utilizado interacciona con AT2R a similitud que Ang-(1-9) e imita su acción anti-hipertrofica, aumentando su estabilidad, por lo que futuras proyecciones son:

- Analizar en detalle la unión tanto de Ang-(1-9) como del RE-(1-9) al receptor AT2, con el fin de conocer y favorecer la activación de este receptor y sus efectos benéficos en las ECV
- Comprobar si la estabilidad y bioactividad demostradas *in vitro* se extrapolan a modelos *in vivo*.
- Evaluar las vías de señalización intracelular gatilladas por la interacción del péptido retro-enantio con el receptor ATR2

8. Conclusiones

- La estrategia retro-enantio permitió generar un péptido retro-enantiómero Ang-(1-9) resistente a la degradación en suero humano, confiriendo una mayor estabilidad *in vitro* que Ang-(1-9).
- El retro-enantio-Ang-(1-9) previene la hipertrofia inducida por norepinefrina, en concentraciones micromolares, en cardiomiocitos de rata neonata, evidenciada por una disminución en los marcadores de hipertrofia ANP y β -MHC así como en el área y perímetro celular.
- El retro-enantio-Ang-(1-9) presenta una potencia similar al péptido nativo Ang-(1-9), en una concentración de 10 μ M. No se observaron diferencias significativas entre ellos en los marcadores de hipertrofia, así como en el área y perímetro celular.
- El efecto de retro-enantio-Ang-(1-9) es mediado por la activación del receptor AT₂, pues al antagonizarlo se bloquea su efecto anti-hipertrófico, pero es independiente de la activación del receptor Mas, ya que el bloqueo con A779 no afectó la acción anti-hipertrófica del RE-(1-9).

9. Bibliografía

1. Adessi, C., & Soto, C. (2002). Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem*, 9(9), 963-978.
2. Ahuja, P., Sdek, P., & MacLellan, W. R. (2007). Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev*, 87(2), 521-544.
3. Böttger, R., Hoffmann, R., & Knappe, D. (2017). Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS one*, 12.
4. Cardiovasculares (Nota descriptiva. 2015). OMS Enfermedades.
5. Cardoso, M. H., Cândido, E. S., Oshiro, K. G., Rezende, S. B., & Franco, O. L. (2018). Peptides containing d-amino acids and retro-inverso peptides: General applications and special focus on antimicrobial peptides *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering* (pp. 131-155): Elsevier.
6. Carreño, J. E., Apablaza, F., Ocaranza, M. P., & Jalil, J. E. (2006). Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares. *Rev esp de Cardiol*, 59, 473-486.
7. Castro G, P., Vukasovic R, J. L., Garcés S, E., Sepúlveda M, L., Ferrada K, M., & Alvarado O, S. (2004). Insuficiencia cardíaca en hospitales chilenos: resultados del Registro Nacional de Insuficiencia Cardíaca, Grupo ICARO. *Rev med Chile*, 132, 655-662.
8. Clarke, C., Flores-Munoz, M., McKinney, C. A., Milligan, G., & Nicklin, S. A. (2013). Regulation of cardiovascular remodeling by the counter-regulatory axis of the renin-angiotensin system. *Future Cardiol*, 9, 23-38
9. Clayton, D., Hanchapola, I., Thomas, W. G., Widdop, R. E., Smith, A. I., Perlmutter, P., & Aguilar, M. I. (2015). Structural determinants for binding to angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin receptors 1 and 2. *Front Pharmacol*, 6, 5.
10. Delbridge, L. M., Bienvenu, L. A., & Mellor, K. M. (2016). Angiotensin-(1-9): New Promise for Post-Infarct Functional Therapy. *J Am Coll Cardiol*, 68, 2667-2669.

11. Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Acton, S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87, E1-9.
12. Drummer, O. H., Kourtis, S., & Johnson, H. (1990). Effect of chronic enalapril treatment on enzymes responsible for the catabolism of angiotensin I and formation of angiotensin II. *Biochem Pharmacol*, 39, 513-518.
13. Ennis, I., & Escudero, E. (2004). Hipertrofia cardiaca. *Tratado de Cardiología de la Federación Argentina de Cardiología. Sección Hipertensión arterial. Edición electrónica.* [www. fac. org. ar/publicaciones](http://www.fac.org.ar/publicaciones).
14. Fattah, C., Nather, K., McCarroll, C. S., Hortigon-Vinagre, M. P., Zamora, V., Flores-Munoz, M., Nicklin, S. A. (2016). Gene therapy with Angiotensin-(1-9) preserves left ventricular systolic function after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 68, 2652-2666.
15. Fischer, P. (2003). The design, synthesis and application of stereochemical and directional peptide isomers: a critical review. *Current Protein and Peptide Science*, 4, 339-356.
16. Fletcher, M. D., & Campbell, M. M. (1998). Partially Modified Retro-Inverso Peptides: Development, Synthesis, and Conformational Behavior. *Chem Rev*, 98, 763-796.
17. Flores-Munoz, M., Smith, N. J., Haggerty, C., Milligan, G., & Nicklin, S. A. (2011). Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J Physiol*, 589, 939-951.
18. Fyhrquist, F., & Saijonmaa, O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *J Int Medi*, 264, 224-236.
19. Goodman, M., & Chorev, M. (1979). On the concept of linear modified retro-peptide structures. *Acco of Chem Res*, 12, 1-7.
20. Gralinski, M., Neves, L. A., & Tiniakova, O. (2016). Methods to Induce Experimental Hypertension. *Drug Discov and Evalu: Pharmacolo Assays*, 135-164.
21. Guía Clínica, Insuficiencia Cardíaca (2015). Sociedad Chilena de Cardiología y Cirugía Cardiovascular y Ministerio de Salud.

22. Heineke, J., & Molkenin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 589-600.
23. Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., & Anversa, P. (1994). The IGF-1-IGF-1 receptor system modulates myocyte proliferation but not myocyte cellular hypertrophy in vitro. *Exp Cell Res*, 215, 273-283.
24. Komuro, I. (2001). Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Jpn Circ J*, 65, 353-358.
25. Kajtura J, Cheng W, Reiss K, Anversa P. (Kajstura, Cheng, Reiss, & Anversa, 1994). *Exp Cell Res*. 1994;215:273-283.
26. Li, C., Pazgier, M., Li, J., Li, C., Liu, M., Zou, G., Lu, W.-Y. (2010). Limitations of peptide retro-inverso isomerization in molecular mimicry. *J Biolo Chem*, 285, 19572-19581.
27. Li, H., Kem, D. C., Zhang, L., Huang, B., Liles, C., Benbrook, A., Yu, X. (2015). Novel retro-inverso peptide inhibitor reverses angiotensin receptor autoantibody-induced hypertension in the rabbit. *Hypertension*, 65(4), 793-799.
28. Liu, M., Li, X., Xie, Z., Xie, C., Zhan, C., Hu, X., Lu, W. (2016). D-Peptides as Recognition Molecules and Therapeutic Agents. *Chem Rec*, 16, 1772-1786.
29. McKinsey, T. A., & Olson, E. N. (1999). Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev*, 9, 267-274.
30. McMullen, J. R., & Jennings, G. L. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 255-262.
31. Metzger, R. (1982). Crystal Cohesion and Conformational Energies. *Crystal Research and Technology*, 17, 789-789.
32. Mima, T., Ueno, H., Fischman, D. A., Williams, L. T., & Mikawa, T. (1995). Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 467-471.

33. Mishra, S., Ling, H., Grimm, M., Zhang, T., Bers, D. M., & Brown, J. H. (2010). Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56, 598-603.
34. Morales, C., Hita, A., & Gelpi, R. J. (1999). Fisiología integrada de la hipertrofia cardíaca. *Rev Argent Cardiol*, 67, 377-388.
35. Moya, J., Novoa, U., Escudero, N., Barrientos, V., Chiong, M., Lavandero, S., Ocaranza, M. P. (2015). El efecto anti-hipertensivo de Angiotensina-(1-9) es mediado por aumento temprano de la diuresis y natriuresis. *Rev chile de Cardiol*, 34, 120-129.
36. Murray, M. L., & Wong, M. (2005). A Dozen Years of Retro-Inverso Peptidomimetics What's Doing? A Tribute to Professor Murray Goodman (Vol. 165, pp. 165-172): Bentham Science Publishers.
37. Nadal-Ginard, B. (2001). Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: futuro de la regeneración miocárdica como alternativa al trasplante. *Rev esp Cardiol*, 54, 543-550.
38. Nakamura, M., & Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol*, 15, 387-407.
39. Ocaranza, M. P., & Jalil, J. E. (2012). Protective Role of the ACE2/Ang-(1-9) Axis in Cardiovascular Remodeling. *Int J Hypertens*, 2012, 594361.
40. Ocaranza, M. P., Lavandero, S., Jalil, J. E., Moya, J., Pinto, M., Novoa, U., Chiong, M. (2010). Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens*, 28, 1054-1064.
41. Ocaranza, M. P., Moya, J., Barrientos, V., Alzamora, R., Hevia, D., Morales, C., Michea, L. (2014). Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J Hypertens*, 32, 771-783.
42. Passos-Silva, D. G., Brandan, E., & Santos, R. A. (2015). Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends Pharmacol Sci*, 36, 310-320.
43. Patel, V. B., Zhong, J. C., Grant, M. B., & Oudit, G. Y. (2016). Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circ Res*, 118, 1313-1326.

44. Pennanen C.S.(2012). Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Farmacología. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 64-71p.
45. Prades, R., Oller-Salvia, B., Schwarzmaier, S. M., Selva, J., Moros, M., Balbi, M., Plesnila, N. (2015). Applying the retro-enantio approach to obtain a peptide capable of overcoming the blood–brain barrier. *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 3967-3972.
46. Reiss, K., Kajstura, J., Capasso, J. M., Marino, T. A., & Anversa, P. (1993). Impairment of myocyte contractility following coronary artery narrowing is associated with activation of the myocyte IGF1 autocrine system, enhanced expression of late growth related genes, DNA synthesis, and myocyte nuclear mitotic division in rats. *Exp Cell Res*, 207(2), 348-360.
47. Russell, B., Motlagh, D., & Ashley, W. W. (2000). Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol* , 88, 1127-1132.
48. Sadoshima, J., & Izumo, S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*, 59, 551-571.
49. Santos, R. A., Simões, E. S. A. C., Maric, C., Silva, D. M., Machado, R. P., De Buhr, I., et al. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8258–8263.
50. Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2010). Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Rev chil de Nutrición*, 37, 386-391.
51. Steckelings, U. M., & Unger, T. (2012). Angiotensin II type 2 receptor agonists-- where should they be applied? *Expert Opin Investig Drugs*, 21, 763-766.
52. Unger, T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 89), 3A-9A; discussion 10A.
53. Van Empel, V. P., & De Windt, L. J. (2004). Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res*, 63, 487-499.
54. Van Regenmortel, M. H., & Muller, S. (1998). D-peptides as immunogens and diagnostic reagents. *Current opinion in biotechnology*, 9, 377-382.

55. Van Wamel, A. J., Ruwhof, C., van der Valk-Kokshoom, L. E., Schrier, P. I., & van der Laarse, A. (2001). The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem*, 218, 113-124.
56. Vliegen, H. W., van der Laarse, A., Cornelisse, C. J., & Eulerink, F. (1991). Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J*, 12, 488-494.
57. Wagenaar, G. T., Laghmani el, H., Fidder, M., Sengers, R. M., de Visser, Y. P., de Vries, L., Walther, F. J. (2013). Agonists of MAS oncogene and angiotensin II type 2 receptors attenuate cardiopulmonary disease in rats with neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305, L341-351.
58. Westermeier, F., Bustamante, M., Pavez, M., Garcia, L., Chiong, M., Ocaranza, M. P., & Lavandero, S. (2015). Novel players in cardioprotection: Insulin like growth factor-1, angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9). *Pharmacol Res*, 101, 41-55.
59. Zhou, P., & Pu, W. T. (2016). Recounting cardiac cellular composition. *Am Heart Assoc*. 118, 368-370.

10. Figuras suplementarias

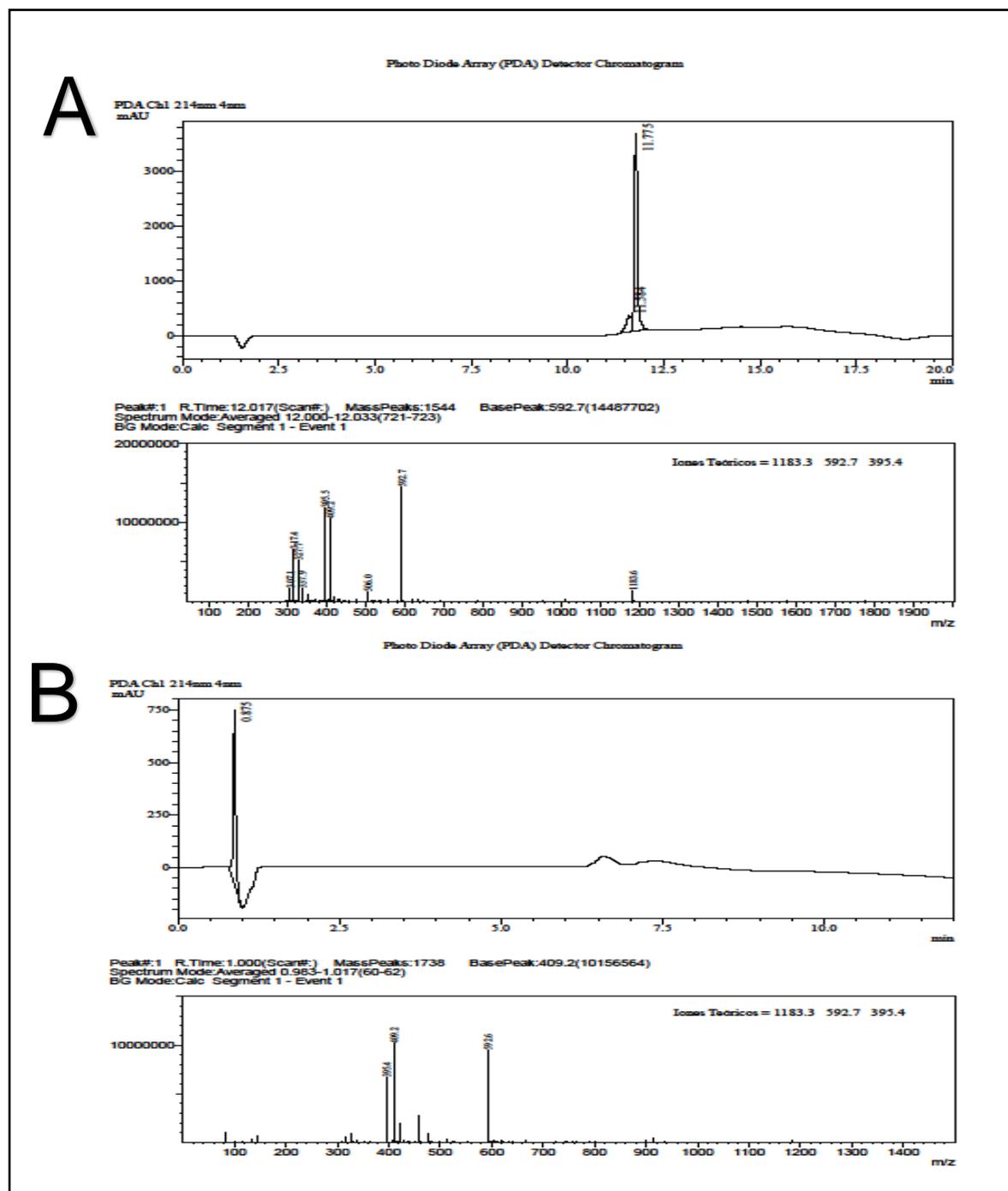


Figura suplementaria 1. Cromatograma del espectro de masas, detector PDA. A) Angiotensina-(1-9). B) Retro-enantio Angiotensina-(1-9).

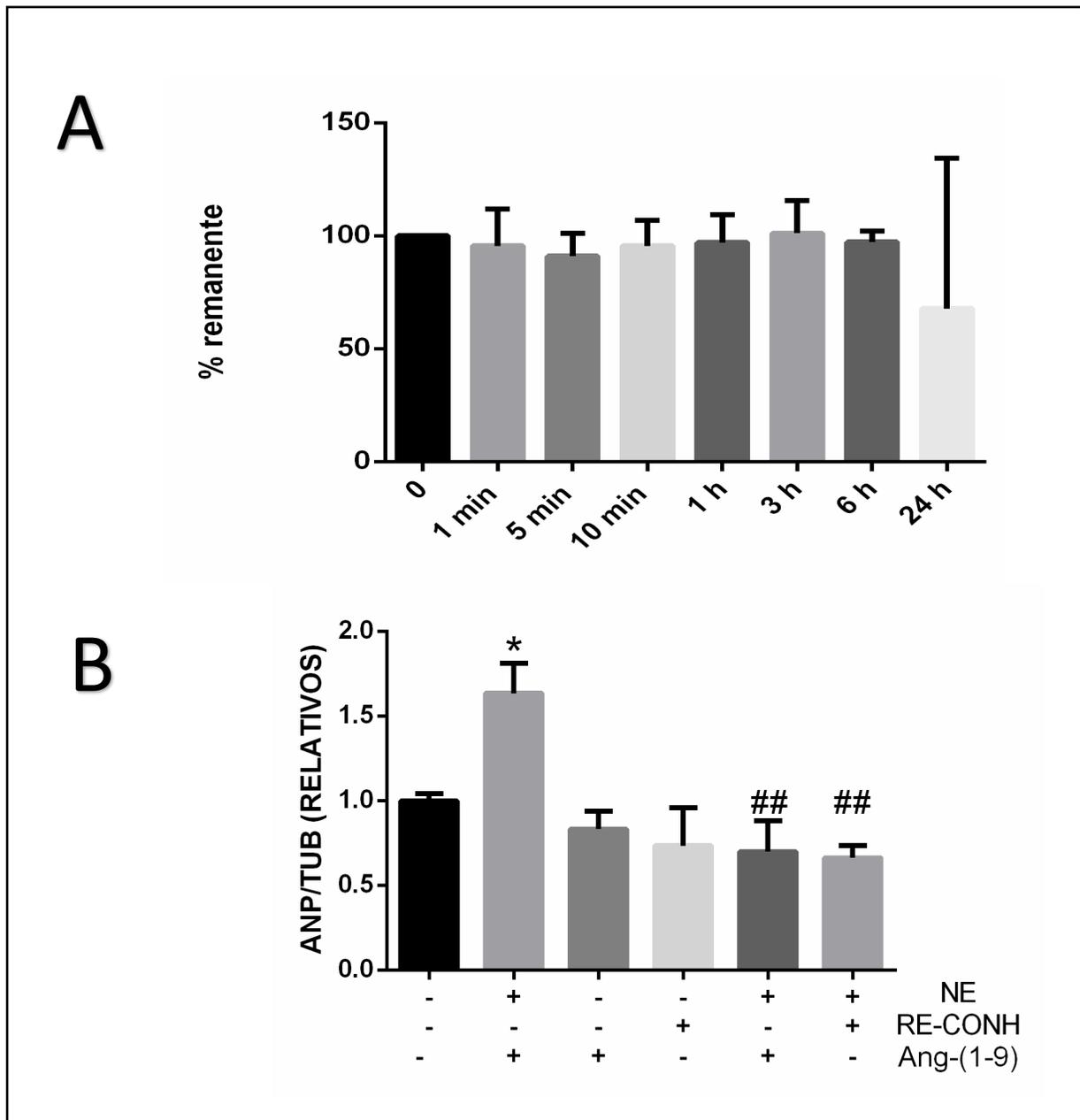


Figura suplementaria 2. A) Estabilidad del péptido retro-enantio terminado en CONH (n=3) B) El respectivo análisis densitométrico de cada marcador; Los valores corresponden al promedio \pm SEM (n=3 experimentos independientes); *p<0,05 vs su respectivo control, ##p<0,005 vs NE.

