

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO ANTI-FIBROGÉNICO
CARDIACO DE ANGIOTENSINA-(1-9) Y SU
RETRO-ENANTIÓMERO***

*Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica, área de Especialización en Clínica
y Memoria para optar al Título de Bioquímica por:*

YÁRENI DE LOURDES ÁVALOS GUAJARDO

Directores de Tesis

Dres. Lorena García - Sergio Lavandero

Santiago-CHILE

Diciembre

2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

YÁRENI DE LOURDES ÁVALOS GUAJARDO

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

Directora de Tesis:
Dra. Lorena García _____

Director de Tesis:
Dr. Sergio Lavandero _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Hernán Lara _____

Dra. Sonja Buvinic _____

Dr. Javier Morales Valenzuela _____

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, agradezco a mi familia: mi papá Jorge, mi mamá Pamela y mi hermana Nicole por ser el pilar más importante en mi vida, por estar en las buenas y en las malas, creer en mis sueños y apoyarme siempre para conseguirlos. Estoy agradecida de tener una hermana en mi vida que sé que siempre estará para mí y yo para ella, y que siempre logra sacarme una carcajada cuando más la necesito. Agradezco a mi prima Daniela por ser mi pilar al llegar a Santiago, ser mi mejor amiga, poder reírnos de todas nuestras desgracias y ser una de las personas más importantes en mi vida. Estoy tan feliz de haber conocido gente tan hermosa en mi pregrado: Matías, Ricky, Andrea, Carla y Carolina, los cuales alegraron cada día de la universidad e hicieron más llevadero todos los estudios y años académicos. Sin ellos la universidad no hubiera sido tan entretenida. Agradezco también a mis amigos del laboratorio en donde realicé mis tesis: Danica, Jaime, Ignacio, Apu y Tomás con los cuales nunca paré de reír e hicieron sentirme querida en este nuevo ambiente de laboratorio, además de ofrecerme una mano cada vez que lo necesitaba. También debo hacer una mención honrosa por ayudarme tanto en este periodo a Don Fidel y a la Sra. Gindra, los mejores técnicos y las personas más cálidas y amables que he conocido. Sobre todo, agradecer las carcajadas con la Sra. Gindra, las cuales me distrajeron en los momentos de más estrés. Agradezco a mis tutores de tesis el profesor Sergio Lavandero y la profesora Lorena García por darme la oportunidad de entrar a su laboratorio y poder guiarme a ser una mejor profesional y a toda la gente del laboratorio que me recibió con los brazos abiertos. Por último, agradezco a mis experiencias vividas en mi hogar Iquique, las nuevas experiencias en Santiago y a toda la gente que conocí en este recorrido de mi vida, ya que todo esto me ha llevado a ser la persona que soy ahora y espero que las risas nunca sigan faltando en mi vida.

"La risa es el sol que ahuyenta el invierno del rostro humano". Víctor Hugo.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
INDICE DE TABLAS	X
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Enfermedades cardiovasculares.....	5
1.2. Remodelado cardíaco	6
1.3. Fisiología cardíaca: fibroblastos cardíacos	6
1.4. Fibrosis cardíaca mediada por TGF- β 1.....	8
1.5. Activación de TGF- β 1	10
1.6. Sistema renina-angiotensina (SRA).....	12
1.7. Angiotensina-(1-9) y sus efectos cardiovasculares.....	15
1.8. Efectos de angiotensina-(1-9) en FC.	17
1.9. Retro-enantiómero de Ang-(1-9).....	19
2. HIPÓTESIS.....	22
3. OBJETIVO GENERAL	22
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5. METODOLOGÍA.....	26
5.1. Síntesis de los péptidos.	26
5.2. Modelo experimental.....	27
5.3. Cultivo primario de rata neonata.	28
5.4. Evaluación de la citotoxicidad de R.E. y Ang-(1-9) en los FC.....	29
5.5. Ensayo de viabilidad por azul del tripán.....	29
5.6. Ensayo de viabilidad por LDH.....	30

5.7. Estandarización de TGF- β 1.	30
5.8. Extracción y cuantificación de proteínas.	30
5.9. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western blot).	31
5.10. Ensayos de concentración-respuesta en FC.	32
5.11. Ensayo del efecto de Ang-(1-9) y R.E en la fibrogénesis.	32
5.12. Evaluación funcional del efecto de Ang-(1-9) y R.E. en la fibrogénesis. ...	33
5.13. Ensayo de geles de contracción de colágeno.	33
5.14. Análisis estadístico.	34
5.15. Cálculo n experimental	34
5.16. Cálculo rendimiento de ratas neonatas	35
6. RESULTADOS	37
6.1. OE1: Estandarizar las condiciones experimentales de trabajo con TGF-β1, Ang-(1-9) y retro-enantiómero de Ang-(1-9) en cultivo primario de rata neonata.	37
a) Determinar un tiempo óptimo de respuesta de TGF- β 1 en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata.	37
b) Determinar la citotoxicidad y la concentración adecuada de Ang-(1-9) y su retro-enantiómero en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata.	40
6.2 OE2. Estudiar los efectos anti-fibrogénicos de Ang-(1-9) y su retro-enantiómero en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata tratados con TGF-β1.	49
7. DISCUSIÓN	59
7.1. Activación de la vía canónica de TGF- β 1.	59
7.2. Tiempos de exposición con TGF- β 1 en FC.	60
7.3. Citotoxicidad de Ang-(1-9) y R.E.	62
7.4. Ang-(1-9) y R.E. no previenen la fibrogénesis mediada por TGF- β 1.	64
7.5. Ang-(1-9) y R.E. tienen efectos fibrogénicos en FC.	67
7.6. Efectos funcionales de Ang-(1-9) y R.E.: Geles de contracción.	76
7.7. Limitaciones.	79
8. CONCLUSIONES	80
9. REFERENCIAS	81

ABREVIATURAS

α -SMA (*α -smooth muscle actin*) – α -actina de músculo liso

β -MHC (*β -Myosin heavy chain*) – cadena pesada de β -miosina

μ M Micromolar

μ L Microlitros

ANG Angiotensina

ANOVA (*Analysis of variance*) – Análisis de varianza

ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) - Péptido natriurético auricular

AT1R (*angiotensin II type 1 receptor*) - Receptor de angiotensina tipo 1

AT2R (*angiotensin II type 2 receptor*) - Receptor de angiotensina tipo 2

BCA (*Bicinchoninic acid assay*) – Ensayo de ácido bicinconínico

BSA (*Bovine serum albumin*) – Albúmina de suero bovino

DCM diclorometano

DIEA N,N-Diisopropiletilamina

DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) – Medio Eagle modificado de Dulbecco

DMF N,N-dimetilformamida

DMSO *Dimetil sulfóxido*

COL-I Colágeno tipo I

ECA Enzima convertidora de angiotensina I

ECV Enfermedades cardiovasculares

FC Fibroblastos cardíacos

FN Fibronectina

Fmoc Grupo protector fluorenilmetoxicarbonilo

h Horas

HPLC (*High performance liquid chromatography*) - Cromatografía líquida de alta eficacia

IM Infarto del miocardio

LDH lactato deshidrogenasa

LAP (*latency-associated peptide*) - Péptido asociado a la latencia

MAPK (Mitogen-activated protein kinase) – Proteína quinasa activada por mitógenos

min Minutos

MEC Matriz extracelular

MMPs (*Matrix metalloproteinases*) - Metaloproteínas de matriz

MINSAL Ministerio de salud

ml Mililitros

MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) - Bromuro de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio

NBC Núcleo Biotecnología Curauma

NO (*Nitric oxide*) - Óxido Nítrico

ng Nanogramos

nM Nanomolar

nm Nanómetros

OMS Organización mundial de la salud

PBS (*Phosphate-buffered Saline*) – Solución salina tamponada de fosfato

PD123,319 Ditrifluoroacetato de ácido 1 - [[4-(dimetilamino)-3-metilfenil] metil]-5-(difenilacetil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo [4,5-c] piridin-6-carboxílico

PDA (*photo diode array*) - Detector de matriz de fotodiodos

PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) – Fluoruro de polivinilideno

R.E. Retro-enantiómero

RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*) – Amortiguador de ensayo de radioimmunoprecipitación

rpm Revoluciones por minuto

SCV Sistema cardiovascular

SDS (*Sodium dodecyl sulphate*) – Dodecil sulfato de sodio

SEM (*Standard error of the mean*) – Error estándar de la media

SBF Suero fetal bovino

SRA Sistema renina-angiotensina

SPSHR (*Stroke-prone spontaneously hypertensive rats*) – ratas espontáneamente hipertensas propensas a sufrir un accidente cerebrovascular.

TBS-T (*TRIS-buffered saline with Tween 20*) – Solución salina tamponada de TRIS con Tween 20

TFA (*Trifluoroacetic acid*) Ácido trifluoroacético

TGF- β 1 (*Transforming growth factor β 1*) – Factor de crecimiento transformante β 1

T β RI (*Transforming growth factor β receptor I*) – Receptor I del factor de crecimiento transformante β

T β RII (*Transforming growth factor β receptor II*) – Receptor II del factor de crecimiento transformante β

VSMC (*Vascular smooth muscle cells*) – Células musculares liso vasculares

WT (Wild type) – Tipo salvaje

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fibrosis en el remodelado cardiaco a nivel de tejido cardiaco.	6
Figura 2. Vías de señalización de T β RI/II activadas por TGF- β	11
Figura 3. Proceso de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, orquestado con TGF- β 1 y Ang II.....	12
Figura 4. Sistema renina-angiotensina. Vías canónica y alternativa.	15
Figura 5. Comparación péptido normal con aminoácidos L y péptido retroenantiómero.	20
Figura 6. Activación de Smad3 por TGF- β 1.....	38
Figura 7. Efecto del TGF- β 1 en los niveles proteicos de FN a distintos tiempos.	39
Figura 8. Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de azul de tripán.	41
Figura 9. Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de LDH.....	42
Figura 10. Efecto de la concentración de Ang-(1-9) en los niveles de COL-I y FN..	43
Figura 11. Efecto de la concentración del R.E. en los niveles de COL-I y FN.	45
Figura 12. Efecto de la concentración de Ang-(1-9) en la fibrogénesis mediada por TGF- β 1.	47
Figura 13. Efecto de la concentración de R.E. en la fibrogénesis mediada por TGF- β 1.	48
Figura 14. Geles de contracción de colágeno.....	50
Figura 15. Efecto del co-tratamiento de TGF- β 1 con Ang-(1-9) o R.E en los niveles de FN.....	54
Figura 16. Efecto del pre-tratamiento de Ang-(1-9) o R.E antes del estímulo con TGF- β 1 en los niveles de FN.	55
Figura 17. Efecto del co-tratamiento de Ang-(1-9) o R.E con TGF- β 1 en la fosforilación de Smad3.	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en Western blot.	32
--	----

RESUMEN

Introducción: Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son las principales causas de muerte en Chile y en el mundo, a expensas de patologías como el infarto del miocardio (IM). Durante el remodelado cardíaco, la zona infartada se puebla de abundantes fibroblastos cardíacos (FC) y uno de los factores clave en dicho proceso es el TGF- β 1, el cual se induce y activa en el remodelado cardíaco y promueve la fibrosis. Por otro lado, la génesis y desarrollo de varias ECV se asocian con una activación crónica del sistema renina-angiotensina. Este sistema desempeña un papel importante en el control de la presión arterial, y su activación excesiva se asocia con fibrosis. Ang-(1-9) ejerce efectos anti-fibróticos en el sistema cardiovascular que pueden ser mediados a través del AT2R, pero no en todos los casos. Una limitante de Ang-(1-9) es la corta vida media, el cual puede ser degradado por proteasas. Una de las estrategias para aumentar su estabilidad es usar los análogos retro-enantioméricos. El nuevo péptido así originado tendría mayor estabilidad y podría conservar su actividad biológica.

Hipótesis y objetivos: Ang-(1-9) y su retro-enantiómero previenen la fibrogénesis cardíaca dependiente de TGF- β 1 en cultivo primario de FC de rata neonata. **Obj.1:** Estandarizar las condiciones experimentales de trabajo con TGF- β 1, Ang-(1-9) y el retro-enantiómero de Ang-(1-9). **Obj.2:** Estudiar los efectos anti-fibrogénicos de Ang-(1-9) y su retro-enantiómero. **Metodología:** En cultivos primarios de FC de ratas neonatas se probó la activación de TGF- β 1 y su tiempo ideal de respuesta midiendo la fosforilación de Smad3 y los niveles de

FN y COL-I por Western blot. Luego se estudió a distintas concentraciones de los péptidos, la citotoxicidad por ensayo del azul de tripán y ensayo con LDH. Posteriormente, se pretrató por 1h con los péptidos, para luego adicionar TGF- β 1 midiendo los niveles proteicos de FN y COL-I por Western blot. Finalmente, se estudió el efecto anti-fibrogénico de estos péptidos inducido por TGF- β 1, midiendo los niveles proteicos de FN y COL-I por Western blot y ensayos de contracción de geles de colágeno. **Resultados:** El tiempo ideal de respuesta para TGF- β 1 en FC de rata neonata son 72h. Ninguna de las concentraciones de los péptidos genera efectos citotóxicos. Ang-(1-9) y R.E. no fueron efectivos en prevenir el aumento de COL-I y FN y la contracción de los geles inducidos por TGF- β 1 en ninguna de las concentraciones, al contrario, generan efectos fibrogénicos similares a TGF- β 1. **Conclusión:** Ang-(1-9) y su R.E. no previenen la fibrogénesis cardiaca y generan efectos fibrogénicos en FC de rata neonata.

ABSTRACT

Introduction: Cardiovascular diseases (CVD) are the leading causes of death in Chile and the world, at the expense of pathologies such as myocardial infarction. During cardiac remodeling, the infarcted area is populated with abundant cardiac fibroblasts (CF). One of the critical factors in this process is TGF- β 1, which is induced and activated in cardiac remodeling and promotes fibrosis. On the other hand, chronic activation of the renin-angiotensin system has been linked to the genesis and development of several CVD. This system plays a vital role in controlling blood pressure, and its excessive activation is associated with fibrosis. Ang-(1-9) exerts anti-fibrotic effects on the cardiovascular system mediated through AT2R. A limitation of Ang-(1-9) is the short half-life, which proteases can degrade. One of the strategies to increase its stability is to use retro-enantiomeric analogs (R.E.). The new peptide thus originated would have greater stability and could retain its biological activity. **Hypothesis and objectives:** Ang-(1-9) and the retro-enantiomer of Ang-(1-9) prevent TGF- β 1-dependent cardiac fibrogenesis in primary culture of neonatal rat CF. **Obj.1:** Standardization of experimental working conditions with TGF- β 1, Ang-(1-9) and the retro-enantiomer of Ang-(1-9). **Obj.2:** To study the anti-fibrogenic effects of Ang-(1-9) and the retro-enantiomer of Ang-(1-9). **Methodology:** In primary cultures of neonatal rat CF, the activation of TGF- β 1 and the ideal response time were tested by measuring the phosphorylation of Smad3 and the levels of FN by Western blot. Cytotoxicity was then studied at different concentrations of the peptides by trypan blue assay and

LDH assay. Subsequently, it was pre-treated for 1 h with the peptides, and then TGF- β 1 was added, measuring the protein levels of FN and COL-I by Western blot. Finally, the anti-fibrogenic effect of these peptides induced by TGF- β 1 was studied, measuring the protein levels of FN and COL-I by Western blot and collagen gel contraction tests. **Results:** The ideal response time for TGF- β 1 in neonatal rat CF is 72h. None of the peptide concentrations generate cytotoxic effects. Ang-(1-9) and R.E. were ineffective in preventing the increase in COL-I and FN and the contraction of the gels induced by TGF- β 1 in any of the concentrations on the contrary, they can generate fibrogenic effects similar to TGF- β 1 in this model. **Conclusion:** Ang-(1-9) and its R.E. do not prevent cardiac fibrogenesis and they generate similar fibrogenic effects in neonatal rat CF.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades que afectan al corazón y los vasos sanguíneos, denominadas enfermedades cardiovasculares (ECV), son las principales causas de muerte en diversas regiones del mundo **(Hoyert et al., 2006)**. Según estimaciones recientes, cada año aproximadamente 17,5 millones de personas mueren debido a ECV, representando aproximadamente el 31% del total global de muertes **(Kreatsoulas & Anand, 2010)**. En nuestro país, las ECV permanecen como la principal causa de muerte y en el año 2014 representaron un 27.5% del total de defunciones, a expensas principalmente del ataque cerebrovascular (tasa 48,28/100.000 hab.) y del infarto del miocardio (IM) (tasa 45,47/100.000 hab.) **(MINSAL, 2014)**. Estas patologías se deben a la combinación de diferentes factores de riesgo como hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo, sobrepeso, consumo excesivo de alcohol y sedentarismo, los cuales se encuentran en el actual estilo de vida de la población, que muchas veces incluyen más de uno de estos factores, contribuyendo así al desarrollo de las ECV. Entre las ECV más conocidas, se encuentran el IM, la cardiopatía isquémica, la hipertrofia cardiaca, la miocardiopatía dilatada, la hipertensión arterial y la fibrosis cardiaca, entre otras, las cuales llevan a un proceso fisiopatológico común llamado remodelado cardíaco **(Selvetella et al., 2004; MINSAL, 2014)**. Dada la magnitud de la patología cardiovascular y considerando sus secuelas, es de vital importancia encontrar tratamientos efectivos para disminuir su incidencia.

1.2. Remodelado cardiaco

Inicialmente, el remodelado cardiaco es un proceso de adaptación, caracterizado por cambios en el miocardio que son necesarios para el mantenimiento de la función cardiaca en respuesta a una lesión. Sin embargo con el tiempo, este remodelado se vuelve inadaptado lo que lleva a disfunción cardiaca y un mayor riesgo de insuficiencia cardiaca (**Selvetella et al., 2004**). Estos cambios afectan tanto a la estructura como a la función del órgano e incluyen hipertrofia cardiaca y dilatación, inflamación, alteraciones eléctricas secundarias y fibrosis cardiaca (**Figura 1**) (**Schultz et al., 2002; Selvetella et al., 2004; Domeier et al., 2009; Fomovsky et al., 2012; Horiguchi et al., 2012**), por lo que es importante encontrar formas de atenuar o prevenir estos eventos patológicos.

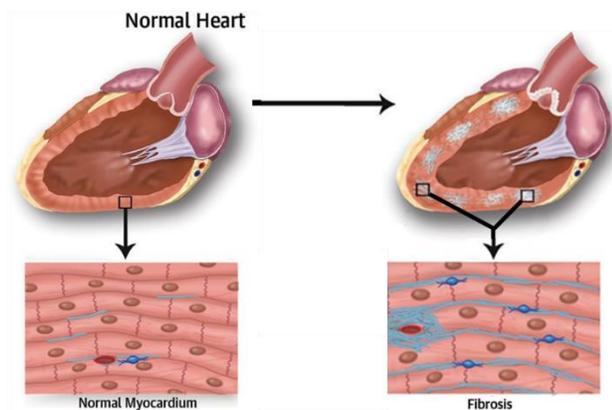


Figura 1. Fibrosis en el remodelado cardiaco a nivel de tejido cardiaco. Modificado de Blaser *et al.* Cardiac fibrosis and heart failure: ¿cause or effect? (pp. 23-53). (2015).

1.3. Fisiología cardiaca: fibroblastos cardiacos

Ahondando en la fisiología en el corazón, existen diversos tipos celulares, en donde los FC son las células intersticiales más abundantes en el miocardio de

mamíferos adultos (70% aprox.), seguidos por los cardiomiocitos (**Camelliti et al., 2005; Souders et al., 2009**). En el miocardio de un mamífero adulto normal, los fibroblastos se intercalan dentro de la red de la matriz colágena, a menudo rodeando a los cardiomiocitos y uniendo capas de tejido miocárdico (**Weber, 1989**). Como los principales productores de proteínas de matriz extracelular (MEC), los fibroblastos son responsables de mantener la integridad de la red de MEC cardiaca, preservando así la geometría de corazón. Se ha sugerido que los FC residentes pueden regular la transmisión de señales mecánicas y eléctricas, contribuyendo así a la función sistólica y diastólica normal del ventrículo (**Camelliti et al., 2005**). En el corazón en desarrollo, los FC embrionarios promueven la proliferación de los cardiomiocitos a través de interacciones que involucran la señalización de la integrina $\beta 1$, mientras que el corazón adulto, los FC se comportan como células que contribuyen a la homeostasis cardiaca, principalmente al mantener la red de la matriz extracelular (**Ieda et al., 2011**). Los fibroblastos generalmente se activan luego de una lesión, su papel como células reparadoras ha sido ampliamente reconocido y estudiado (**Bujak et al., 2007; Dobaczewski, Bujak, et al., 2010; Hinz, 2007, 2010; Khalil et al., 2017**). Prácticamente, todas las formas de cardiopatías están asociadas con la expansión y activación del compartimiento de FC, por lo tanto, estas células desempeñan un papel crítico en el remodelado del corazón después de una lesión y son reguladores clave de la geometría y función de este órgano en una amplia variedad de ECV (**Ieda et al., 2011**).

El corazón de un mamífero adulto tiene una capacidad regenerativa despreciable, por lo que la muerte de un gran número de cardiomiocitos durante un evento patológico cardiovascular (ej. IM), se desencadena una respuesta inflamatoria/reparadora de la que forman parte los FC: se retira eficazmente el tejido necrótico y finalmente el corazón sana, formándose una cicatriz basada en proteínas de la matriz extracelular, principalmente colágeno I (COL-I) y fibronectina (FN) **(Frangogiannis, 2008)**. La reparación cardiaca posterior al infarto es un proceso muy bien orquestado y el deterioro de cualquier aspecto de la respuesta reparadora de los fibroblastos tiene consecuencias catastróficas, lo que lleva a la rotura cardiaca, formación de aneurismas ventriculares, fibrosis miocárdica, entre otras **(Frangogiannis, 2006)**. Aún más, un remodelado adverso post-IM se asocia al aumento de la mortalidad y alta incidencia de arritmias ventriculares e insuficiencia cardiaca **(Wong et al., 2003)**. En resumen, se reconoce ampliamente que los FC están implicados en la patogénesis del remodelado cardiaco **(Porter & Turner, 2009; Daskalopoulos et al., 2012)**.

1.4. Fibrosis cardiaca mediada por TGF- β 1

Durante la fase proliferativa del proceso de cicatrización, la zona infartada está poblada por abundantes FC, modificados fenotípicamente, denominados miofibroblastos. Estas células combinan las características estructurales y fenotípicas de las células musculares lisas, adquiridas a través de la formación de fibras de estrés contráctiles, con un extenso retículo endoplásmico **(Hinz,**

2007-a, 2010). Una molécula importante en dicho proceso de diferenciación fenotípica es el TGF- β 1, la cual se induce y activa en el miocardio infartado y promueve la transcripción del gen de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) en el FC, marcador distintivo de diferenciación a miofibroblastos, mediante la activación de la cascada de señalización de Smad2/3 (vía canónica) **(Dobaczewski et al., 2010-b).** Las alteraciones en la composición y las propiedades mecánicas de la MEC también juegan un papel importante en la diferenciación de los fibroblastos ya que la generación de miofibroblastos diferenciados α -SMA positivos requiere la cooperación entre la señalización de TGF- β 1, el estrés mecánico y las proteínas de la MEC **(Hinz et al., 2007-b).** Otro factor, es la variante de empalme ED-A de la FN celular, la cual está regulada al alza en el corazón infartado **(Knowlton et al., 1992)** y media la adquisición del fenotipo miofibroblasto **(Serini et al., 1998; Arslan et al., 2011).** El estrés mecánico también estimula directamente la transcripción de α -SMA **(Zhao et al., 2007),** pero no es suficiente para inducir la diferenciación de miofibroblastos en ausencia de TGF- β 1. Aunque la expresión de α -SMA aumenta la actividad contráctil celular, no es un requisito para el fenotipo de miofibroblasto, ya que, en las primeras etapas del proceso de cicatrización, los miofibroblastos tienen fibras de estrés compuestas de actina citoplasmática, mientras que carecen de expresión de α -SMA; estas células se denominan proto-miofibroblastos **(Hinz et al., 2007-a).** Dicho lo anterior, TGF- β 1 es el factor más importante y determinante para la diferenciación de FC a miofibroblastos y así generar la fibrosis cardiaca.

1.5. Activación de TGF- β 1

TGF- β es un factor de crecimiento multifuncional y con una amplia gama de efectos pleiotrópicos sobre la apoptosis, proliferación, migración y diferenciación celular. La expresión de TGF- β 1 aumenta notablemente después de un infarto agudo de miocardio y se localiza predominantemente en la zona del daño (**Bujak et al., 2007**). En mamíferos, TGF- β se encuentra en tres isoformas (TGF- β 1, 2 y 3) codificadas por tres genes distintos (**Schiller et al., 2004**). TGF- β 1 es la isoforma específicamente liberada por los FC después del daño. TGF- β 1, en general, se produce como un propéptido latente, que se une covalentemente al péptido asociado a la latencia (LAP) para formar un complejo inactivo, incapaz de asociarse con sus receptores, pero luego es procesado por la plasmina, y distintas metaloproteinasas (MMP) como MMP-2 y MMP-9 activando al TGF- β 1 (**Ignotz & Massague, 1986; Rifkin et al., 1999; Annes et al., 2003**). Las integrinas, específicamente la $\alpha\beta$ 6 también participan en la activación de TGF- β 1 al unir simultáneamente el complejo de TGF- β 1 y las proteasas, lo que facilita la escisión enzimática del complejo latente, o al alterar la conformación latente de TGF- β 1 (**Wipff & Hinz, 2008**). El TGF- β 1 activo se une al receptor de tipo II constitutivamente activo (T β RII) en la superficie celular, luego se transfosforila el dominio citoplasmático del receptor de tipo I (T β RI), formándose así un dímero entre los 2 receptores, que propaga señales intracelulares río abajo, a través de una vía canónica compuesta de las proteínas Smad 2/3 (**Shi & Massagué, 2003**), la cual está implicada en el desarrollo de la fibrosis, al

regular la secreción de proteínas de la matriz extracelular como COL-I y FN ED-A (**Biernacka *et al.*, 2011**). Además de la activación canónica de Smad, TGF- β 1 también emite señales a través de vías independientes de Smad o también llamadas vías no canónicas que involucran la activación de distintas MAPK como ERK1/2, JNK y p38 que también contribuyen con el proceso fibrótico (**Derynck & Zhang, 2003**) (**Figura 2**).

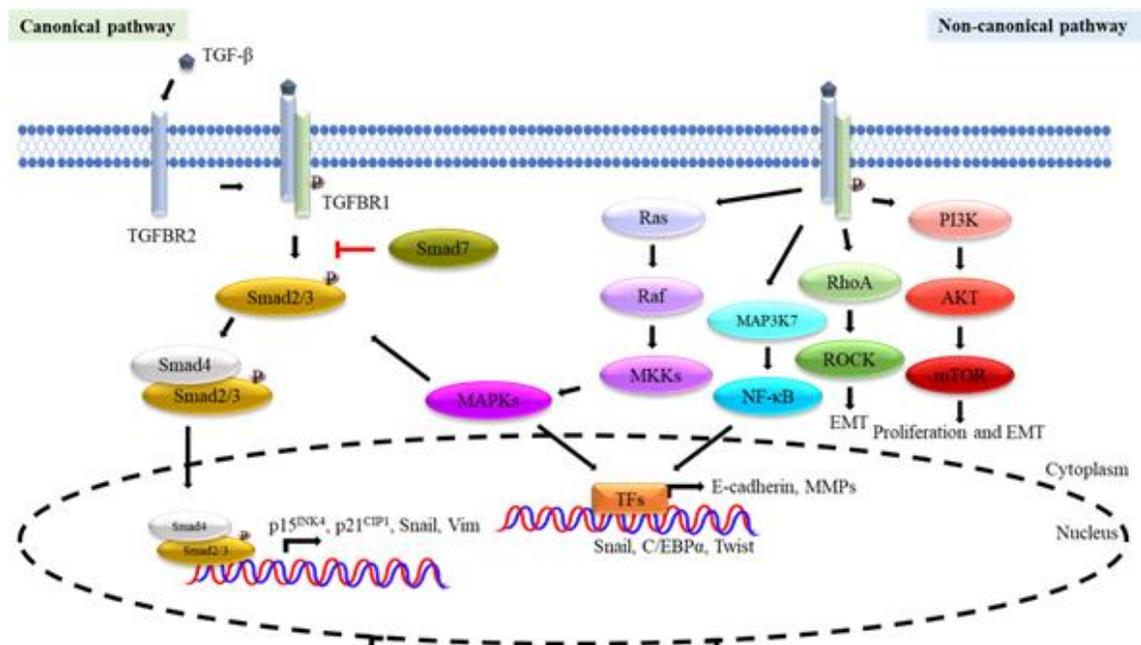


Figura 2. Vías de señalización de T β R1/II activadas por TGF- β . Vía canónica que involucra proteínas Smad (izquierda) y no canónica que involucra proteínas MAPK (derecha). *Modificado de Xue et al. Cancers (2020).*

TGF- β 1 tiene efectos profundos sobre el fenotipo de los fibroblastos y la expresión génica y puede inducir fibrosis cardíaca a través de varios mecanismos (**Leask & Abraham, 2004**). Hay evidencia que indica que la vía de Smad3 es esencial para el desarrollo de fibrosis y disfunción diastólica después del IM a

través de los efectos sobre la activación y la transdiferenciación de los FC (**Dobaczewski *et al.*, 2010-a**). Por tanto, la inhibición de las acciones de TGF- β 1 podría tener un rol protector al atenuar los efectos pro-fibróticos. En este proceso fibrótico cardiaco existen otros sistemas que también lo regulan como es el sistema renina-angiotensina, del cual forma parte Ang II, péptido que también participa en el desarrollo de varias ECV y que se le han atribuido efectos pro-fibrogénicos en FC (**Schmieder *et al.*, 2007; Unger, 2002**) (**Figura 3**).

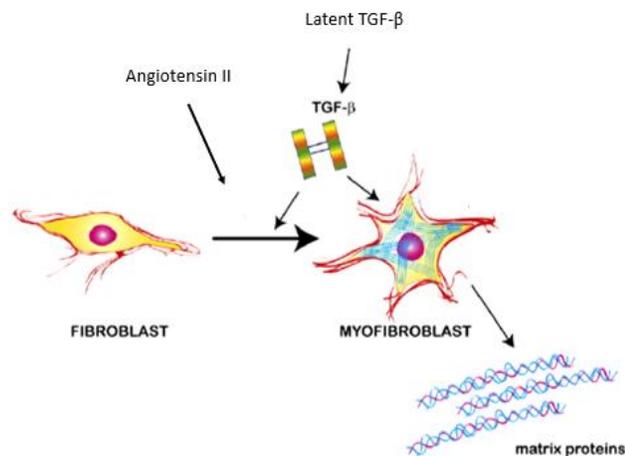


Figura 3. Proceso de diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, orquestado por TGF- β 1 y Ang II. Modificado de Chen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* (2013).

1.6. Sistema renina-angiotensina (SRA)

Este sistema desempeña un papel homeostático clave en el control de la presión arterial, el volumen del líquido y el equilibrio de electrolitos (**Ferrario & Strawn, 2006**). Su activación excesiva y crónica se asocia con hipertensión arterial, insuficiencia renal, hipertrofia y fibrosis cardiaca (**Boustany *et al.*, 2004; Ferrario & Strawn, 2006; Schmieder *et al.*, 2007**). En la hipertensión arterial, la presión

arterial se ejerce sobre los vasos sanguíneos y las paredes del corazón, lo que activa los mecanismos neurohormonales para controlar este aumento de la presión mecánica al aumentar la masa cardíaca y el grosor de la pared, lo que finalmente produce hipertrofia y fibrosis cardíaca **(Selvetella & Lembo, 2005)**. Por lo tanto, el estricto control regulatorio de la vía SRA es un requisito clave en la prevención y terapia de las ECV.

El SRA se compone de la renina, la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), angiotensinógeno y diversos receptores **(Carey, 2013)**. La regulación al alza de los diferentes componentes de SRA afecta a los vasos sanguíneos de varias maneras: **1)** Aplica tensión a los vasos sanguíneos al aumentar el flujo sanguíneo y causa remodelado vascular **(Resnick et al., 2003; Wen et al., 2015)**, **2)** Causa vasoconstricción, inflamación y trombosis debido a la reducción en la producción del óxido nítrico (NO) **(Tousoulis et al., 2011)**, **3)** Altera la función endotelial al aumentar la retención de agua y la concentración de iones de sodio en el cuerpo **(Dickinson et al., 2011)**.

La ECA se expresa principalmente en el endotelio vascular, pulmones, riñones e intestino y convierte a la angiotensina I (Ang I) en angiotensina II (Ang II), efector principal de este sistema **(Figura 4)** **(Cushman et al., 1971; Fernley et al., 1978; Bruneval et al., 1986; Shah et al., 2008)**. Ang II regula el tono vascular, la presión sanguínea y el equilibrio electrolítico. Los efectos de este péptido están mediados a través de la interacción con dos receptores acoplados a proteína G, receptor de angiotensina 1 y 2 (AT1R y AT2R, respectivamente), que tienden a

tener acciones opuestas (**Unger, 2002; Hannan et al., 2003; Schmieder et al., 2007; Musial et al., 2018**). Sin embargo, la mayoría de los efectos de Ang II están mediados a través del AT1R (**Mehta & Griendling, 2007**). La estimulación del AT1R con Ang II resulta en la activación de múltiples cascadas de señalización que conducen a promover la vasoconstricción, la proliferación celular, la retención de sodio, el estrés oxidativo y la fibrosis, los cuales están implicados en gran medida en la patogénesis de las ECV (**Mehta & Griendling, 2007**). En contraste con el AT1R, el papel y la función del AT2R contrarresta algunas acciones de la AT1R al inhibir el crecimiento y la proliferación celular, reducir el remodelado tisular y aumentar la vasodilatación e inhibir la fibrosis (**Nakajima et al., 1995; Booz & Baker, 1996; Akishita et al., 2000; Katada & Majima, 2002; Hannan et al., 2003**).

La visión tradicional del SRA ha cambiado significativamente en gran parte debido al descubrimiento de la ECA2 (**Donoghue et al., 2000; Harmer et al., 2002; Vickers et al., 2002**). Esta enzima es una homóloga que comparte aproximadamente el 42% de identidad con la ECA y se expresa en varios tejidos, incluidos el corazón, la vasculatura y el riñón (**Donoghue et al., 2000; Harmer et al., 2002**). Debido a las diferencias estructurales, ECA actúa principalmente como una peptidil dipeptidasa, mientras que ECA2 actúa como una carboxipeptidasa (**Vickers et al., 2002**). ECA2 funciona en el SRA al dividir los residuos C-terminales de Ang I y Ang II, reduciendo así los niveles de Ang II y aumentando los de angiotensina-(1-9) (Ang-(1-9)) y angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)),

respectivamente, péptidos descubiertos posteriormente y que son parte de la vía alternativa de SRA (**Figura 4**) (**Donoghue *et al.*, 2000**).

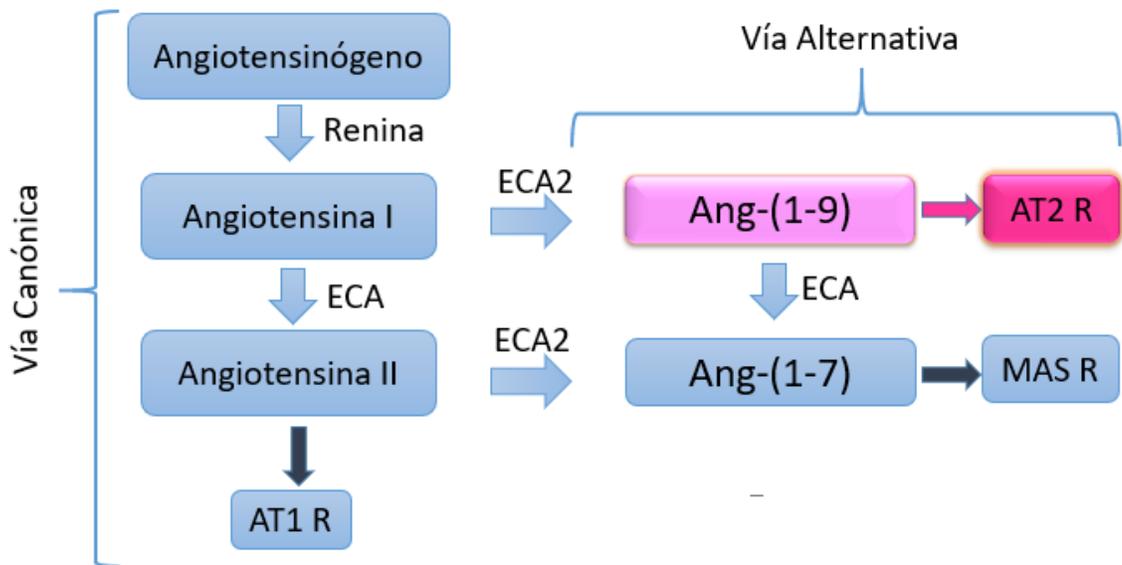


Figura 4. Sistema renina-angiotensina. Vías canónica y alternativa.

1.7. Angiotensina-(1-9) y sus efectos cardiovasculares

Originalmente, se pensaba que la Ang-(1-9) era un péptido biológicamente inactivo, lo que contribuía indirectamente a regular las acciones de Ang II al competir con ella por el sitio activo de ECA, lo que daba como resultado una reducción de Ang II y un aumento de los niveles de Ang-(1-7) (**Donoghue *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2002**). Sin embargo, Ang-(1-9) ejerce efectos biológicos directos en el sistema cardiovascular (SCV) mediados a través del AT2R. Por ejemplo, usando ensayos de unión de radioligandos se mostró que Ang-(1-9) podría unirse tanto a AT1R como a AT2R en cardiomiocitos y que sus efectos

antihipertróficos dependen del AT2R (**Flores-Muñoz et al., 2011**). Estos antecedentes sugieren que a pesar de tener una afinidad aproximadamente 100 veces menor para AT2R comparado con Ang II, Ang-(1-9) puede generar efectos funcionales a través de este receptor. Ang-(1-9) se puede generar a partir de Ang I mediante ECA2 (**Donoghue et al., 2000**) o mediante la actividad de carboxipeptidasa A o catepsina A (**Kokkonen et al., 1997; Jackman et al., 2002**). Aunque los niveles circulantes de Ang-(1-9) son aproximadamente 2-6 fmol/ml en modelos de ratas sanas, estos niveles aumentan en estados patológicos cardiovasculares (**Campbell et al., 1993; Kokkonen et al., 1997; Ocaranza et al., 2006**). Por ejemplo, en la insuficiencia cardiaca, Ang-(1-9) se forma a una tasa de 1 nM/min/mg en el miocardio y una gran proporción del Ang I disponible se convierte rápidamente en niveles iguales de Ang-(1-9) y Ang II, lo que sugiere que en condiciones patológicas el corazón funciona para aumentar los niveles de Ang-(1-9) (**Kokkonen et al., 1997**). Sin embargo, actualmente se sabe poco de los efectos biológicos de Ang-(1-9) en el sistema cardiovascular. La primera evidencia que mostró que Ang-(1-9) posee efectos biológicos directos en el corazón fue proporcionada por **Ocaranza et al., (2006)**, utilizando un modelo experimental de IM. Sus resultados mostraron que una semana post-IM, los niveles circulantes de Ang-(1-9), junto con los niveles de Ang II, ECA y ECA2, aumentaron en comparación con los animales controles. Sin embargo, a las 8 semanas post-IM, sólo los niveles de Ang II y ECA permanecieron elevados, mientras que los niveles circulantes de ECA2 y Ang-(1-9) fueron inferiores a los

observados en grupo control. El tratamiento con el inhibidor de ECA enalapril impidió los cambios hipertróficos observados a las 8 semanas post-IM e incrementó los niveles de Ang-(1–9) pero sin cambios en los niveles de Ang-(1-7). Un estudio posterior mostró un papel antihipertrófico de Ang-(1-9) utilizando cultivos primarios de cardiomiocitos de rata y un modelo experimental de IM (**Ocaranza et al., 2010**). Todas las acciones fueron independientes de Ang-(1-7) y de su receptor MasR (**Ocaranza et al., 2010**).

Otro grupo de investigación estableció el papel antihipertrófico de Ang-(1–9) en cardiomiocitos de conejos adultos y mioblastos H9c2 tratados con Ang II (**Flores-Muñoz et al., 2011**). Este estudio fue pionero en proporcionar una comparación directa entre Ang-(1-9) y Ang-(1-7). El efecto de Ang-(1-9) fue inhibido selectivamente por el antagonista de AT2R PD123,319, mientras que los de Ang-(1-7) solo fueron inhibidos por el antagonista de MasR A779, mostrando por primera vez acción biológica de Ang-(1–9) es mediada por el AT2R (**Flores-Muñoz et al., 2011**).

1.8. Efectos de angiotensina-(1-9) en FC.

A la fecha hay escasos estudios que relacionan el efecto de Ang-(1-9) en la fibrosis cardiaca. Ocaranza et al. observaron que este péptido reduce la hipertensión arterial, mejora las funciones cardiaca y endotelial, lo que se acompaña de una disminución de la fibrosis usando ratas hipertensas producidas por infusión de Ang II u oclusión de la arteria renal (**Ocaranza et al., 2014**). El

efecto beneficioso de Ang-(1-9) se mitigó mediante la administración conjunta del antagonista de AT2R PD123,319, pero no por la administración simultánea del bloqueador del receptor Mas A779 (**Ocaranza et al., 2014**). El tratamiento con Ang-(1-9) también disminuyó los niveles circulantes de Ang II, actividad de ECA y el estrés oxidativo tanto en aorta como el ventrículo izquierdo (**Ocaranza et al., 2014**). Sin embargo, el estudio de Flores-Muñoz *et al.* reveló que la administración de Ang-(1-9) en ratas espontáneamente hipertensas no afectó la presión arterial ni hipertrofia cardiaca, pero sí redujo la fibrosis cardiaca en un 50%, siendo también revertida por PD123,319 (**Flores-Munoz et al., 2012**). Además, Ang-(1-9) inhibió la proliferación y expresión de mRNAs de colágenos tipo Ia y IIIa en cultivos primarios de FC de ratas neonatas de manera dependiente de AT2R. Por tanto, es importante continuar profundizando los efectos anti-fibrogénicos de esta molécula debido a la escasa literatura existente y así dilucidar de mejor manera los efectos que tendría frente a otros estímulos pro-fibróticos como TGF- β 1, por ejemplo.

A pesar de todos estos efectos beneficiosos a nivel cardiovascular, una limitante de la Ang-(1-9) es su corta vida media tanto *in vitro* como *in vivo* (**Chen et al. 2005**). Este péptido puede ser convertido rápidamente a Ang-(1-7) por la ECA2 o a Ang III por las aminopeptidasas, o ser degradado por otras proteasas (**Forrester et al., 2018**), por lo que se requieren alternativas para mejorar la estabilidad y vida media de este péptido en sistemas biológicos, y una de estas aproximaciones es crear un retroenantiómero de dicho péptido.

1.9. Retro-enantiómero de Ang-(1-9)

Actualmente se requiere desarrollar nuevas estrategias para aumentar la estabilidad de distintos péptidos pequeños, siendo una de ellas su transformación a péptidos miméticos (**Fischer, 2005**). Entre éstos se encuentran los análogos retro-enantiómeros (R.E.) que consisten en unir D-aminoácidos no naturales, a diferencia del péptido original compuesto por L-aminoácidos, y además invertir el orden de los aminoácidos con respecto a la secuencia original (**Figura 5**). El nuevo péptido así originado contiene una orientación de sus cadenas laterales parecida a la molécula inicial y podría eventualmente conservar su actividad biológica (**Cardoso et al., 2018**). Adicionalmente, estas moléculas tienen mayor biodisponibilidad dado que son resistentes a la proteólisis. En consecuencia, la utilización de un R.E. podría garantizar estabilidad estructural, orientación espacial, topología de la cadena lateral y, en consecuencia, la bioactividad del péptido, obteniendo resistencia a la degradación enzimática en el modelo a trabajar (**Goodman et al., 1979**).

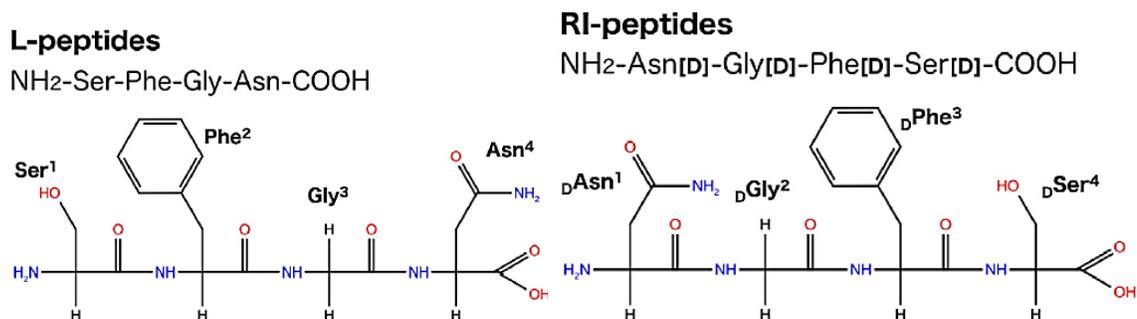


Figura 5. Comparación péptido normal con aminoácidos L y péptido retroenantiómero. Modificado de Cardoso *et al.* Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering (2018).

La memoria de pregrado de **Núñez (2018)** estudió la estabilidad de la Ang-(1-9) y R.E. en suero humano a temperatura fisiológica (37,5°C), obteniéndose alícuotas desde tiempo 0 hasta 48 h para luego ser analizadas por HPLC. Cuantificando el porcentaje remanente de cada péptido comparado con el de su tiempo 0, Ang-(1-9) a las 3 h prácticamente se encuentra en porcentajes menores al 10% de remanente mientras que el R.E. mantiene porcentajes remanentes de péptido alrededor del 70-80% a las 48 h. Este resultado mostró que el R.E. tiene una mayor estabilidad en suero humano. Adicionalmente en el mismo trabajo, se ensayó en cultivo primario de cardiomiocitos de ratas neonatas un pretratamiento de 1 h con Ang-(1-9) o R.E. para posteriormente adicionar norepinefrina (estímulo hipertrófico) por 48 h: y se observó que tanto con los marcadores de hipertrofia β -MHC y ANP como el área y perímetro celular disminuyeron tanto con Ang-(1-9) como con R.E. y de forma similar, por tanto R.E. tiene una actividad anti-hipertrófica equiparable a la del péptido nativo, lo cual da cuenta de que se

mantiene su actividad biológica. Sin embargo, los efectos del R.E. no han sido estudiados en FC *in vitro*.

En conclusión, la administración del R.E. de Ang-(1-9), dada su mejor estabilidad, sería un posible tratamiento para controlar la fibrosis cardiaca mediada por TGF- β 1, lo que proporcionaría una mejor aplicabilidad en sistemas biológicos.

Por ende, la pregunta de investigación es: **¿Ang-(1-9) y R.E. podrían prevenir la fibrogénesis mediada por TGF- β 1 en FC?**

2. HIPÓTESIS

Ang-(1-9) y su retro-enantiómero previenen la fibrogénesis cardiaca dependiente de TGF- β 1 en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata.

3. OBJETIVO GENERAL

Investigar los efectos anti-fibrogénicos de la Ang-(1-9) y su retro-enantiómero en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OE1: Estandarizar las condiciones experimentales de trabajo con TGF- β 1, Ang-(1-9) y su retro-enantiómero en cultivo primario de fibroblastos de rata neonata.

a) Determinar el tiempo óptimo de respuesta de TGF- β 1 en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata.

Raciocinio: La concentración de TGF- β 1 de 10 ng/mL se estableció como adecuada para diferenciar FC a miofibroblastos. Sin embargo, dado que el tiempo óptimo de estímulo con TGF- β 1 en FC es muy variable (desde 24 a 96 h) (**Vivar et al., 2016; Khalil et al., 2017; Villalobos et al., 2019**), se determinó experimentalmente en base a una respuesta fibrogénica significativa.

Diseño experimental: Cultivos primarios de FC de ratas neonatas se incubaron con medio DMEM-F12 que contenía 2% suero fetal bovino y expuestos a 10 ng/ml de TGF- β 1. A los 30 min post-estímulo se midieron los niveles proteicos de

Smad-3 fosforilado y total para comprobar la activación de la vía Smad por este estímulo a través de Western blot. Segundo, se aplicó el mismo estímulo de TGF- β 1, pero a distintos tiempos, 48-72-96 h, y se midieron los niveles proteicos de FN a través de Western blot.

b) Determinar la citotoxicidad y la concentración adecuada de angiotensina-(1-9) y de su retro-enantiómero en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata.

Raciocinio: Un aspecto esencial en la eventual aplicabilidad del R.E. es determinar si estimula citotoxicidad, la cual puede depender de la concentración, y otro aspecto también importante es determinar la concentración adecuada donde se observa una respuesta significativa de ambos estímulos. Hasta la fecha Ang-(1-9) ha mostrado *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo* ejercer efectos biológicos en diferentes células del SCV (cardiomiocitos, FC y células musculares lisas esqueléticas) en un rango de concentraciones entre 10 nM y 10 μ M, en ausencia de efectos citotóxicos (**Flores-Munoz *et al.*, 2011, 2012; Ocaranza *et al.*, 2010, 2014; Nuñez, 2018; Norambuena Soto, 2020**).

Sin embargo, para el R.E. se desconoce si puede tenerlos. Además, para ambos estímulos no se ha estudiado anteriormente una concentración adecuada de respuesta en este tipo celular.

Diseño experimental: Cultivos primarios de FC de ratas neonatas se incubaron con medio DMEM-F12 que contenía 2% suero fetal bovino y expuestos al R.E. o

a Ang-(1-9) en concentraciones entre 0; 0,01; 0,1, 1 y 10 μM . La viabilidad celular se evaluó por 2 aproximaciones experimentales: ensayo del azul de tripán y un kit para medir LDH liberado. Para escoger una concentración adecuada se realizaron experimentos concentraciones-respuesta. Primero se estimularon las células con Ang-(1-9) o R.E. en concentraciones entre 0; 0,01; 0,1, 1 y 10 μM y luego de 1 h se estimularon con TGF- β 1 hasta el tiempo establecido anteriormente en el apartado a). Finalmente se midieron los niveles proteicos de FN y COL-I por Western blot.

OE2. Estudiar los efectos anti-fibrogénicos de angiotensina-(1-9) y su retro-enantiómero en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata tratados con TGF- β 1.

Raciocinio: Existen antecedentes que Ang-(1-9) previene los efectos fibrogénicos *in vitro* e *in vivo* en modelos de ratas hipertensivas (**Flores-Munoz et al., 2012; Ocaranza et al., 2014**). Aún más, Ang-(1-9) inhibe la proliferación de FC y la expresión de colágeno tipo Ia y IIIa en cultivos primarios de FC de ratas neonatas de manera dependiente del AT2R (**Flores-Munoz et al., 2012**). Sin embargo, se desconocía si el R.E. imita estas acciones de Ang-(1-9) en cultivos primarios de FC de manera preventiva, ya que el objetivo de este trabajo era dilucidar si esta molécula retro-enantiomérica se podría administrar antes de que ocurra un evento fibrótico estimulado por TGF- β 1 en primera instancia.

Diseño experimental: Luego de establecer qué concentración y tiempo de estímulo eran los óptimos para el estudio del R.E. y Ang-(1-9), se realizaron 6 condiciones experimentales: • Control • Ang (1-9) • R.E. • TGF- β 1 • Ang-(1-9) + TGF- β 1 • R.E. + TGF- β 1.

Antes de la adición de TGF- β 1, se adicionó el R.E. o Ang (1-9) por 1h para ver los efectos preventivos de estas moléculas (últimas dos condiciones). Para cada condición se midieron: a) Niveles proteicos de FN y Smad3 fosforilado por Western blot y b) Ensayos de contracción de geles de colágeno.

5. METODOLOGÍA

5.1 Síntesis de los péptidos.

Ang-(1-9) y el péptido R.E. se sintetizaron en el Núcleo Biotecnología Curauma (NBC) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso por el siguiente procedimiento. Todos los solventes usados se secaron con alúmina y tamiz molecular. Se tomó el volumen deseado de solvente y se agregó a un tubo con alúmina. Luego se agitó en otro tubo se activó el tamiz llevándolo a 50°C por 15 min. Finalmente, se secó el tamiz molecular y se agregó solvente proveniente del tubo con alúmina. **Tratamiento de la resina:** Se pesó la cantidad de resina necesaria en un reactor y lavó dos veces con diclorometano (DCM) luego 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 mM (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 N,N-Diisopropiletilamina (DIEA), se agitó por 15 min, se añadió otros 2 equivalentes de DIEA y agitó 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 N,N-dimetilformamida (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) se añadió 1 mL de piperidina 20% (sin Tritón X-100), agitó por 20 min y se tomaron 30 μ L de esta solución y

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 CH₂Cl₂. Se realizó la prueba de Kaiser (con una muestra de peptideresina). 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-butyl éter seco. El péptido en bruto se recuperó por centrifugación y decantación de la fase de terc-butyl éter. Posteriormente se realizaron controles con cromatograma-espectro de masas con detector PDA.

5.2. Modelo experimental.

Para la realización de esta tesis el modelo experimental fue cultivo primario de FC de rata neonata. Los FC 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 (**Código comité facultad: CBE2019-13, Código CICUA: 19325-CYQ-UCH**).

5.3. Cultivo primario de rata neonata.

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 fueron 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 fibroblastos se aprovechó la adhesión diferencial a superficies plásticas que presentan los dos tipos celulares presentes en el corazón (cardiomiocitos y fibroblastos), sacando los sobrenadantes que es donde se mantienen los cardiomiocitos y conservando las placas con células adheridas que es en donde se encuentran los FC. Las placas sembradas se mantuvieron en incubadores termorregulados a 37°C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% aire. Luego de 2 h se lavaron 3 veces con PBS y dejaron las células con MM al 10% FBS, por 2 a 3 días antes de plaquearlos en placas de 35 mm.

5.4. Evaluación de la citotoxicidad de R.E. y Ang-(1-9) en los FC.

El ensayo de toxicidad se realizó con células sembradas en placas de distintos tamaños según el tipo de ensayo, con el R.E. o Ang-(1-9) a concentraciones de 0; 0,01; 0,1, 1 y 10 μM . Como control se usaron células sin tratamiento. Se usaron los métodos de conteo con azul de tripán y el ensayo de actividad de LDH.

5.5. Ensayo de viabilidad por azul del tripán.

Se utilizó la metodología descrita por **Catalán et al. (2012)**, sembrándose 2×10^5 células en placas de 35 mm. Luego se realizaron los tratamientos correspondientes en medio DMEM-F12 - 2% FBS. Posteriormente los sobrenadantes se recuperaron y las células se lavaron dos veces con 200 μl de PBS para luego incubarlas con 200 μl de tripsina por 5 min. Luego la tripsina se neutralizó con DMEM-F12 - 10% FBS (400 μl) y tanto los medios sobrenadantes como las células tripsinizadas se centrifugaron a 3800 rcf por 5 min. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 200 μl de PBS y se resuspendieron en 300 μl de medio DMEM-F12 al 2% FBS. Se tomaron 10 μl de la suspensión de células y mezclaron con 10 μl de azul de tripán. Posteriormente se contó en cámara de Neubauer en microscopio óptico en aumento de 4x las células totales (vivas y muertas) en los 4 cuadrantes de las esquinas y además se cuentan las células azules (muertas). El conteo se repitió dos veces para cada condición evaluada.

5.6. Ensayo de viabilidad por LDH

Se usó el kit **CytoTox 96® non-radioactive cytotoxicity assay (Promega)**, según instrucciones del fabricante. En placas de 6 pocillos (35 mm) se sembraron 2×10^5 células y se incubaron con los respectivos tratamientos. Luego se rescató el sobrenadante, y se adicionó 200 μ l de solución de Lisis (Tritón al 9% v/v) a las placas para la lisis celular, esperando 30 min. Luego en una placa de 96 pocillos se adicionaron 50 μ l de sobrenadante, y 50 μ l de solución de lisis de las placas, en pocillos separados y se les adicionó CytoTox 96R Reagent, por 30 min, protegiendo de la luz. Finalmente se agregaron 50 μ l de solución stop (ácido acético) y se midió la absorbancia a 490 nm.

5.7. Estandarización de TGF- β 1

Para estandarizar las condiciones de trabajo con TGF- β 1, placas de 35 mm con 3×10^5 células se trataron con TGF- β 1 (Sigma-Aldrich, #catálogo: T7039) por 30 min, para medir los niveles de Smad3 total y fosforilado. Otras placas se trataron por 48, 72 y 96 h para medir los niveles de FN por Western blot.

5.8. Extracción y cuantificación de proteínas

Las placas de 35 mm con 3×10^5 células post-tratamiento se lavadas dos veces con PBS 1x y tratadas por 30 min en hielo con 70 μ l de buffer RIPA y raspadas. Terminado el raspado se recuperó los 70 μ l y se sonicaron por 5 min a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm por 15 min a 4°C. Se

recuperó el sobrenadante y se cuantificó por kit de BSA (Thermo-Fisher, #catalogo: 23225) según condiciones establecidas por el fabricante.

5.9. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western blot).

Se siguió la metodología descrita por **Mendoza-Torres et al. (2018)**,

Electroforesis: Se cargaron 20 µg de proteína de cada uno de los tratamientos a los distintos tiempos en geles de poliacrilamida desnaturalantes al 10%. Se corrieron a 100 mV por 2 h en tampón de corrida 1X. **Electrotransferencia:**

Posteriormente se transfirieron las proteínas durante 12 h a 50 mA a membranas de PDVF que son previamente activadas con metanol por 30s.

Inmunodetección: Las membranas se bloquearon en solución TBS-T al 5% en leche descremada y se incubaron con anticuerpo primario de COL-I, FN, Smad3, Smad3 fosforilado o β-tubulina en la dilución señalada por cada proveedor, (**Tabla 1**) toda la noche en agitación. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo secundario-HRP por 1h y se lavaron con TBS-T 1x para posteriormente ser revelados con EZ-ECL. Las muestras se revelaron con el transiluminador **Licor**. Las imágenes se cuantificaron con UN-SCANIT gel 6.1 y se normalizaron con respecto al control de carga (β-tubulina).

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en Western blot.

Anticuerpo	Marca	# catálogo	Dilución
Smad3	Cell Signaling Technology	#9523	1:1000
Fosfo-Smad3	Cell Signaling Technology	#9520	1:1000
Fibronectina	Abcam	Ab2413	1:2000
Colágeno I	Abcam	Ab34710	1:5000
β -Tubulina	Cell Signalling Technology	#2128	1:5000

5.10. Ensayos de concentración-respuesta en FC

Para la realización de los experimentos concentración-respuesta de los péptidos se utilizaron 3×10^5 células sembradas en placas de 35 mm. Se probaron concentraciones de 0,01-0,1-1 y 10 μ M de Ang-(1-9) o R.E., pre-incubando los péptidos por 1 h, en presencia o ausencia de TGF- β 1 para luego dejarlas incubando por 72 h. Posteriormente se cuantificaron los niveles de colágeno soluble y de las proteínas de MEC COL-I y FN por Western blot

5.11. Ensayo del efecto de Ang-(1-9) y R.E en la fibrogénesis

Para evaluar el efecto anti-fibrogénico de los péptidos, 3×10^5 células sembradas en placas de 35 mm, se preincubaron por 1 h con Ang-(1-9) o R.E. a una concentración de 1 μ M. Luego se adicionó TGF- β 1, incubando por 72 h. Posteriormente se determinaron los niveles de proteínas de MEC: FN y COL por Western blot.

5.12. Evaluación funcional del efecto de Ang-(1-9) y R.E. en la fibrogénesis

Para evaluar el efecto anti-fibrogénico funcional de los péptidos, 3×10^5 células sembradas en placas de 35 mm se pre-incubaron por 1 h Ang-(1-9) o R.E. en concentraciones de 0,01 y 10 μM , para luego adicionar TGF- β 1 por 72 h. Posteriormente se midió la actividad contráctil de las células por ensayo de geles de contracción de colágeno.

5.13. Ensayo de geles de contracción de colágeno

Se utilizó la metodología descrita por **Su et al. (2015)**. Para ello 3×10^5 células sembradas en placas de 35 mm se trataron con los distintos estímulos y posteriormente disgregadas por 5 min con 200 μl de tripsina para luego agregar 400 μl de DMEM-F12 - 10% FBS. Posteriormente las células se centrifugaron a 2.000 rpm por 5 min y la pella celular se lavó dos veces con PBS-1X. Luego las células se contaron en una cámara de Neubauer y resuspendidas en medio DMEM-F12 - 2%, de tal forma de alcanzar $1,5 \times 10^5$ células/ml. En un tubo de polipropileno de 1,5 mL se colocaron 0,4 mL de células, 0,2 mL de solución de colágeno de cola de rata (MERCK, #catalogo: 08-115) 3,3 mg/mL en ácido acético al 0,1% y 8 μl de NaOH 1M, posteriormente se mezcló por pipeteo y se colocaron 0,5 mL de la solución de células en placas de 24 pocillos y se incubaron por 30 min a 37°C. Posteriormente con una punta amarilla se soltaron suavemente los geles de la pared de cada pocillo y se incubaron por 24h. Se

midió el tamaño del gel al inicio y al final del tiempo y se determina el porcentaje de contracción del gel, en veces de cambio por el programa Image J Fiji.

5.14. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como mediana \pm intercuartiles obtenidos del total de n de cada grupo. Con el fin de determinar si existe diferencia significativa entre los grupos estudiados los datos se analizaron con test no paramétrico Kruskal-Wallis y post-test de Dunn's y en algunos casos se realizó test paramétrico ANOVA de 2 vías con el programa GraphPad Prism6 para *Windows*. Se consideró diferencia significativa $p \leq 0,05$.

5.15. Cálculo N muestral

Para determinar el tamaño de la muestra de animales se consideró el número mínimo de observaciones para las técnicas que presenta el mayor error asociado. Esta técnica corresponde a Western blot (WB), la que presenta un error asociado al procedimiento del 20%. Por lo tanto, el número mínimo de observaciones necesarias se calculó de acuerdo a la variación intrínseca entre ellos. La fórmula que se aplicó para el cálculo fue la siguiente:

$$n=2 \times (Z\alpha/2 + Z\beta)^2 \times s^2/D^2$$

Donde:

n: Número de observaciones mínimas necesarias.

s: Desviación estándar de los valores individuales, que se supone igual en todos los grupos.

D: Diferencia que se espera estimar como estadísticamente significativa. Se estima que para WB será del orden del 40% para obtener diferencias estadísticamente significativas.

Z α : Probabilidad de cometer un error estadístico tipo I (5%);

Z β : Probabilidad de cometer un error estadísticamente significativo tipo II (20%).

Si se fija el nivel de significación mínima en 0,05 y la potencia que se desea para la prueba en (1- β) = 0,90 los correspondientes Z serán: Z $\alpha/2$ = 1,96 y Z β = 1,28.

Entonces:

$$n = 2 \times (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \times s^2 / D^2$$

$$n = 2 \times (1,96 + 1,28)^2 \times 0,22 / 0,42$$

$$n = 5,25 \text{ observaciones}$$

Con estos resultados se puede afirmar que se necesitarán 6 observaciones por cada punto de trabajo.

5.16. Cálculo rendimiento de ratas neonatas

En este estudio se utilizarán ratas neonatas para realizar cultivo primario de FC.

El número aproximado de fibroblastos obtenidos de cada corazón de rata neonata al tercer día después de sembrar los fibroblastos en placas de 100 mm es de 100.000 fibroblastos. Los cálculos de número de ratas neonatas se realizaron por objetivo, según la siguiente fórmula:

**n° de ratas = n° condiciones × n experimental (6n) ×
n° células por placa (300.000) ÷ n° células por corazón de rata (100.000)**

Objetivo 1: a) Estandarización TGF-β (WB) *10 condiciones*

b) Estandarización péptidos (ensayos citotox. Y WB) *48 condiciones*

Objetivo 2: Efectos antifibrogénicos (WB y geles de contracción) *28 condiciones*

Cálculo objetivo 1:

$$58 \times 6 \times 300.000 \div 100.000 = 1.044 \text{ ratas neonatas}$$

Cálculo objetivo 2:

$$28 \times 6 \times 300.000 \div 100.000 = 504 \text{ ratas neonatas}$$

Total de ratas neonatas utilizadas:

$$1.044+504=1.548 \text{ ratas neonatas}$$

Aprobado por el Comité de bioética de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (**Código comité facultad: CBE2019-13, Código CICUA: 19325-CYQ-UCH**).

6. RESULTADOS

6.1 OE1: Estandarizar las condiciones experimentales de trabajo con TGF- β 1, Ang-(1-9) y retro-enantiómero de Ang-(1-9) en cultivo primario de rata neonata.

a) Determinar un tiempo óptimo de respuesta de TGF- β 1 en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata.

En primera instancia se midió la actividad del TGF- β 1 a través de la activación de la vía Smad por lo que se midieron las proteínas Smad3 fosforilada, smad3 total y β -tubulina como control de carga (**Figura 6**). A las placas con células se les adicionó TGF- β 1 por 30 min, tiempo descrito para investigar la activación de la vía Smad (**Zi et al., 2012**). Después de retirar las placas del incubador, se determinaron los niveles proteicos de las proteínas ya mencionadas por Western blot. En este experimento se realizaron 5n experimentales, sin embargo, por problemas en la técnica, solo se pudo revelar smad3 total en 2n experimentales, por lo tanto, se graficó smad3 fosforilado normalizado con β -tubulina (5n), y con 2n se graficó smad3 fosforilado normalizado con Smad3 total.

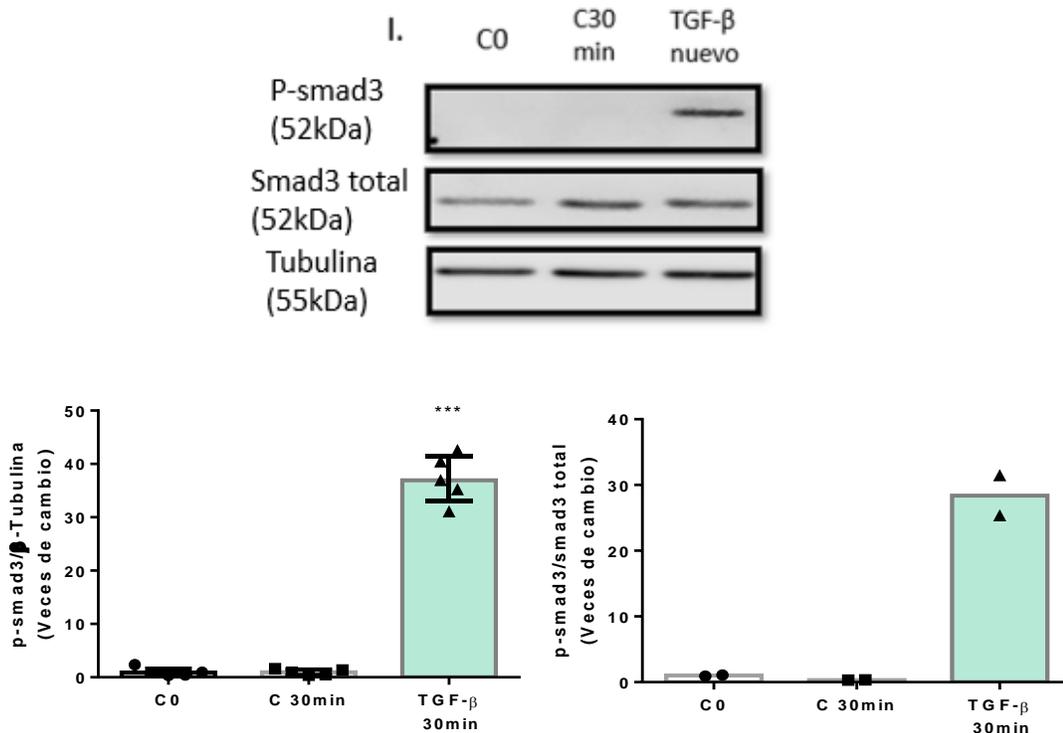


Figura 6. Activación de Smad3 por TGF-β1. FC de rata neonata se trataron con TGF-β1 (10 ng/ml) por 30 min. para luego medir la fosforilación de Smad3. En I) se observa una imagen representativa de Western blot, midiendo smad3 fosforilado (P-smad3), smad3 total y β-tubulina. El gráfico muestra smad3 fosforilado normalizado con tubulina (n=5) (gráfico izquierdo) y el gráfico de Smad3 fosforilado normalizado con smad3 total (n=2) (gráfico derecho) expresados como veces de cambio con respecto al control de 30 min. Los valores corresponden a mediana ± intercuartiles; ***p<0,001 vs. Control de 30 min. El análisis estadístico se realizó usando el test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's.

La **figura 6** muestra que efectivamente aumentaron los niveles proteicos de smad3 en respuesta a TGF-β1, demostrando que este factor funcionó correctamente en los FC de rata neonata.

A continuación, se determinó el tiempo adecuado de respuesta final, en donde se determinaron los niveles proteicos de FN como parámetro fibrogénico a través de Western Blot. Se estudiaron los tiempos 48, 72 y 96 h con el estímulo de TGF-β1 en los FC. La **figura 7** muestra los gráficos finales de cada tiempo con 8n experimentales, en donde 72 y 96h mostraron significancia. Se escogió la

temporalidad de 72h dado que a ese tiempo ya se observaron diferencias ,significativas en los niveles de FN.

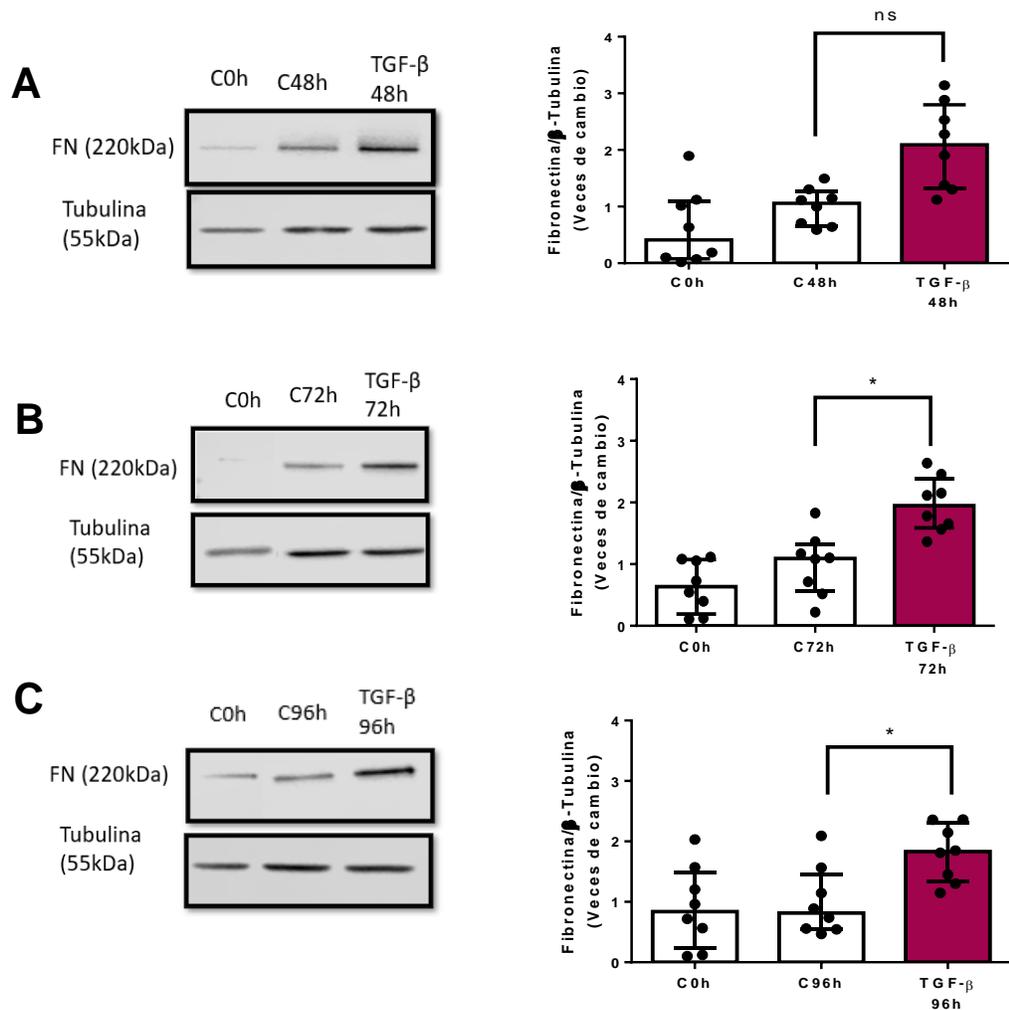


Figura 7. Efecto del TGF-β1 en los niveles proteicos de FN a distintos tiempos. FC de rata neonata se trataron por A) 48 h, B) 72 h y C) 96 h con TGF-β1 (10 ng/ml), para luego medir los niveles proteicos de FN. A la izquierda de cada gráfico se encuentra una imagen representativa del Western Blot. Los niveles están expresados como veces de cambio con respecto al control respectivo. Los valores corresponden a mediana ± intercuartiles; n=8; * p<0,05 vs. control. El análisis estadístico usado fue test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's.

b) Determinar la citotoxicidad y la concentración adecuada de Ang-(1-9) y su retro-enantiómero en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata.

Ya establecido el tiempo de trabajo, se determinó la citotoxicidad de Ang-(1-9) y de su retroenantiómero en FC. En primera instancia se evaluó la citotoxicidad de Ang-(1-9) y R.E., realizando 2 aproximaciones experimentales: azul de tripán (**Figura 8**) y ensayo de LDH (**Figura 9**). Se usó como control positivo de muerte celular la adición de 30 μM de H_2O_2 , el cual no fue utilizado en el análisis estadístico.

Los ensayos de azul de tripán (**Figura 8**) muestran que en el caso de Ang-(1-9), el n° de n experimentales fue bajo, por lo que no hay diferencias significativas con respecto al control positivo de muerte ni entre las distintas concentraciones estudiadas y el control negativo. En el caso de R.E. no hubo cambios significativos en cuanto a la viabilidad celular con respecto al control, en ninguna de las concentraciones estudiadas, sin embargo, la concentración de 10 μM de R.E. resultó dudosa, por la variabilidad de los datos, y sabiendo que la técnica tiene varias desventajas, entre ellas, errores del operador (recuento por poca dispersión de las células, pérdida de células durante la dispersión celular, llenado incorrecto de la cámara, presencia de burbujas de aire en la cámara) (**Aslantürk, 2018**), se procedió a complementar con otra técnica, el ensayo de LDH.

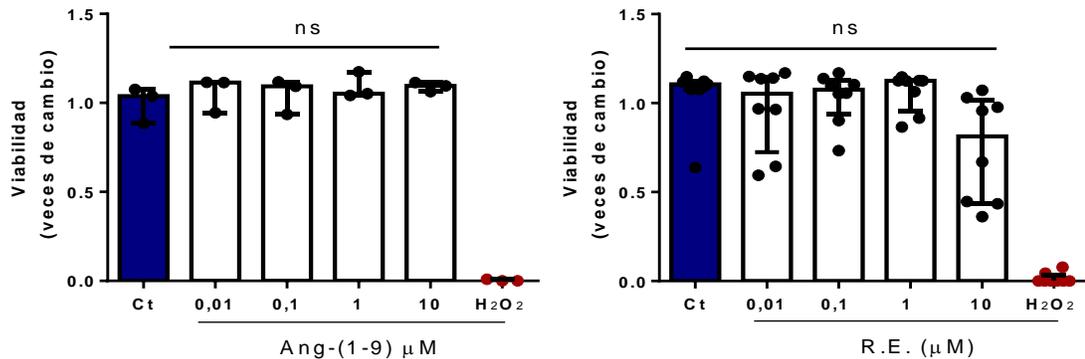


Figura 8. Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de azul de tripán. FC de rata neonata se trataron con Ang-(1-9) o R.E. a concentraciones de 0,01 a 10 µM por 48 h. Valores expresados como veces de cambio con respecto al control 0 µM, a distintas concentraciones de Ang-(1-9) (izquierda) y de R.E. (derecha). Los valores corresponden a mediana ± intercuartiles. n=3 y n=8 respectivamente. ns= no significativo. El análisis estadístico se realizó usando el test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's.

La **Figura 9** muestra los resultados de la medición de LDH, evidenciando que en el caso de R.E. no hubo cambios significativos en cuanto a la viabilidad celular con respecto al control negativo, en ninguna de las concentraciones estudiadas. En el caso de Ang-(1-9) ocurre algo similar en donde tampoco hay diferencias entre las distintas concentraciones y el control negativo. Estos datos sugieren que ninguno de los estímulos provoca muerte celular en este rango de concentraciones. La pérdida de LDH intracelular y su liberación en el medio de cultivo es un indicador de muerte celular irreversible debido al daño de la membrana celular, llamado necrosis (**Decker & Lohmann-Matthes, 1988; Fotakis & Timbrell, 2006**). Sin embargo, no se sabe si hay otros tipos de muerte celular actuando (apoptosis, por ejemplo).

En conclusión, los resultados sugieren que para las concentraciones estudiadas de Ang-(1-9) y de R.E., según el ensayo de azul de Tripán y el de la medición de LDH, no cambia la viabilidad de los FC con respecto al control negativo.

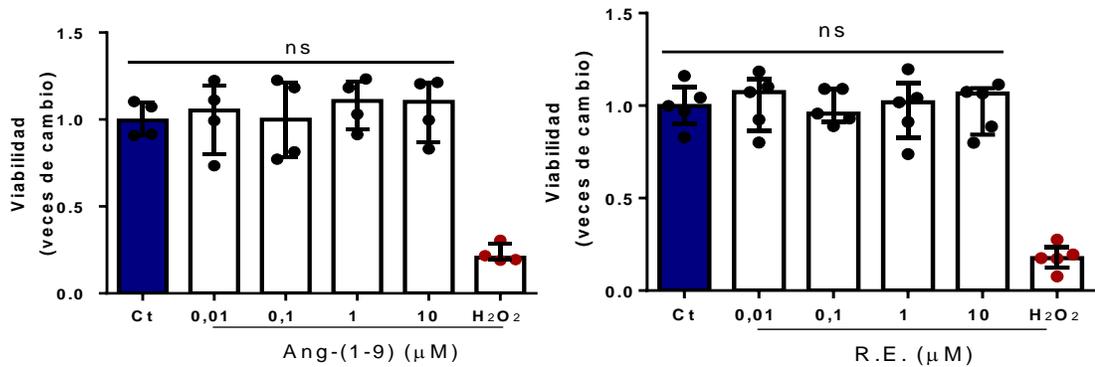


Figura 9. Evaluación de la viabilidad celular por ensayo de LDH. FC de rata neonata fueron tratados con Ang-(1-9) o R.E. a concentraciones de 0,01 a 10 μM por 48h. Valores expresados como veces de cambio con respecto al control 0 μM, a distintas concentraciones de Ang-(1-9) (izquierda) y de R.E. (derecha). Los valores corresponden a mediana ± intercuartiles. n=4 y b) n=5 respectivamente. ns= no significativo. El test estadístico usado fue test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's.

Una vez establecido que ninguno de los péptidos genera citotoxicidad en FC, y teniendo el tiempo de trabajo de 72 h, se procedió a encontrar la concentración adecuada de trabajo con los péptidos. Para este fin se realizaron experimentos concentración-respuesta a concentraciones de 0,01 – 0,1 – 1 y 10 μM de ambos péptidos midiendo la expresión proteica de COL-I y FN por Western blot, sin el estímulo TGF-β1 para dilucidar si por sí solos generaban efectos en los FC (Figuras 10 y 11).

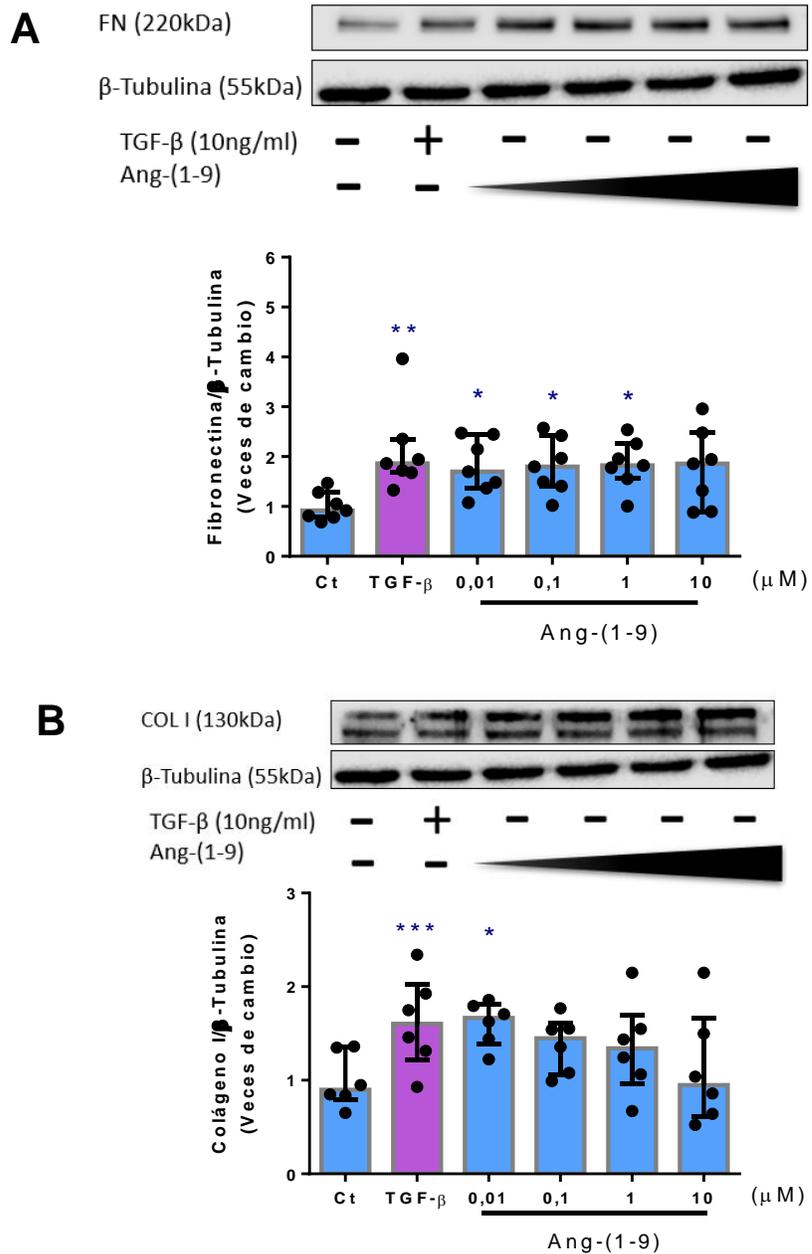


Figura 10. Efecto de la concentración de Ang-(1-9) en los niveles de COL-I y FN. FC de rata neonata se trataron con TGF- β 1 (10 ng/ml) o concentraciones de 0,01 a 10 μ M de Ang-(1-9) por 72 h. Arriba de cada gráfico se muestran las imágenes representativas de los Western blot de los experimentos tratados con Ang-(1-9). En los gráficos se muestran los experimentos concentración-respuesta con Ang-(1-9) midiendo FN (A) y COL-I (B) expresados como veces de cambio con respecto al control. Los valores corresponden a mediana \pm intercuartiles; En A n=7 y B n=6; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; vs. control. El test estadístico usado fue test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's.

Al observar las **Figura 10 A y B** que corresponden a los experimentos con Ang-(1-9), la condición solo con TGF- β 1 aumentó los niveles de las proteínas FN y COL-I con respecto al control negativo, sin embargo, en ninguna de las condiciones de concentraciones crecientes de Ang-(1-9) (de 0,01 a 10 μ M) se observan cambios significativos con respecto a la condición con TGF- β 1 solo.

No obstante, con respecto al control negativo, Ang-(1-9) a 0,01, 0,1 y 1 μ M logra aumentar significativamente los niveles de FN y a 0,1 μ M los niveles de COL-I, por lo que tiene efectos similares a TGF- β 1. Inicialmente se esperaba que el control sólo con Ang-(1-9) tuviera efectos distintos a la condición con TGF- β 1 solo, pero no ocurrió así en ninguna de las concentraciones.

Posteriormente, los mismos experimentos se hicieron con R.E. (**Figura 11**). En el caso de R.E., también los niveles de FN y COL-I aumentaron con TGF- β 1 con respecto al control de forma significativa, no obstante, nuevamente no se observan diferencias significativas entre los niveles proteicos de este péptido en las condiciones con concentraciones crecientes, con respecto a la condición con TGF- β 1 solo (**Figuras 11A y B**). Al igual que Ang-(1-9), R.E. muestra aumentos significativos de FN a 0,01 y 10 μ M con respecto al control negativo por lo que ambos péptidos a distintas concentraciones pueden aumentar este parámetro fibrogénico, de forma similar a TGF- β 1 no así el COL-I el cual no aumenta significativamente con respecto al control negativo en ninguna de las concentraciones.

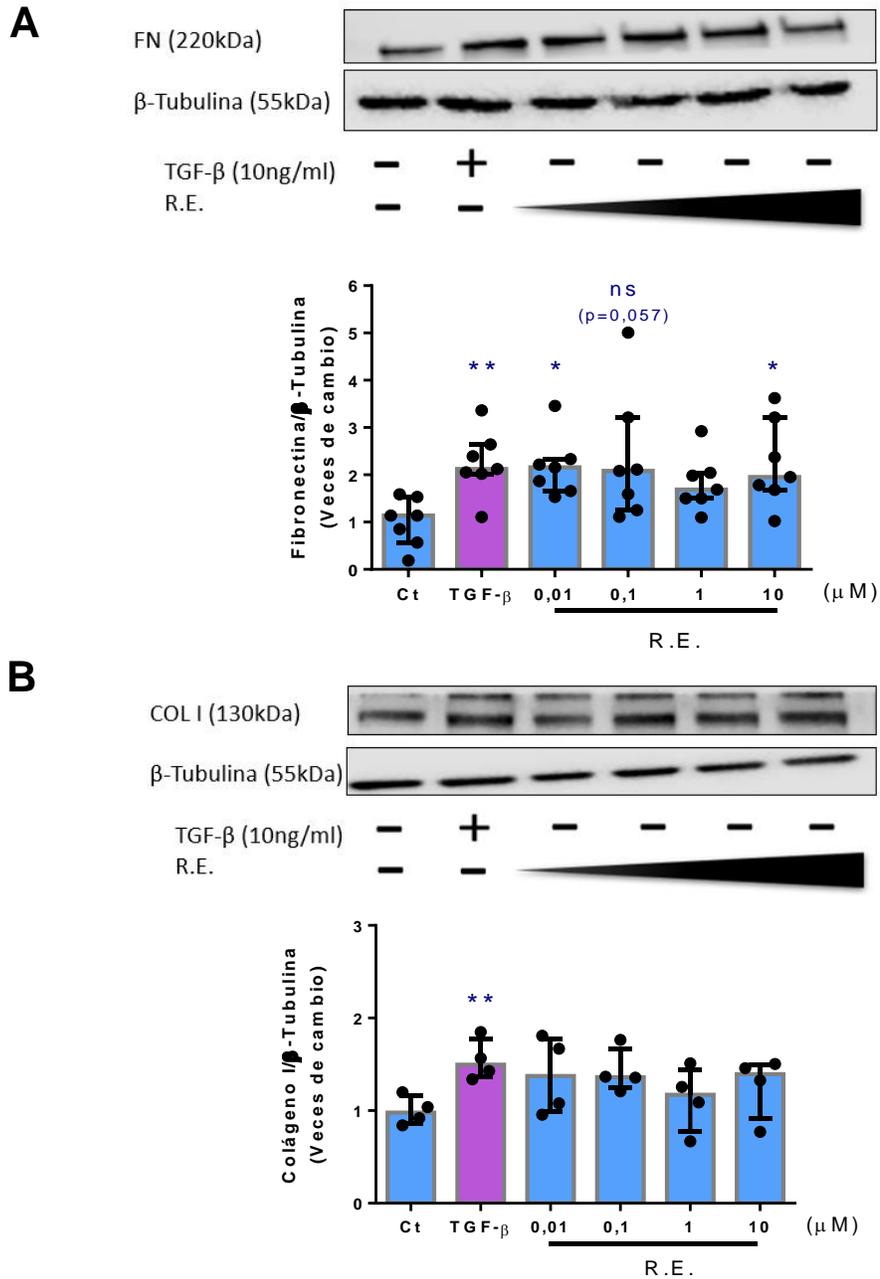


Figura 11. Efecto de la concentración de R.E. en los niveles de COL-I y FN. FC de rata neonata se trataron con TGF- β 1 (10 ng/ml) o concentraciones de 0,01 a 10 μ M de R.E. por 72 h. Arriba de cada gráfico se muestran las imágenes representativas de los Western blot de los experimentos tratados con R.E. En los gráficos se muestran los experimentos concentración-respuesta con R.E. midiendo FN (A) y COL-I (B) expresados como veces de cambio con respecto al control. Los valores corresponden a mediana \pm intercuartiles; En A n=7 y B n=4; *p<0,05; **p<0,01; vs. control. El análisis estadístico se realizó con el test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's.

A continuación, se realizaron los experimentos concentración-respuesta usando las mismas concentraciones crecientes de los péptidos (0,01-0,1-1-10 μM), pretratando por 1 h con los péptidos antes de la adición de TGF- β 1 (10 ng/ml) para luego medir FN y COL-I por Western blot para estudiar los posibles efectos preventivos en la fibrogénesis **(Figuras 12 y 13)**.

En ambos gráficos se observa un aumento de los niveles proteicos de FN y COL-I con TGF- β 1 a las 72 h con respecto al control, sin embargo, al hacer el análisis estadístico de las condiciones con concentraciones crecientes de Ang-(1-9) con TGF- β 1 y la condición de TGF- β 1 solo, no se muestran diferencias significativas de los niveles proteicos de estas dos proteínas **(Figuras 12A y B)**, por lo que ninguna de las concentraciones estudiadas de Ang-(1-9) previene la fibrogénesis frente a TGF- β 1 como se hubiera esperado. En la **Figura 12B** se observa que los niveles de COL-I del control positivo con Ang-(1-9) 10 μM sin TGF- β 1, son significativamente mayores con respecto al control sin tratamiento, por lo que se confirma que Ang-(1-9) por sí solo tiene efectos fibrogénicos, los cuales no se potencian con el tratamiento con TGF- β 1. Posteriormente se procedió a la realización de los mismos experimentos, pero esta vez con el péptido R.E **(Figura 13)**.

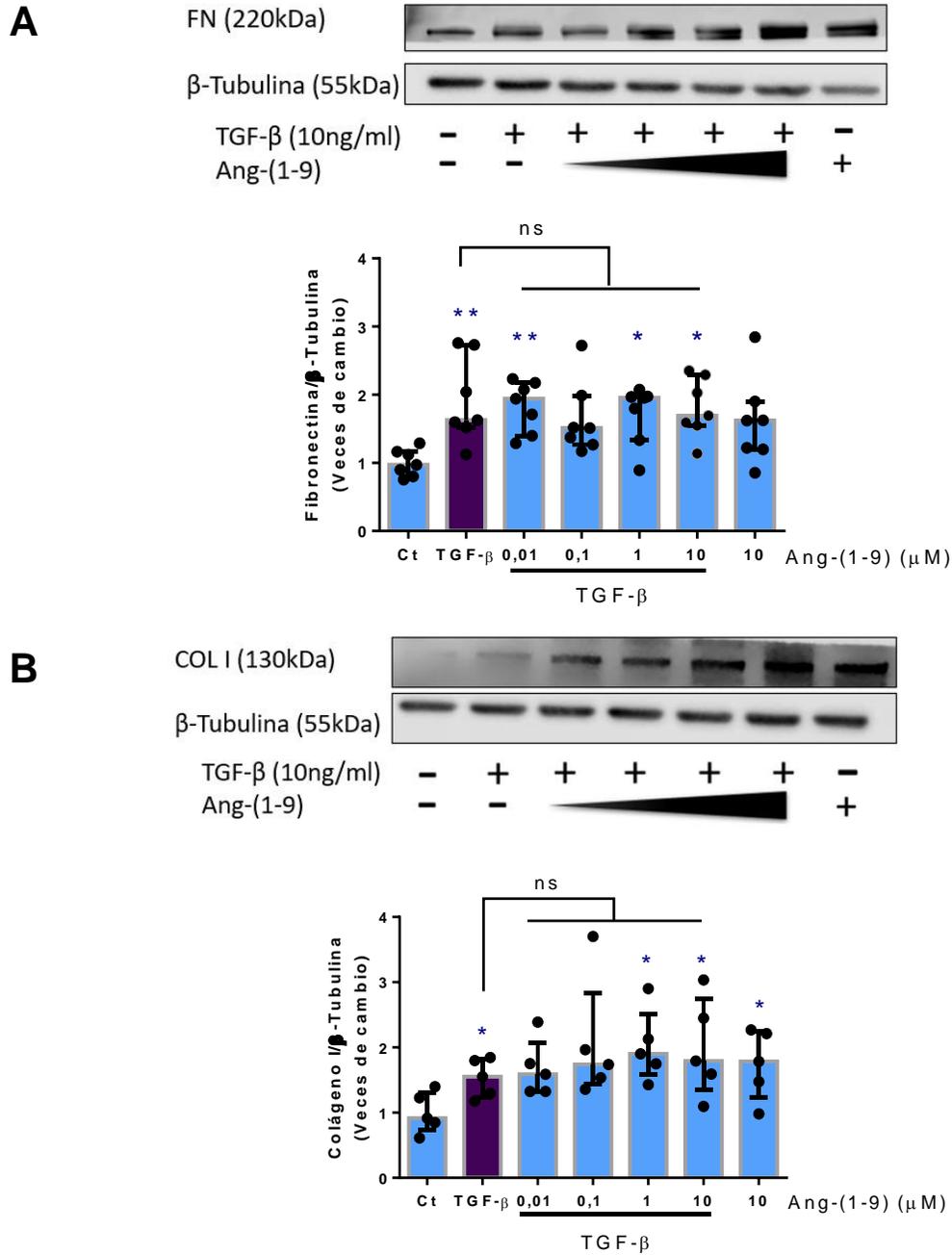


Figura 12. Efecto de la concentración de Ang-(1-9) en la fibrogénesis mediada por TGF- β 1. FC de rata neonata se trataron con un pretratamiento de 1h con concentraciones de 0,01 a 10 μ M de R.E y luego con TGF- β 1 (10 ng/ml) por 72 h. Arriba de cada gráfico se muestran las imágenes representativas de los Western blot de los experimentos tratados con Ang-(1-9). En los gráficos se muestran los experimentos concentración-respuesta con Ang-(1-9) midiendo FN (A) y COL-I (B) expresados como veces de cambio con respecto al control. Los valores corresponden a mediana \pm intercuartiles; En A n=7 y B n=5; *p<0,05; **p<0,01vs. control. ns= no significativo. El test estadístico usado fue test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's.

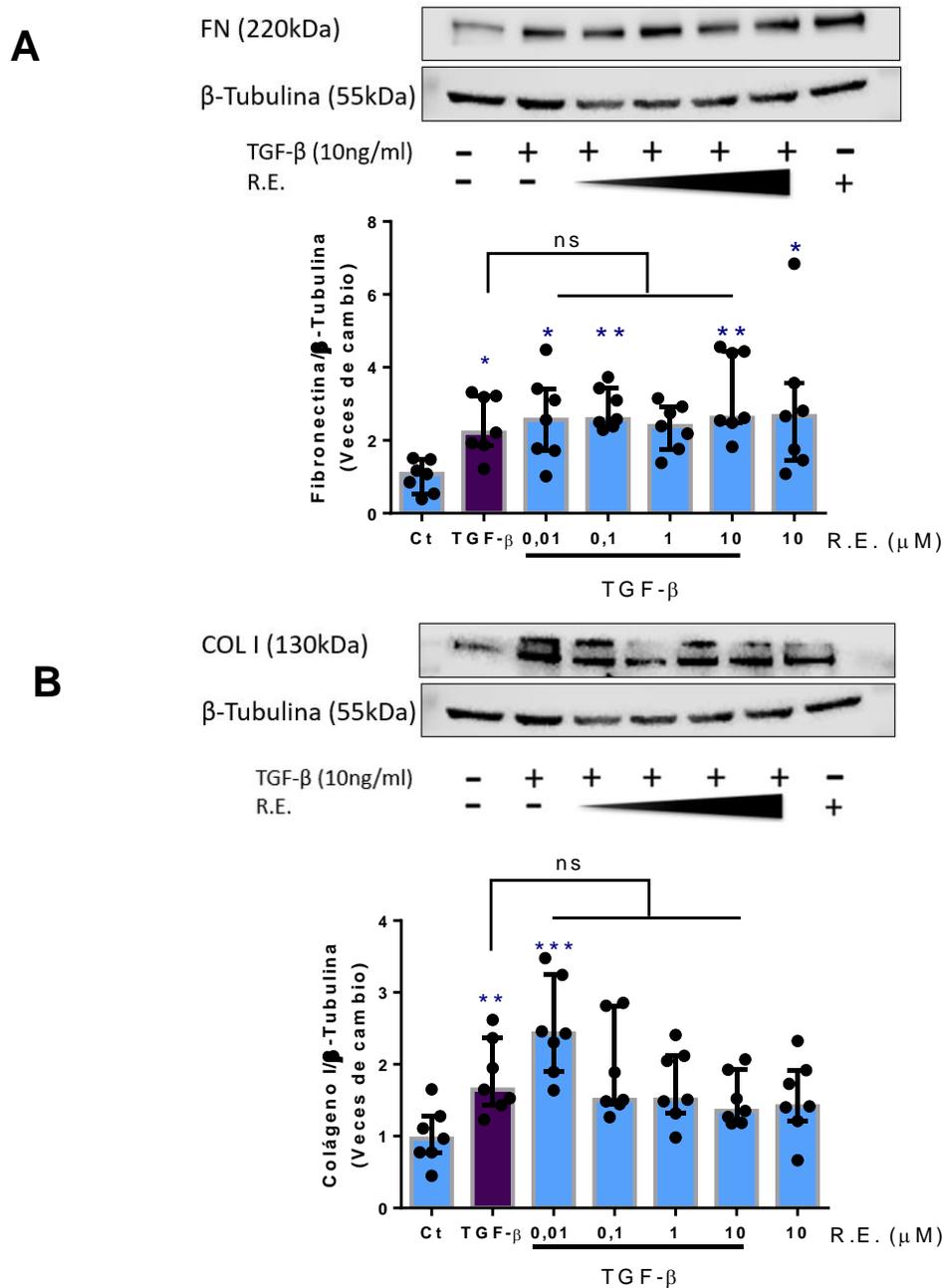


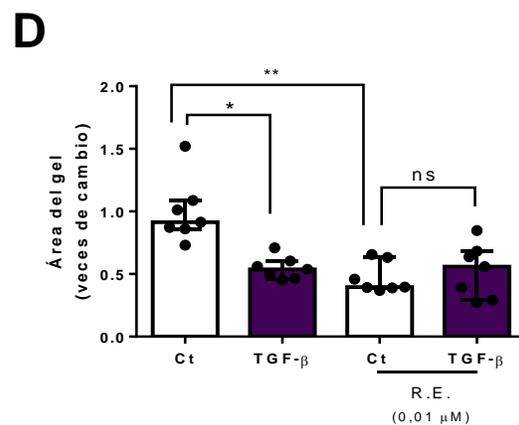
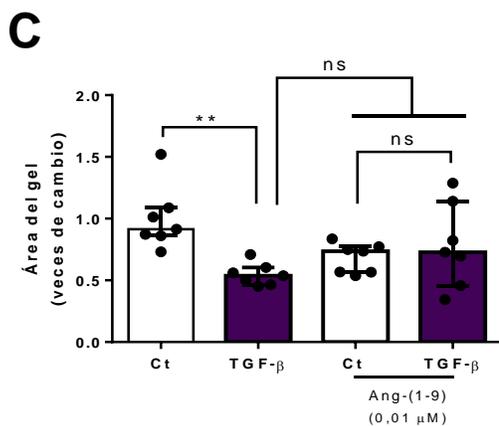
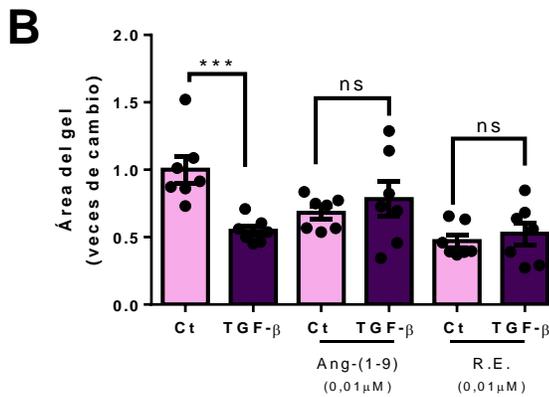
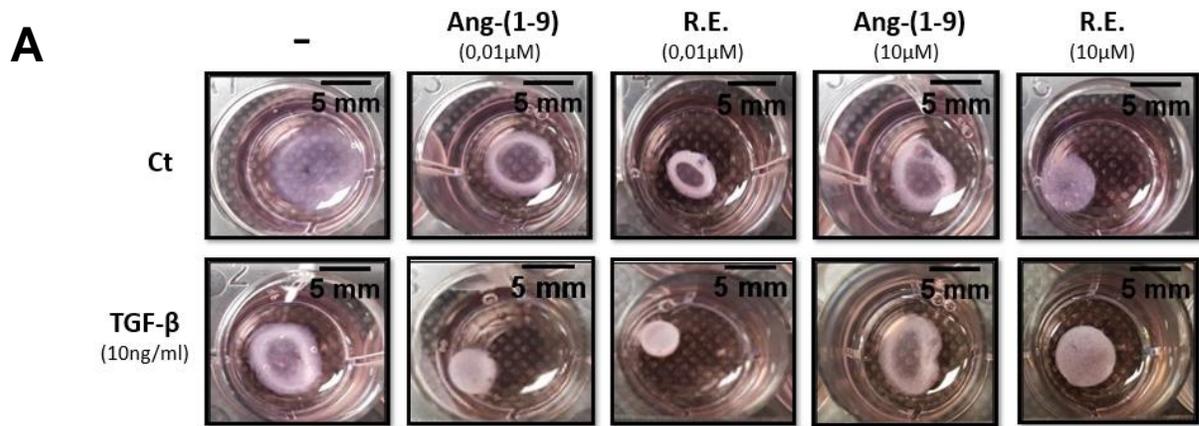
Figura 13. Efecto de la concentración de R.E. en la fibrogénesis mediada por TGF- β 1. FC de rata neonata fueron tratados con un pretratamiento de 1h con concentraciones de 0,01 a 10 μ M de R.E y luego con TGF- β 1 (10 ng/ml) por 72 h. Arriba de cada gráfico se muestran las imágenes representativas de los Western blot de los experimentos tratados con R.E. En los gráficos se muestran los experimentos concentración-respuesta con R.E. midiendo FN (A) y COL-I (B) expresados como veces de cambio con respecto al control. Los valores corresponden a mediana \pm intercuartiles; En A n=7 y B n=7; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. control. ns= no significativo. El análisis estadístico se realizó usando el test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's.

En este caso, el estímulo con TGF- β 1 también aumentó de manera significativa los niveles proteicos de FN y COL-I a 72h (**Figuras 13A y B**) con respecto al control negativo, sin embargo, al igual que con Ang-(1-9), los efectos de las distintas concentraciones crecientes no tuvieron diferencias significativas con respecto a TGF- β 1, y en el caso de FN (**Figura 13A**) el control solo con R.E. a 10 μ M mostró que aumenta los niveles de esta proteína de manera significativa con respecto al control negativo, por lo que R.E. también tiene efectos fibrogénicos similares a TGF- β 1, pero que tampoco se potencian con este. En conclusión, ninguna de las concentraciones de los péptidos estudiadas previene la fibrogénesis cardiaca, medida por los niveles proteicos de FN y COL-I, por el contrario, tienen efectos fibrogénicos similares a TGF- β 1.

6.2 OE2. Estudiar los efectos anti-fibrogénicos de Ang-(1-9) y su retro-enantiómero en cultivo primario de fibroblastos cardiacos de rata neonata tratados con TGF- β 1.

Debido a que ninguna de las concentraciones de los péptidos mostró efectos anti-fibrogénicos frente a TGF- β 1, se escogieron dos concentraciones de trabajo para los siguientes experimentos, la más baja (0,01 μ M) y la más alta (10 μ M), para realizar los geles de contracción de colágeno y así corroborar si hay o no un efecto anti-fibrogénico a nivel funcional. En las placas con células se hicieron pretratamientos de 1h con Ang-(1-9) o R.E. a concentraciones de 0,01 y 10 μ M para luego adicionar TGF- β 1 y luego incubar por 72h. Posteriormente se aplicó

el protocolo para la realización de los geles de contracción de colágeno para cada condición estudiada, los cuales se demoran 24 h en estar completamente listos para el análisis del área de circunferencia de los geles de colágeno y así compararlos con el control (Figura 14).



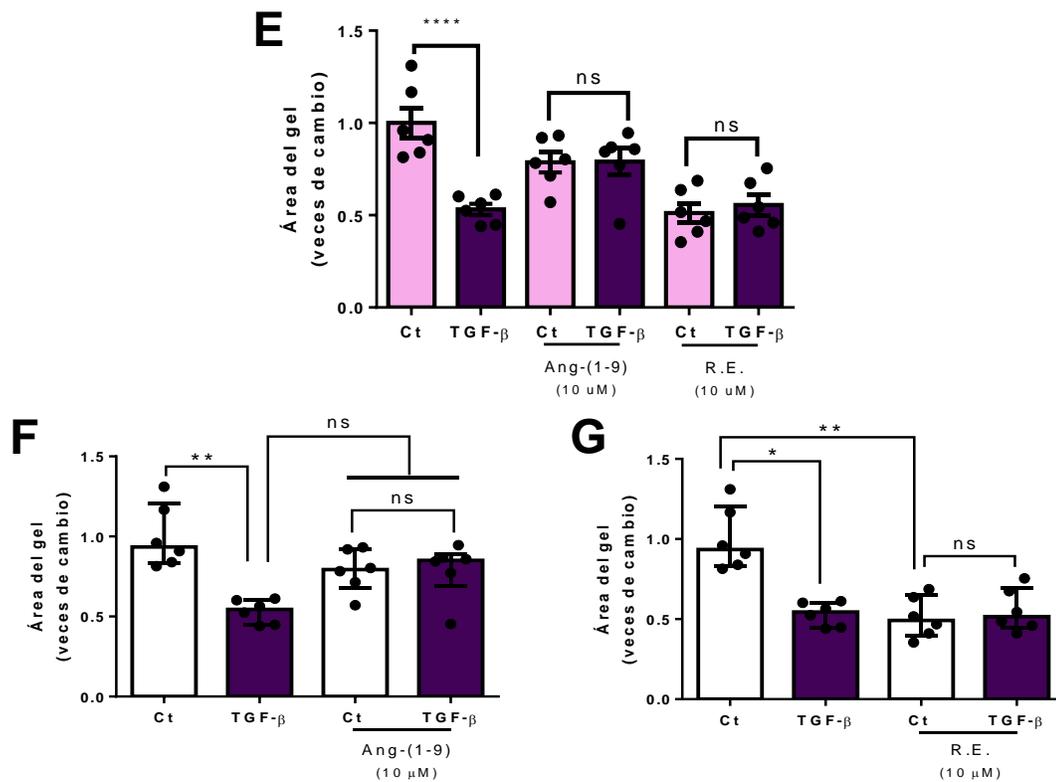


Figura 14. Geles de contracción de colágeno. FC de rata neonata se trataron con un pretratamiento de 1h con concentraciones de 0,01 (B, C, D) y 10 μM (E, F, G) de Ang-(1-9) o R.E y luego con TGF-β1 (10 ng/ml) por 72h. En la Figura A se muestra una imagen de los geles de contracción de colágeno a las 72h en las condiciones indicadas. En las figuras B y E se muestra el gráfico de la contracción del gel expresado en veces de cambio del área del gel con respecto al control, según análisis paramétrico. En C, D, F y G según test no paramétrico. Los valores corresponden al promedio ± SEM o a mediana ± intercuartiles. En B, C y D n=7 y E, F y G n=6; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 vs. control. ns= no significativo. El test estadístico usado fue test ANOVA de dos vías, post-test Tukey (B y E) y test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's (C, D, F, G).

En este caso se realizaron dos análisis estadísticos, primero un análisis paramétrico ANOVA de 2 vías a 0,01 y 10 μM de los péptidos (B y E respectivamente) y un análisis no paramétrico de las mismas condiciones (C, D, F, G). Las **Figuras 14 B-G** muestran que TGF-β1 disminuyó el área del gel significativamente con respecto al control negativo, lo cual era esperable. Sin embargo, en la **Figura 14B, C y D** se visualiza que el pretratamiento de 1 h con 0,01 μM de Ang-(1-9) o R.E., adicionando luego TGF-β1 no evidencia diferencias

significativas con respecto a la condición con TGF- β 1 solo, por lo que esta concentración no tuvo efecto preventivo respecto a la fibrogénesis a nivel funcional. La concentración de 0,01 μ M R.E. solo, disminuyó significativamente el área del gel con respecto al control negativo, dando cuenta de que este péptido a esta concentración podría tener efectos similares al TGF- β 1. Además, al comparar las condiciones de R.E. con su propio control, se observa que TGF- β 1 no aumenta aún más la contracción del gel, sino que se mantiene igual, por lo que el tratamiento de ambos juntos no potencia la contracción del gel.

En el caso de las **Figura 14E, F y G**, el pretratamiento de 1 h con 10 μ M de Ang-(1-9) o R.E., adicionando luego TGF- β 1 no presenta diferencias significativas con respecto a la condición con TGF- β 1 solo, por lo que esta concentración no tuvo efecto preventivo con respecto a la fibrogénesis a nivel funcional, al igual que la concentración anterior estudiada. Incluso, al igual que en el caso anterior, la concentración de 10 μ M de R.E. sin TGF- β 1, disminuyó significativamente el área del gel con respecto al control negativo, dando cuenta de que este péptido a esta concentración podría tener efectos similares al TGF- β 1. Al comparar las condiciones con su propio control, nuevamente se observa que TGF- β 1 no aumenta la contracción del gel con respecto a R.E. solo. En conclusión, a nivel funcional, ninguno de los péptidos tiene un efecto preventivo de la fibrogénesis en los FC, y además R.E. tiene efectos similares a TGF- β en la contracción de los geles que no son potenciados por esta citoquina.

Luego, se procedió a medir en las mismas condiciones, los niveles proteicos de FN, por Western blot, pero en este caso se usaron concentraciones solo de 1 μ M para emular de mejor manera las condiciones establecidas por literatura que también usan esta concentración de Ang-(1-9) en cultivo primario de FC (**Flores-Munoz et al., 2012; Ocaranza et al., 2014**).

Primero, se probó si el co-tratamiento de los péptidos con TGF- β 1 podría marcar la diferencia en cuanto a su acción anti-fibrogénica, y se comparó con el pretratamiento de 1h (**Figuras 15 y 16**). Para ambos casos, se usó un análisis paramétrico ANOVA y luego un análisis no paramétrico de los datos.

La **Figura 15B** muestra que TGF- β 1 solo aumentó los niveles de proteína de FN con respecto al control negativo de forma significativa en el test paramétrico. Sin embargo, el co-tratamiento de Ang-(1-9) o R.E. junto con TGF- β 1 por 72h no modificó los niveles respecto a TGF- β 1 solo, por lo que el co-tratamiento de Ang-(1-9) o R.E. con TGF- β 1 pareciera que no protege de la fibrogénesis. Además, al comparar las condiciones de co-tratamiento con su respectivo control no se observan diferencias significativas, sin embargo, en este caso los controles de péptidos solos sin TGF- β no aumentaron con respecto al control negativo, distinto a lo que se observó en los experimentos concentración-respuesta en donde 1 μ M de Ang-(1-9) aumentaba FN. En el caso del test no paramétrico (**Figuras 15C y D**), no hay diferencias significativas en ninguna de las condiciones estudiadas, probablemente porque el número de n experimentales no fue suficiente.

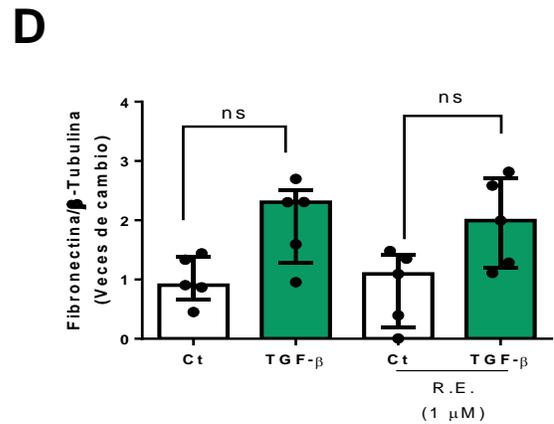
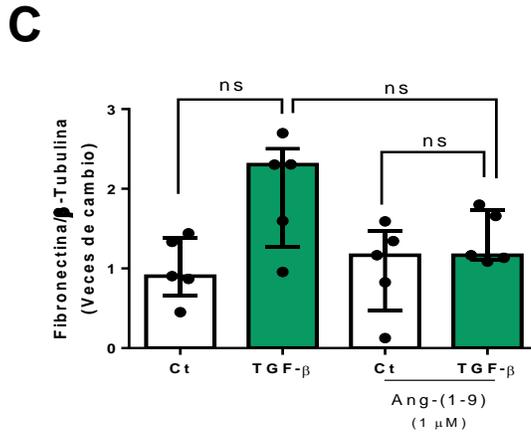
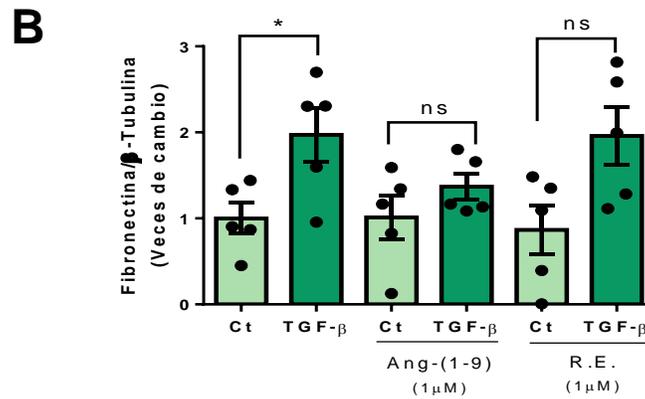
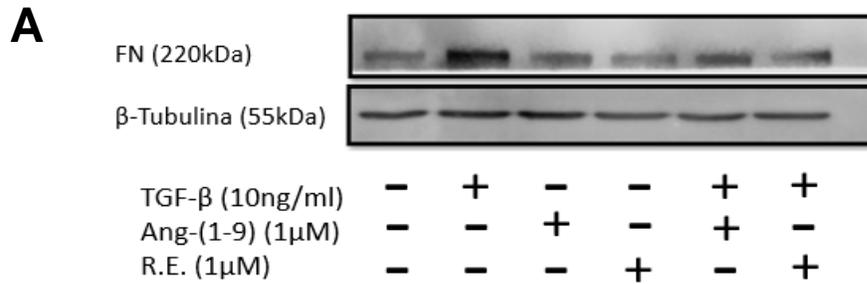


Figura 15. Efecto del co-tratamiento de TGF-β1 con Ang-(1-9) o R.E en los niveles de FN. FC de rata neonata se trataron con un co-tratamiento de Ang-(1-9) o R.E (1 μM) y TGF-β1 (10 ng/ml) por 72h. En A se muestra la imagen representativa del Western blot de FN con las condiciones señaladas. En B se presenta el grafico de los niveles proteicos de FN, expresado en veces de cambio con respecto al control según análisis paramétrico. En C y D según análisis no paramétrico. Los valores corresponden al promedio ± SEM o a mediana ± intercuartiles. n=5; *p<0,05 vs. control. ns= no significativo. El análisis estadístico empleado fue el test ANOVA de dos vías, post-test Tukey (B) y test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's (C, D).

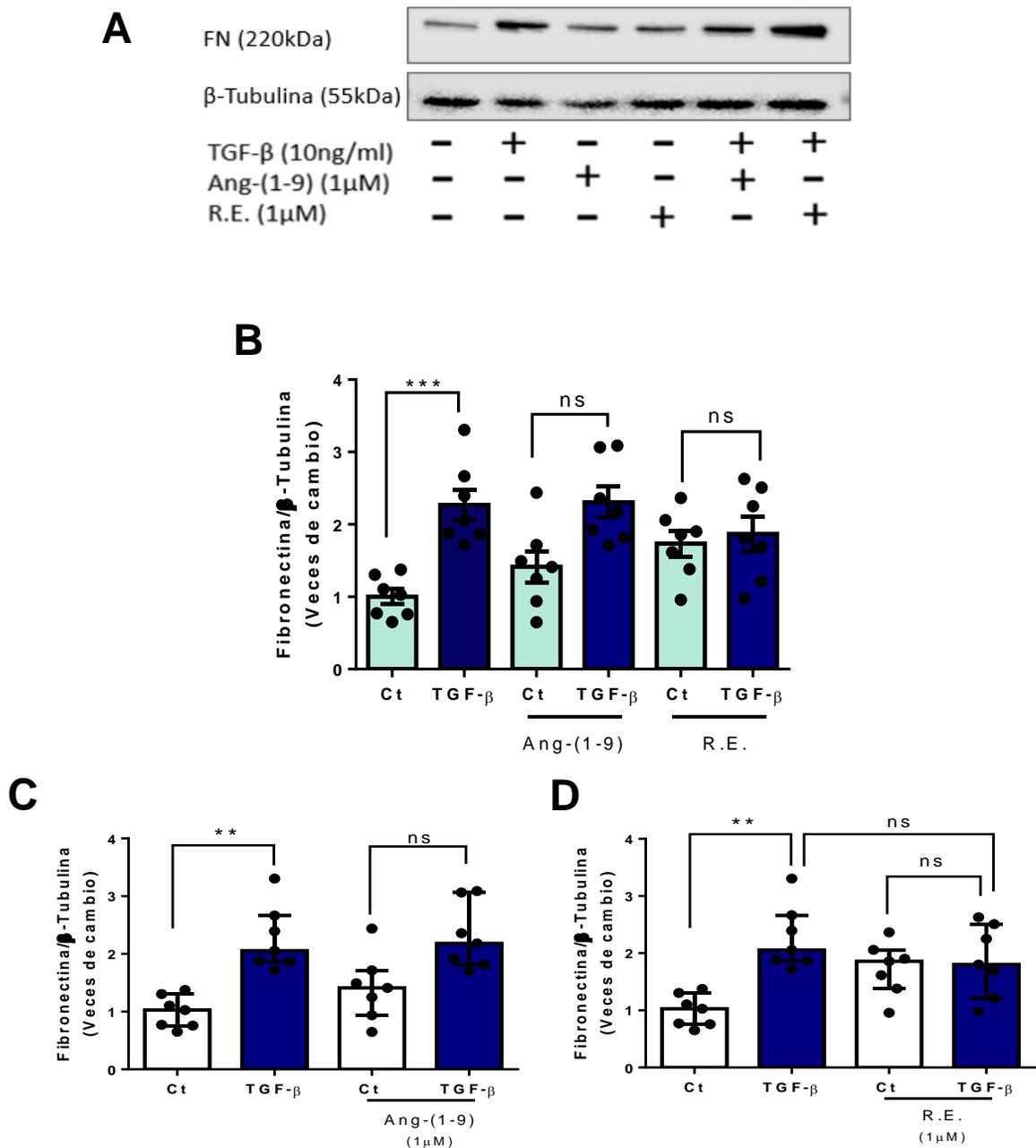


Figura 16. Efecto del pretratamiento de Ang-(1-9) o R.E antes del estímulo con TGF- β 1 en los niveles de FN. FC de rata neonata se trataron con un pretratamiento de 1h de Ang-(1-9) o R.E (1 μ M) y luego se adiciona TGF- β 1 (10 ng/ml) por 72h. En A se muestra la imagen representativa del Western blot de FN con las condiciones señaladas. En B se presenta el grafico de los niveles proteicos de FN, expresado en veces de cambio con respecto al control, según test paramétrico. En C y D según test no paramétrico. Los valores corresponden al promedio \pm SEM o a mediana \pm intercuartiles. n=7; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs. control. ns= no significativo. El análisis estadístico empleado fue el test ANOVA de 2 vías y post-test Tukey (B) y test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's (C, D).

A continuación, se estudió las mismas condiciones de trabajo, pero esta vez probando el pretratamiento de 1 h con estos dos péptidos para luego después adicionar TGF- β 1 por 72h, para observar si esto marcaba alguna diferencia con respecto a sus efectos en los FC. La **Figura 16B** muestra que también el estímulo fibrogénico TGF- β 1 aumentó los niveles proteicos de FN respecto al control de forma significativa en ambos análisis estadísticos. Sin embargo, a la similitud del co-tratamiento, el pretratamiento por 1 h con los péptidos antes de la adición con TGF- β 1 no cambió los niveles respecto al TGF- β 1 solo, por lo que ninguno de los péptidos, ya sea con o sin pretratamiento previno la fibrogénesis en FC, medida por la expresión proteica de FN. En el caso del análisis no paramétrico (**Figuras 16C y D**) arrojó un análisis similar, en donde TGF- μ aumenta los niveles de FN, pero el pretratamiento no logra cambiar los estos niveles, y entre las condiciones de pretratamiento y su respectivo control no hay diferencias significativas. En este caso, los controles de los péptidos sin TGF- β no son significativamente distintos a la condición control negativo, distinto a lo observado en los experimentos concentración-respuesta.

Frente a estos resultados se estudió que ocurría río debajo de la vía canónica activada por TGF- β y ver si Ang-(1-9) y R.E. podrían intervenir en esta vía, por lo que se procedió a medir los niveles proteicos de smad3 fosforilado y smad3 total a los 30 min, con una co-tratamiento de TGF- β 1 y Ang-(1-9) o R.E., cuyos resultados se muestran en la **Figura 17**. Según el gráfico de la **Figura 17B**, sí hay diferencias significativas de los niveles proteicos de Smad3 fosforilado

normalizado con smad3 total entre el control a los 30 min y la condición con TGF- β 1, mientras que al comparar el co-tratamiento de los péptidos junto con TGF- β 1 con respecto a la condición con TGF- β 1 solo, no se muestran diferencias significativas, lo que indicaría que Ang-(1-9) y R.E. al parecer no interfieren con la vía canónica de TGF- β 1, mientras que el tratamiento con los péptidos solos no genera cambios en la fosforilación de smad3 con respecto al control. En el caso del análisis no paramétrico (**Figuras 17C y D**), arrojó resultados similares en donde TGF- β aumenta los niveles de smad3 fosforilado de forma significativa, sin embargo, nuevamente ninguna de las condiciones con co-tratamiento cambió los niveles de smad3 fosforilado con respecto a TGF- β solo.

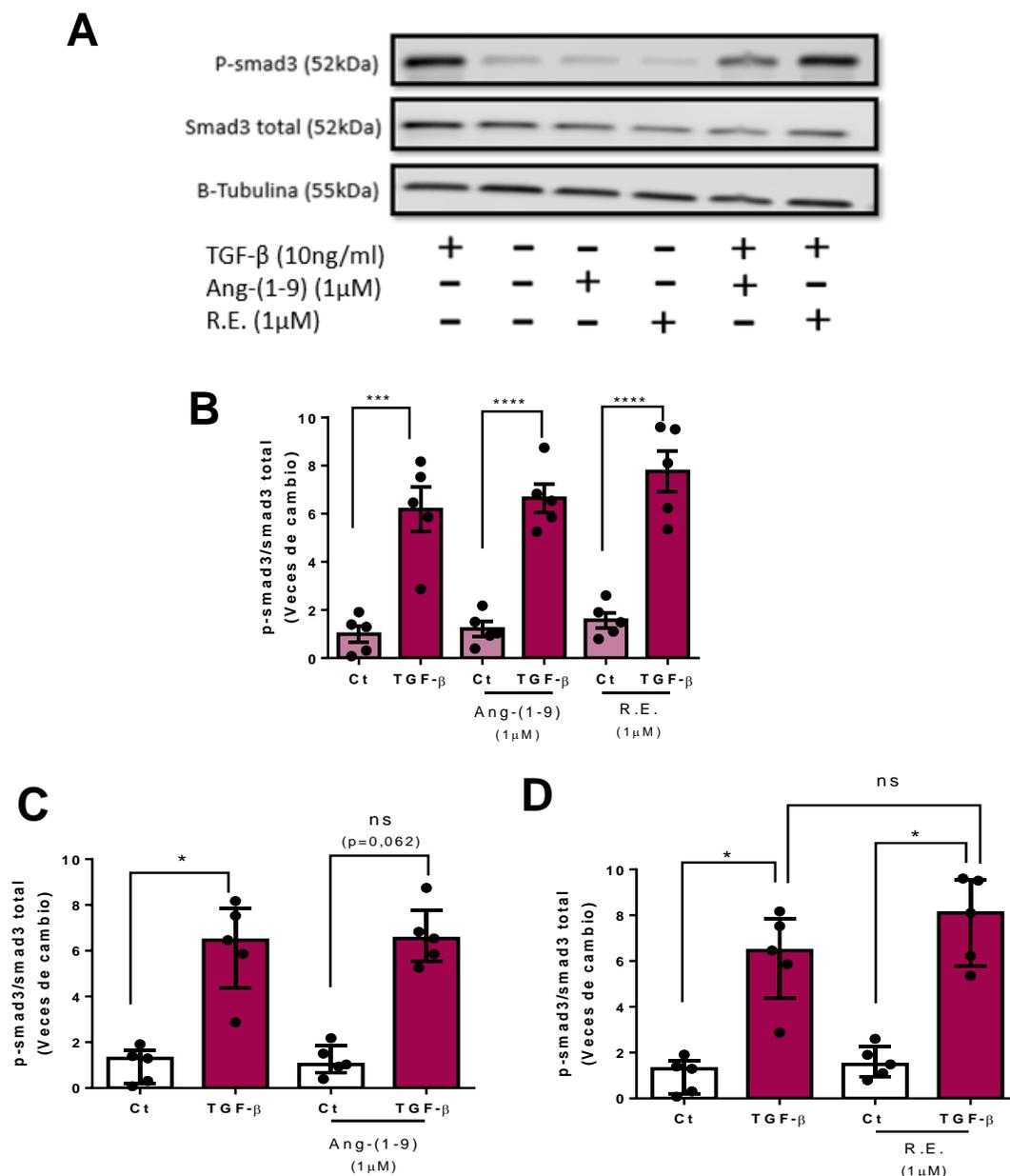


Figura 17. Efecto del co-tratamiento de Ang-(1-9) o R.E con TGF-β1 en la fosforilación de Smad3. FC de rata neonata fueron tratados con un co-tratamiento de Ang-(1-9) o R.E (1 μM) y TGF-β1 (10 ng/ml) por 30min. En A se muestra la imagen del Western blot representativo de Smad3 fosforilado normalizado con Smad3 total con las condiciones señaladas. En B se presenta el grafico de la fosforilación de Smad3 frente al co-tratamiento de los péptidos, junto con TGF-β1 por 72 h, expresado como veces de cambio con respecto al control, según test paramétrico. En C y D según test no paramétrico. Los valores corresponden al promedio ± SEM o a mediana ± intercuartiles. n=5; *p<0,05; **** p<0,0001 vs. control. ns= no significativo. El test estadístico usado fue ANOVA de 2 vías y post-test Tukey (B) y test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn's (C, D).

7. DISCUSIÓN

7.1. Activación de la vía canónica de TGF- β 1

Uno de los primeros experimentos fue dilucidar si TGF- β 1 estaba funcionando correctamente actuando como factor fibrogénico en FC y activando su vía de señalización. TGF- β 1 puede activar dos vías principales de señalización conocidas como la vía canónica y no canónica, las que involucran distintas proteínas en la cascada de activación (**Schiller et al., 2004; Biernacka et al., 2011**). La unión del TGF- β 1 activo al receptor de TGF- β 1 de tipo II conduce a la fosforilación y al reclutamiento del receptor de TGF- β 1 de tipo I en un complejo de receptor heteromérico (**Hinz, 2007-b**). La actividad serina/treonina quinasa del complejo activado de los receptores, en la vía canónica, fosforila a Smad2 y Smad3, los cuales se unen a Smad4 y se trasladan al núcleo para mejorar la transcripción de genes al cooperar con factores de transcripción de ADN (**Feng & Derynck, 2005; Massagué et al., 2005**). Además de la transcripción mediada por Smad, TGF- β 1 activa otras cascadas de señalización, incluidas las vías MAPK o vía no canónica (**Derynck & Zhang, 2003**). TGF- β 1 puede activar las vías de las quinasas ERK, JNK y p38 MAPK y algunas de estas vías regulan la activación de Smad, como se describió anteriormente, pero otras podrían inducir respuestas no relacionadas con la transcripción (**Derynck & Zhang, 2003**).

Por ende, para estudiar la activación de la cascada de señalización de TGF- β 1 se procedió a medir los niveles de Smad3 fosforilado (forma activa) a los 30 min ya que es tiempo suficiente para observar cambios en la fosforilación de esta

proteína (**Zi et al., 2012; Villalobos et al., 2019**). Como se observa en los resultados, los niveles proteicos de Smad3 fosforilado aumentan a los 30 min con el estímulo de TGF- β 1 con respecto al control negativo, lo que daría cuenta de una correcta activación de la vía canónica de este factor fibrogénico en el cultivo primario de FC. Como se dijo anteriormente, los receptores de tipo I activados median sus efectos a través de la fosforilación de las proteínas Smad, siendo Smad3 de especial importancia. Un estudio de **Bujak et al., (2007)** mostró hallazgos interesantes, en donde los corazones de animales *knockout* para Smad3 muestran una remodelación disminuida y menos disfunción diastólica y la ausencia de Smad3 previene la fibrosis en el miocardio no infartado (**Bujak et al., 2007**). Otro estudio *in vitro* reciente de **Dobaczewski et al., (2010-a)** mostró que los fibroblastos de ratón *knockout* para Smad3 son "multifuncionales", en el sentido de que demuestran una disminución de la proliferación, migración, diferenciación al fenotipo de miofibroblasto y expresión de α -SMA, no así el *knockout* de Smad2. Estos estudios indican que la activación de Smad3 es esencial para el proceso fibrótico y la medición de su fosforilación es importante para saber si el proceso fibrótico se activará con el estímulo de TGF- β 1.

7.2. Tiempos de exposición con TGF- β 1 en FC

Otro de los experimentos de estandarización fue encontrar un tiempo ideal de respuesta de TGF- β 1 en el cultivo primario de FC de rata neonata, ya que los tiempos de trabajo con este estímulo pro-fibrótico pueden variar desde 24 a 96 h

en distintos grupos de investigación midiendo los niveles proteicos de FN, COL-I y α -SMA (**Vivar et al., 2016; Khalil et al., 2017; Villalobos et al., 2019; Inostroza 2020**). Para saber el tiempo adecuado de respuesta se midió los niveles proteicos de FN a 48, 72 y 96 h con TGF- β 1. Todos los tiempos estudiados fueron suficientes para inducir el aumento de FN con el estímulo fibrogénico, sin embargo, se escogió el tiempo 72 h para trabajar, ya que presentó un cambio significativo de FN con respecto al control, no así 48h. **Vivar et al., (2016)** informan que existen cambios significativos de los niveles proteicos de COL-I y α -SMA a las 24, 48 y 72 h, en donde 72 h tiene una mayor significancia con respecto a las otras temporalidades. En la tesis de doctorado de **Inostroza (2020)** se observa que las temporalidades de 24, 48, 72 y 96 h también aumentan significativamente los niveles proteicos de α -SMA y FN, sin embargo, el COL-I solo aumenta desde las 48 h en adelante, por lo que 24 h no era una temporalidad ideal de trabajo. Por último hay un trabajo que estudia la fibrosis cardiaca a distintos tiempos *in vivo*, después de un infarto agudo de miocardio (**Fu et al., 2018**). En este trabajo, los autores indican que a los 3 días (72h) post infarto, recién se puede observar la presencia de fibroblastos activados en la zona de daño y los cuales se diferenciarán a miofibroblastos para generar la cicatrización. Al tercer día hubo una mayor migración de FC, mayor proliferación y presencia de fibroblastos α -SMA positivos, lo cual no ocurre en los primeros dos días (24 y 48 h). La proliferación de fibroblastos o miofibroblastos activados permanece alta durante otros 2 a 3 días dentro de la región del infarto para luego atenuarse.

Inesperadamente, la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos activados se extingue casi por completo 7 días después de la lesión del IM, aunque la remodelación dinámica del área de la cicatriz con aumento de la complejidad del colágeno continúa hasta la semana 2 (**Fu et al., 2018**). Por lo tanto, 72h es un tiempo ideal y suficiente para observar la respuesta biológica mediada por TGF- β 1 en este modelo.

7.3. Citotoxicidad de Ang-(1-9) y R.E.

Luego de ya escogido el tiempo de trabajo con TGF- β 1, se procedió a estudiar la citotoxicidad de Ang-(1-9) y R.E en los FC del cultivo primario de ratas neonatas, usando 2 técnicas experimentales. En este trabajo se usaron las técnicas de Azul de Tripán y LDH las cuales indican que no hay muerte celular significativa con ninguna de las concentraciones estudiadas de los péptidos. La idea de usar 2 técnicas experimentales de viabilidad es poder confirmar de mejor manera la citotoxicidad de los péptidos, ya que cada técnica tiene sus ventajas y desventajas. El ensayo con azul de tripán tiene desventajas sobre todo del operador, como por ejemplo errores de recuento (~10%). Los errores de recuento se han atribuido a la mala dispersión de las células, la pérdida de células durante la dispersión de las células, la dilución incorrecta de las células, el llenado inadecuado de la cámara y la presencia de burbujas de aire en la cámara (**Aslantürk, 2018**). Si bien el procedimiento de tinción es bastante simple, es difícil procesar un gran número de muestras al mismo tiempo, particularmente

cuando se requiere el momento exacto de los efectos citotóxicos progresivos (**Yip & Auersperg, 1972**). En cuanto al ensayo de LDH su principal limitación es que el suero y algunos otros compuestos tienen actividad LDH inherente (**Aslantürk, 2018**). Ahora, los ensayos de LDH tienen ventajas con respecto al azul de tripán, ya que son ensayos colorímetros por tanto son superiores a los métodos de exclusión de colorantes porque son fáciles de usar, seguros, tienen una alta reproducibilidad y confiabilidad y son rápidos de realizar, por lo que complementar una técnica de exclusión por colorante (azul de tripán) tiene que ser complementada con al menos una técnica colorimétrica (LDH en este caso) (**Aslantürk, 2018**). Hay un estudio que compara distintas técnicas para medir viabilidad celular, y como se podrían correlacionar en su respuesta frente a H₂O₂ en distintos tipos celulares, en donde los autores dan cuenta de que los resultados de LDH y azul de tripán se correlacionan entre sí bastante bien, y los hallazgos de este estudio indican que las herramientas para la prueba de citotoxicidad deben seleccionarse de manera diferente considerando la correlación entre las condiciones celulares y el principio del sistema de ensayo (ya sea por exclusión de tinción o colorimétrica) (**Kim et al., 2009**). Con respecto al R.E., existe literatura en donde han estudiado la citotoxicidad de otros R.E. de otras moléculas, por ejemplo, en el estudio de **Carriero et al. (2017)** crearon un péptido R.E. que es antagonista del receptor de urokinasa para detener la proliferación de células cancerosas (RI-3), y usando el ensayo de MTS se observó que este RI-3 no presenta citotoxicidad a 10 µM en ninguno de los

tiempos de exposición estudiados (24-96 h). En otro estudio, se creó un péptido R.E. que une al receptor de transferrina y así sirve como transportador de distintas cargas hacia la barrera hematoencefálica (**Prades et al., 2015**). Al evaluar la integridad de la barrera celular durante los ensayos se observó que la fuga paracelular fue mínima durante los experimentos, lo que indica la ausencia de fenestración en la barrera celular y la falta de citotoxicidad del péptido R.E.. En el estudio de **Kindrachuk et al., (2011)**, se estudiaron distintos isómeros de un péptido antimicrobiano (BMAP28), entre ellos el péptido normal (L BMAP28), el isómero D (D-BMAP28), y el péptido R.E. (RI-BMAP28). Con respecto a la toxicidad, la considerable actividad hemolítica de L-BMAP28 desde los 25 µg/ml se reduce aproximadamente a la mitad con el isómero D, en donde la hemólisis empieza a ocurrir a los 50 µg/ml y se elimina completamente con RI BMAP28. Además, mientras que D-BMAP28 mantiene el mismo perfil de citotoxicidad contra células epiteliales y monocitos que el péptido natural, RI BMAP28 es notablemente menos tóxico contra estos tipos de células. Toda esta evidencia indica que el uso de R.E. no genera efectos citotóxicos evidentes, y que el uso de Ang-(1-9) y R.E. es seguro en FC de rata neonata.

7.4. Ang-(1-9) y R.E. no previenen la fibrogénesis mediada por TGF-β1.

En los experimentos concentración-respuesta en FC sin TGF-β1 se observa que los efectos de Ang-(1-9) y R.E., a las distintas concentraciones estudiadas, en los niveles proteicos de COL-I y FN no tienen diferencias significativas con respecto

al estímulo con TGF- β 1 solo. Por otro lado, al hacer los mismos experimentos, pero pre-incubando por 1h los péptidos antes de adicionar TGF- β 1 e incubar por 72h, se observa que ninguno de los péptidos a las distintas concentraciones estudiadas previene el aumento de COL-I y FN inducido por TGF- β 1. Es más, en los geles de contracción de colágeno observamos el mismo fenómeno, en donde ninguna de las concentraciones de péptidos logra prevenir la contracción de los geles inducida por TGF- β . La literatura indica que Ang-(1-9) si tiene efectos anti-fibróticos tanto *in vivo* como *in vitro*, sin embargo ninguno de los estudios usa como estímulo pro-fibrótico a TGF- β 1 (**Flores-Munoz et al., 2012; Ocaranza et al., 2014**). En el trabajo de **Flores-Muñoz et al. (2012)** se usó un modelo de ratas espontáneamente hipertensas propensas a sufrir un accidente cerebrovascular, en las cuales por medio de minibombas osmóticas de les administró Ang-(1-9), lo que redujo la fibrosis cardíaca en un 50% mediante la modulación de la expresión de COL-I, revertida por la coinfusión de PD123,319, el antagonista de AT2R. En el mismo trabajo se observó que en Ang-(1-9) inhibió la proliferación y la expresión del mRNA de COL-I en FC neonatos, usando como estímulo fibrogénico el aumento de FBS al 5% en el medio por 48h, lo cual también fue revertido por PD123,319. Por otro lado, en el trabajo de **Ocaranza et al. (2014)**, también indican que Ang-(1-9) tiene efectos anti-fibrogénicos en FC de rata adulta, al medir los niveles proteicos de COL-I y la proliferación, usando como estímulo fibrogénico Ang II. En el mismo estudio de usó un modelo *in vivo* de ratas Goldblatt y otro modelo de hipertensión inducida por Ang II, en donde,

además de la reducción de la hipertrofia cardíaca, Ang-(1-9) disminuyó la fibrosis cardíaca, la expresión de TGF- β 1 vascular inducida por la hipertensión y la regulación positiva del COL-I en los tejidos cardíacos y vasculares en ambos modelos. Estos efectos fueron bloqueados por la inhibición farmacológica del AT2R. Ang-(1-9) también se ha visto que disminuye la fibrosis en un modelo de hipertensión pulmonar inducida por monocrotalina (MCT), en donde Ang-(1-9) también atenuó el daño endotelial y la hipertrofia medial de las arteriolas pulmonares, así como la fibrosis pulmonar inducida por MCT, siendo inhibidos por PD123,319 (**Cha et al., 2018**). Por lo tanto, los resultados obtenidos en los ensayos concentración-respuesta contradicen todos estos efectos anti-fibróticos reportados en la literatura de Ang-(1-9). Por otra parte, hay dos concentraciones que debieron haber demostrado algún tipo de respuesta, las cuales son 1 y 10 μ M. La primera concentración de Ang-(1-9) (1 μ M) fue probada *in vitro* en FC demostrando efectos anti-fibrogénicos y en cardiomiocitos demostrando efecto protectores en Isquemia/Reperusión y efectos anti-hipertróficos (**Flores-Munoz et al., 2012; Mendoza-Torres et al., 2018; Ocaranza et al., 2010, 2014**). La segunda concentración reportada es de 10 μ M tanto para Ang-(1-9) como para su R.E. y también se le atribuyen efectos anti-hipertróficos en cardiomiocitos (**Núñez, 2018**). No obstante, en los ensayos de concentración-respuesta el pretratamiento de estos péptidos con TGF- β no mostraron diferencias significativas con respecto al estímulo fibrogénico e incluso en algunos casos los péptidos por sí solos pueden aumentar los niveles de FN, COL-I y la contracción

de los geles de colágeno evidenciando efectos similares a los de TGF- β 1, mientras que el tratamiento de los péptidos con TGF- β 1 no tienen efectos potenciadores ni sinérgicos. Algunas hipótesis de por qué ocurre esto serán discutidas en el siguiente párrafo.

7.5. Ang-(1-9) y R.E. tienen efectos fibrogénicos en FC.

Los experimentos del objetivo 2 muestran algo similar que los ensayos concentración-respuesta, en donde usando una concentración de literatura de Ang-(1-9) en FC (1 μ M) (**Flores-Munoz et al., 2012; Ocaranza et al., 2014**), no se logró prevenir el aumento de FN inducido por TGF- β 1. Por otro lado, se usaron dos tipos de tratamiento: un co-tratamiento de TGF- β 1 y los péptidos, y un pretratamiento de 1h tal como se hicieron los ensayos concentración-respuesta anteriores, para observar si esto hacía una diferencia con respecto a la respuesta, pero no fue así. En la literatura se describen distintos tiempos de pretratamiento en distintas células. Por ejemplo, en el estudio de **Flores-Munoz et al., (2012)** se usaron 30min de pre-tratamiento con Ang-(1-9) antes del estímulo fibrogénico (aumento de FBS) en FC de rata neonata, y se observó que la expresión de mRNA de COL-I y la proliferación disminuían. Por otro lado, **Ocaranza et al., (2014)** usaron 1h de pre-tratamiento de Ang-(1-9) antes del estímulo fibrogénico (Ang II) y a las 48h disminuyen los niveles proteicos de COL-I y la proliferación en los FC de rata adulta, por lo que al parecer no hay diferencias entre utilizar 1h y o menos tiempo de pre-tratamiento en FC, ya que se producen los mismos

efectos anti-fibrogénicos. Es más, en cardiomiocitos de rata también se usó 1h de pre-tratamiento para observar efectos anti-hipertróficos de estos péptidos **(Nuñez, 2018; Ocaranza et al., 2010)**. Lo importante es que en literatura no existen ensayos que usen estos péptidos junto con TGF- β 1 como estímulo fibrogénico en FC, por tanto esto podría ser determinante al ver esta respuesta contraria a lo que está publicado. A pesar de que no existe tampoco literatura de las vías de transducción que activa AT2R en FC, si se especula que podría ejercer el mismo mecanismo anti-fibrótico que el MasR al ser activado por su ligando Ang-(1-7), o sea, activar fosfatasa (MPK1, PP2A y SHP1), que desfosforilen a distintas MAPK tales como JNK, p38 y ERK1/2 y otras proteínas como AKT, lo que llevaría a una disminución en la fosforilación de las proteínas Smad, y por ende la expresión de FN, COL-I y TGF- β 1 estaría inhibida **(Clarke et al., 2013; Westermeier et al., 2015)**. No obstante, lo que sí se conoce son los mecanismos de transducción de AT2R en otros tipos celulares. Por ejemplo, en cardiomiocitos de rata se ha visto de Ang-(1-9) protege de la muerte celular en un modelo de isquemia/reperfusión, a través de la activación de AKT (aumenta la fosforilación) y ambos eventos son dependientes de AT2R **(Mendoza-Torres et al., 2018)**. En otro estudio en VSMC, Ang-(1-9) previene el remodelado vascular (disminuye la dediferenciación), a través de la disminución de la fosforilación de AKT y de la activación de FoxO1, lo cual también depende del AT2R **(Norambuena-Soto et al., 2020)**. Todo estos antecedentes muestran que AT2R podría ejercer efectos contrarios en la fosforilación de ciertas proteínas,

dependiendo de el tipo celular en que se esté estudiando, por lo que puede ser que en este modelo en específico AT2R esté activando vías como AKT para generar estos efectos pro-fibróticos, contrarios a lo que dice la literatura.

Ahondando más en esta hipótesis, es sabido que TGF- β 1 activa a través de su vía no canónica, las mismas MAPK que Ang II, por lo que se esperaría que AT2R al activarse por Ang-(1-9), debiera impedir la fosforilación de estas MAPK a través de la activación de las fosfatasas anteriormente mencionadas, si embargo, al ver los efectos finales, esto al parecer no ocurrió así. En los resultados del estudio de la fosforilación de Smad3 y la influencia de los péptidos en este fenómeno se observó que estos péptidos tampoco disminuyen o aumentan la activación de esta proteína, por lo que en este modelo de estudio (FC de rata neonata), frente a este estímulo pro-fibrogénico, no estarían interviniendo en la vía canónica de activación de TGF- β , por lo que podría ser que estos péptidos generen sus efectos pro-fibrogénicos por otras vías, por ejemplo, activando la vía no canónica de TGF- β 1, no obstante, habría que estudiar la fosforilación de las MAPK de la vía no canónica para corroborar esta hipótesis.

Adicionalmente, hay estudios que indican que no siempre AT2R antagoniza las acciones de AT1R como comunmente se espera. Uno de ellos, indica que AT2R no antagoniza los efectos patológicos de AT1R en cardiomiocitos (**D'Amore et al., 2005**). En este estudio, se observó que al aumentar la expresión del AT2R por adenovirus en cardiomiocitos que solo expresaban AT1R, no se inhibió la hipertrofia de cardiomiocitos mediada por Ang II. En cambio, la hipertrofia basal

y mediada por Ang II se incrementó con la expresión amplificada del receptor AT2R. Aún más, la expresión solo de AT2R resultó en hipertrofia; sorprendentemente, esto no se vio afectado por la estimulación de Ang II o por el antagonista PD123,319 e incluso no antagonizó la activación de MAPK mediada por el AT1R. Por tanto, el AT2R promueve la hipertrofia constitutiva de cardiomiocitos independiente de ligando y no antagoniza directamente al AT1R en este contexto. Hay otro estudio que indica que la sobreexpresión de AT2R en FC porcinos no es capaz de inhibir la activación de ERK1/2 inducida por Ang II e incluso inhibe la actividad de fosfatasa como PTP1B, por lo que AT2R no contrarresta los efectos de AT1R en este modelo (**Warnecke et al., 2001**). Incluso en la investigación de **Mifune et al., (2000)** corroboran en VSMC de rata, la activación de AT2R no inhibe la activación de ERK1/2 inducida por Ang II e induce una disminución de la actividad tirosina fosfatasa en general en las células. En el mismo estudio también se evidencia que la activación de AT2R induce un aumento de la síntesis de colágeno en estas células lo cual es concentración y tiempo dependiente del agonista de AT2R, GP42212 y esto se revierte con el antagonista PD123,319, pero no así con el antagonista de AT1R, losartan, lo que daría posibilidad a que en FC de rata neonata pudiera ocurrir lo mismo y que la activación de AT2R por Ang-(1-9) no antagonice los efectos del TGF- β 1, si no que se le asemejen.

Otra alternativa es que estos efectos sean independientes de AT2R y para corroborar esta posibilidad se debería inhibir la activación de este receptor,

usando dos aproximaciones experimentales: usar un antagonista como el PD123,319 e inhibir la expresión génica de este receptor a través de un siRNA, experimentos que no se pudieron realizar. No obstante, existe evidencia de que hay posibilidad de que Ang-(1-9) y R.E. se esté uniendo y activando directamente a AT1R, debido a que según la literatura Ang-(1-9) puede unirse tanto a AT1R como a AT2R y además tiene una afinidad aproximadamente 100 veces menor para AT2R comparado con Ang II (**Flores-Muñoz et al., 2011**). Aunque actualmente no existen estudios que muestren que Ang-(1-9) genera efectos mediados por AT1R, ya que la mayoría se ha visto que dependen del AT2R, sí se sabe que hay unión tanto del péptido Ang-(1-9) como de su R.E. con AT2R y AT1R (**Flores, 2021**). En la tesis de doctorado de **Flores (2021)**, a través de modelamientos computacionales entre los péptidos y estos receptores se ha mostrado que existen contactos polares de ambos péptidos con el AT2R, y que el R.E dentro del bolsillo de este receptor de cicla a través de los extremos terminales. Recordando la tesis de pregrado de **Núñez (2018)**, los efectos anti-hipertróficos tanto de Ang-(1-9) como su R.E. dependen de AT2R, por lo que este ciclo que se forma de R.E. podría ser la forma en que active a este receptor. Dicho esto, en el estudio de **Flores (2021)**, también se descubre que R.E. se cicla dentro del bolsillo de AT1R, por lo que posiblemente también podría activarlo. Es más, la interacción de los residuos aminoacídicos importantes de Ang-(1-9) para la activación de AT2R (primeros 5 residuos), también interactúan con los residuos importantes para activación de AT1R (K199 y R167) y lo mismo ocurre con el

R.E.. A pesar de que no se ha estudiado aún si Ang-(1-9) o R.E. generan efectos biológicos a través de AT1R, podría ser una posible explicación de que ninguno de los péptidos pudo prevenir la fibrogénesis en FC, y que además presenten efectos fibrogénicos como fue evidenciado en este trabajo, pero esto está por investigarse. Complementando esta posibilidad, es sabido que TGF- β activan vías como AKT, y MAPK como ERK1/2, JNK y p38 como se dijo anteriormente **(Derynck & Zhang, 2003)**, y por otro lado Ang II aumenta la fosforilación de estas MAPK a través del AT1R, incluso puede producir la activación de AKT e inducir la fosforilación de Smad1/2 para así ejercer sus efectos hipertróficos, hipertensivos y pro-fibróticos **(Clarke et al., 2013; Hussain & Awan, 2018; Kittana, 2018; Ocaranza & Jalil, 2012; Ocaranza et al., 2020; Westermeier et al., 2015)**. Teniendo esto en cuenta, ambas vías son similares y comparten efectos pro-fibróticos finales en FC, por lo que esto podría explicar que los niveles de FN y la contracción de los geles no cambian entre la condición control solo con péptido en comparación con el tratamiento de péptido y TGF- β juntos, ya que ambos podrían activar la misma vía de señalización y no generar efectos potenciadores o sinérgicos, sino similares.

Este efecto no se vio en ninguno de los estudios previos con Ang-(1-9) en FC **(Flores-Munoz et al., 2012; Ocaranza et al., 2014)**, ni en el estudio previo del R.E. en cardiomiocitos de rata neonata **(Núñez, 2018)**, en donde los controles respectivos de los péptidos no son significativamente distintos al control negativo, pero sí al control positivo patológico en cada caso, por lo que estos resultados

son algo nuevo. Por tanto, en estas condiciones experimentales los péptidos por sí solos tendrían efectos similares al de TGF- β 1 en los niveles proteicos de COL-I, FN y la contracción de los geles de colágeno, sin embargo, al combinar el Ang-(1-9) o R.E. con TGF- β 1 en ninguno de los experimentos se vio ni efectos sinérgicos, ni potenciadores ni aditivos (**Roell et al., 2017**) en las respuestas fibrogénicas estudiadas. Por el contrario, al pretratar con los péptidos y luego adicionar TGF- β 1, el efecto es el mismo a que si se agregara uno de los dos por sí solo (péptido o TGF- β 1), por lo que al parecer los péptidos no regulan ni positiva ni negativamente la respuesta biológica de TGF- β 1, al estar juntos. Esto nuevamente contradice la literatura ya mencionada en donde se conoce que Ang-(1-9) ejerce efectos anti-fibróticos tanto *in vivo* como *in vitro* (**Flores-Munoz et al., 2012; Ocaranza et al., 2014**). Otro estudio indica que Ang-(1-9) podría tener efectos independientes de AT2R (**Gonzalez et al., 2018**). En dicho estudio usando un modelo de hipertensión inducido por DOCA-sal, se observó que Ang-(1-9) disminuyó la hipertensión y aumentó la vasodilatación y estas acciones fueron inhibidas parcialmente por PD123,319 (**Gonzalez et al., 2018**). Además, disminuyó la diuresis, la fibrosis y la inflamación, pero estos efectos no fueron inhibidos por el antagonista de AT2R, por lo que en este caso existen mecanismos independientes AT2R, que aún no se conocen y que tal vez los resultados observados en los experimentos no sean mediados por este receptor.

Otras explicaciones basadas en literatura podrían ser una posible heterodimerización de AT2R con AT1R. La dimerización del AT1R con AT2R ha sido estudiada en varios modelos, entre ellos, el sistema nervioso central de ratas en donde podemos encontrar heterodímeros AT1R/AT2R y el nivel de expresión del heterodímero aumenta en el modelo patológico de enfermedad de Parkinson en ratas (**Rivas-Santisteban et al., 2020**). Otro estudio indica que en células LLC-PK1 (células de riñón de cerdo), Ang II aumenta la heterodimerización de AT1R y AT2R en un 140% (**Ferrão et al., 2012**), mientras que en células HepG2 y VSMC los AT1R forman principalmente homodímeros, en lugar de heterodímeros con el AT2R, y el AT2R también forma principalmente homodímeros lo cual no cambia frente al tratamiento con Ang II (**Miura et al., 2008**). En FC no ha sido estudiada la heterodimerización, pero en fibroblastos fetales de rata se ha observado que AT2R forma heterodímeros con AT1R en la superficie celular, sin embargo la disminución en el grado de heterodimerización del receptor AT1R/AT2R estuvo acompañada por un aumento de la activación de Gs estimulada por el receptor AT1R, por lo que la heterodimerización del receptor AT1R/AT2R inhibe la activación de proteínas G estimulada por el AT1R en fibroblastos fetales por tanto, en este caso, la acción del AT2R se asemeja al efecto de un antagonista específico del AT1R (**AbdAlla et al., 2001**). Por ende, la heterodimerización con AT1R depende del tipo celular, pero si es que en FC de rata neonata pasa lo mismo que en el estudio de fibroblastos fetales, la estimulación con Ang-(1-9) debió haber contrarrestado los efectos anti-

fibrogénicos, no obstante, esto no ocurrió, por lo que sería de gran ayuda estudiar si esta heterodimerización ocurre o no, y si este fenómeno inhibe o activa al receptor AT1R en el modelo de FC de rata neonata.

Otra variable que considerar es la expresión de AT1R y AT2R en FC y si esto pudiera afectar la acción de Ang-(1-9). Se ha demostrado que en FC y miofibroblastos de varias especies se expresa AT1R, pero no AT2R (**Crabos et al., 1994; Hafizi et al., 1998; Regitz-Zagrosek et al., 1998; Staufenberger et al., 2001; Tsutsumi et al., 1998**). Sin embargo, estudios tanto en humanos (**Tsutsumi et al., 1998**) como en hámsteres (**Ohkubo et al., 1997**) se ha evidenciado que AT2R aumenta en FC condiciones patológicas. En muestras de corazón de pacientes adultos sanos, el porcentaje de AT1R y AT2R es de 59% and 41%, respectivamente, sin embargo en muestras de pacientes con alguna enfermedad cardiaca (Infarto del miocardio agudo o tardío y cardiomiopatía dilatada) aumenta la expresión de mRNA y proteína de AT2R (**Tsutsumi et al., 1998**). Por el contrario, la expresión de mRNA y proteína de AT1R disminuye en infarto de miocardio tardío y cardiomiopatía dilatada, mientras que en el infarto de miocardio agudo aumenta y los FC presentes de todas las muestras estudiadas son los que mayor expresión de AT2R poseen. También se han visto diferencias de expresión de estos receptores entre FC de embriones de 19 días (E19) y de neonatos de 1 día de rata. El número de AT2R en fibroblastos E19 es mayor que neonatos (de 305 y 41 fmol/mg de proteína respectivamente) mientras que los niveles de AT1R no cambian, pero siguen siendo más expresado que

AT2R en ambos casos (**Matsubara et al., 1994**). En conclusión, el cultivo primario de FC de ratas neonatas tiene una mayor cantidad de AT1R con respecto a AT2R, al contrario de lo que ocurre en adultos en donde la proporción es más o menos parecida, lo que podría también explicar los efectos fibrogénicos en este cultivo primario de ratas neonatas específicamente, al haber una menor presencia de AT2R y mayor de AT1R. No existen estudios que hayan investigado si en condiciones patológicas en FC de ratas neonatas cambia la proporción de AT1R/AT2R como ocurre en adultos, por lo que esto debería ser estudiado en un futuro para estandarizar de mejor manera este modelo de estudio.

7.6. Efectos funcionales de Ang-(1-9) y R.E.: Geles de contracción.

Los resultados de los geles de contracción se muestra que nuevamente ninguno de los péptidos tiene efectos preventivos en la contracción del gel mediada por TGF- β 1, ni a 0,01 o 10 μ M, lo que concuerda con los resultados de los experimentos concentración-respuesta, y lo que indica que no hay efectos anti-fibrogénicos de estos péptidos a nivel funcional y al contrario, R.E. muestra efectos fibrogénicos por sí solo a 0,01 y 10 μ M según este ensayo, al aumentar la contracción del gel de forma similar a TGF- β .

En la literatura se muestra que TGF- β aumenta de manera dependiente de la concentración, la contracción del gel de colágeno mediada por fibroblastos cardíacos y también aumenta los niveles proteicos de α -SMA (**Lijnen, 2003**). Debido a que la actividad contráctil se correlaciona con la diferenciación, la

influencia de TGF- β 1 sobre la contracción del gel de colágeno inducida por FC depende de la diferenciación a miofibroblastos, los cuales tienen mayor actividad contráctil. Es más, se ha visto que TGF- β 1 aumenta la contracción del gel en fibroblastos de pulmón fetal humano tratadas con el siRNA de Smad2, pero no tiene ningún efecto en células tratadas con siRNA de Smad3, por tanto, Smad3 es otro factor importante río abajo que media la contracción inducida por TGF- β 1 (**Kobayashi *et al.*, 2006**). Otro estudio indica que una sobreexpresión de Smad3, aumenta la contracción del gel de colágeno en fibroblastos dérmicos (**Sumiyoshi *et al.*, 2003**). Además, los inhibidores de las vías ERK1/2 y p38 (vía no canónica) no afectan la contracción del gel de colágeno mediada por TGF- β 1 por los fibroblastos dérmicos, por lo que Smad3 es esencial para que este fenómeno ocurra y no está mediado por la vía no canónica. Otros estudios indican que hay otros actores participando en la contracción del gel esenciales para que esto ocurra, entre ellos Integrinas y FN (**Asaga *et al.*, 1991**; **Burgess *et al.*, 1994**). En fibroblastos dérmicos, se demuestra que la FN soluble no es necesaria para la contracción del gel, pero sí la FN celular (no soluble) por lo que la presencia de FN celular es importante para la contracción del gel (**Asaga *et al.*, 1991**). Esto se correlaciona con los resultados del objetivo 1, ya que los péptidos aumentan los niveles proteicos a nivel celular de FN por sí solos, por tanto, era esperable que la contracción con el tratamiento de R.E. no cambiara con respecto al control fibrogénico. Actualmente no existen trabajos que usen a Ang-(1-9) o R.E. en el estudio de la contracción de geles de colágeno con FC, sin embargo existen en

la literatura el uso de otros péptidos de la vía alterativa RAS, como Ang-(1-7) en el estudio de la contracción de geles de colágeno en este caso con células del músculo liso de las vías respiratorias humanas, en donde Ang II provoca la contracción y este efecto fue revertido por Ang- (1-7) **(Li et al., 2012)**. Además, irbesartán y A779, que son inhibidores de AT1R y MasR, respectivamente, atenuaron el efecto de Ang II y Ang- (1-7). En otra investigación que también estudió la importancia del sistema RAS en la contracción de geles de colágeno, se usaron FC de rata adulta estimulados con TGF- β 1 para inducir la diferenciación a miofibroblastos, y posteriormente se estimuló con Ang II, y distintos inhibidores de aminopeptidasas, las cuales son encargadas de procesar los péptidos de la vía RAS. Uno de los inhibidores era general para aminopeptidasas y otros específicamente para las aminopeptidasas B y N para así inhibir la formación de Ang II, III y IV los cuales anteriormente se había descrito que aumentan la contracción de los geles de colágeno en FC **(Lijnen et al., 2002)**. Tanto las aminopeptidasas A como N están implicadas en la contracción del gel de colágeno estimulada por Ang II en FC control y tratados con TGF- β 1. La literatura indica que la contracción de los geles debería ser revertida por la acción de Ang-(1-7) o la inhibición de aminopeptidasas que generan péptidos pro-fibróticos como Ang II, por lo que se esperaba que Ang-(1-9) al tener los mismos efectos anti-fibróticos de Ang-(1-7) según literatura, prevenga la contracción del gel inducida por TGF- β 1, lo cual no ocurrió así. Estos resultados se correlacionan, entonces, con lo observado en los ensayos

concentración-respuesta y el resto de los experimentos del objetivo 2, por lo que este ensayo de geles de contracción corrobora aún más que Ang-(1-9) y R.E. no previenen la fibrogénesis mediada por TGF- β 1 en FC de rata neonata y además tienen efectos fibrogénicos similares a TGF- β 1 en este modelo.

7.7. Limitaciones.

Las mayores limitantes de este trabajo fue no poder estudiar si los efectos que se vieron con los péptidos dependían o no de AT2R, inhibiendo tanto genética como farmacológicamente a este receptor u otros como AT1R, por ejemplo, para así poder dilucidar si AT1R fue responsable de estos efectos. Otra limitante fue que en este trabajo solo se usó cultivo primario de rata neonata, sin embargo, un mejor modelo hubiera sido estudiar esto en cultivo primario de rata adulta para emular de mejor manera las condiciones fisiopatológicas de las células en un estado más avanzado de edad, ya que la mayoría de las ECV ocurren en población adulta. También hubiera sido interesante estudiar los niveles proteicos de α -SMA frente a estos péptidos y observar si estos aumentaban sus niveles, lo cual hubiera explicado el aumento de la contracción de los geles por uno de estos péptidos que fue R.E. Por último, también pudo haber sido útil medir el colágeno secretado soluble desde las células hacia el medio de cultivo, lo cual hubiera complementado los resultados ya descritos en la fibrogénesis cardiaca y así poder observar si es que se producen diferencias entre la formación del COL-I celular medido por Western blot y el COL-I soluble excretado al medio.

8. CONCLUSIONES

En conclusión, TGF- β 1 ejerce una respuesta más robusta a las 72 h en FC de rata neonata, comparado con otros tiempos de estudio de literatura. Además, ninguno de los péptidos (Ang-(1-9) o R.E.) tienen efectos citotóxicos en ninguna de las concentraciones estudiadas en este mismo modelo, por lo que son seguros de usar. A estas mismas concentraciones no se observaron efectos preventivos de la fibrogénesis mediada por TGF- β 1, ya sea en el estudio de la expresión proteica de COL-I o de FN y, por el contrario, tienen efecto fibrogénicos similares a TGF- β 1 evidenciado en el aumento de los niveles de FN, COL-I y la contracción de los geles de colágeno. Es más, la concentración usada en literatura (1 μ M) de Ang-(1-9) en FC tampoco logra prevenir el aumento de FN mediado por TGF- β 1 con o sin pretratamiento de los péptidos y adicionalmente, los péptidos por sí solos no cambian la fosforilación de Smad3 comparado con el control por lo que podrían estar activando otras vías distintas a la vía Smad2/3 para ejercer sus efectos fibrogénicos. Por ende, se concluye que **Ang-(1-9) y R.E no previenen la fibrogénesis mediada por TGF- β 1 y ambos péptidos presentan efectos fibrogénicos similares al de TGF- β 1 en este modelo.**

9. REFERENCIAS

- AbdAlla, S., Lothar, H., Abdel-tawab, A. M., & Quitterer, U. (2001). The Angiotensin II AT2 Receptor Is an AT1 Receptor Antagonist. *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), 39721–39726.
- Akishita, M., Horiuchi, M., Yamada, H., Zhang, L., Shirakami, G., Tamura, K., Ouchi, Y., & Dzau, V. J. (2000). Inflammation influences vascular remodeling through AT2 receptor expression and signaling. *Physiological Genomics*, 2000(2), 13–20.
- Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGF β activation. *Journal of Cell Science*, 116(2), 217–224.
- Arslan, F., Smeets, M. B., Riem Vis, P. W., Karper, J. C., Quax, P. H., Bongartz, L. G., Peters, J. H., Hoefer, I. E., Doevendans, P. A., Pasterkamp, G., & De Kleijn, D. P. (2011). Lack of fibronectin-EDA promotes survival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction. *Circulation Research*, 108(5), 582–592.
- Asaga, H., Kikuchi, S., & Yoshizato, K. (1991). Collagen gel contraction by fibroblasts requires cellular fibronectin but not plasma fibronectin. *Experimental Cell Research*, 193(1), 167–174.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*, 1–18.
- Biernacka, A., Dobaczewski, M., & Frangogiannis, N. G. (2011). TGF- β signaling in fibrosis. *Growth factors*, 29(5), 196–202.
- Booz, G. W., & Baker, K. M. (1996). Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II- induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*, 28(4), 635–640.
- Bopp, S. K., & Lettieri, T. (2008). Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology*, 8, 1–11.
- Boustany, C. M., Bharadwaj, K., Daugherty, A., Brown, D. R., Randall, D. C., & Cassis, L. A. (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 287(4 56-4).
- Blaser, M. C., & Simmons, C. A. (2015). Mechanical and matrix regulation of valvular fibrosis. In *Cardiac Fibrosis and Heart Failure: Cause or Effect?* (pp. 23-53). Springer, Cham.
- Bruneval, P., Hinglais, N., Alhenc-Gelas, F., Tricottet, V., Corvol, P., Menard, J., Camilleri, J. P., & Bariety, J. (1986). Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney - Ultrastructural immunohistochemical localization. *Histochemistry*, 85(1), 73–80.
- Bujak, M., Ren, G., Kweon, H. J., Dobaczewski, M., Reddy, A., Taffet, G., Wang, X. F., & Frangogiannis, N. G. (2007). Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation*, 116(19), 2127–2138.

- Burgess, M. L., Carver, W. E., Terracio, L., Wilson, S. P., Wilson, M. A., & Borg, T. K. (1994). Integrin-mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblasts: Effects of angiotensin II. *Circulation Research*, 74(2), 291–298.
- Camelliti, P., Borg, T. K., & Kohl, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research*, 65(1), 40–51.
- Campbell, D. J., Kladis, A., & Duncan, A. M. (1993). Nephrectomy, converting enzyme inhibition, and angiotensin peptides. *Hypertension*, 22(4), 513–522.
- Cardoso, M. H., Cândido, E. S., Oshiro, K. G. N., 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*, November, 131–155.
- Carey, R. M. (2013). Newly discovered components and actions of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, 62(5), 818–822.
- Carriero, M. V., Bifulco, K., Ingangi, V., Costantini, S., Botti, G., Ragone, C., Minopoli, M., Motti, M. L., Rea, D., Scognamiglio, G., Arra, C., Ciliberto, G., & Pessi, A. (2017). Retro-inverso Urokinase Receptor Antagonists for the Treatment of Metastatic Sarcomas. *Scientific Reports*, 7(1), 1–17.
- Catalán, M., Smolic, C., Contreras, A., Ayala, P., Olmedo, I., Copaja, M., Boza, P., Vivar, R., Avalos, Y., Lavandero, S., Velarde, V., & Díaz-Araya, G. (2012). Differential regulation of collagen secretion by kinin receptors in cardiac fibroblast and myofibroblast. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 261(3), 300–308.
- Cha, S. A., Park, B. M., & Kim, S. H. (2018). Angiotensin-(1-9) ameliorates pulmonary arterial hypertension via angiotensin type II receptor. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 22(4), 447–456.
- Chen, H., Chomyn, A., & Chan, D. C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(28), 26185–26192.
- Chen, H., McCaffery, J. M., & Chan, D. C. (2007). Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell*, 130(3), 548–562.
- Chen, W., & Frangogiannis, N. G. (2013). Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(4), 945-953.
- Clarke, C., Flores-Muñoz, 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 Cardiology*, 9(1), 23–38.
- Crabos, M., Roth, M., Hahn, A. W. A., & Erne, P. (1994). Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts: Coupling to signaling systems and gene expression. *Journal of Clinical Investigation*, 93(6), 2372–2378.
- Cushman, D. W., Cheung, H. S., & Peterson, A. E. (1971). Properties of the angiotensin-converting enzyme of lung. *Chest*, 59(5), 10S-11S.
- D'Amore, A., Black, M. J., & Thomas, W. G. (2005). The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize

- angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension*, 46(6), 1347–1354.
- Daskalopoulos, E. P., Janssen, B. J. A., & Blankesteyn, W. M. (2012). Myofibroblasts in the infarct area: Concepts and challenges. *Microscopy and Microanalysis*, 18(1), 35–49.
- Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1), 61–69.
- Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 425(6958), 577-584.
- Dickinson, K. M., Clifton, P. M., & Keogh, J. B. (2011). Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(3), 500–505.
- Dobaczewski, M., Bujak, M., Li, N., Gonzalez-Quesada, C., Mendoza, L. H., Wang, X. F., & Frangogiannis, N. G. (2010-a). Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circulation Research*, 107(3), 418–428.
- Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada, C., & Frangogiannis, N. G. (2010-b). The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(3), 504–511.
- Domeier, T. L., Blatter, L. A., & Zima, A. V. (2009). Alteration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release termination by ryanodine receptor sensitization and in heart failure. *Journal of Physiology*, 587(21), 5197–5209.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R. E., & Acton, S. (2000). UltraRapid Communication A Novel Angiotensin-Converting Enzyme – Related to Angiotensin 1-9. *Circ Res*, 87, e1–e9.
- Feng, X. H., & Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in TGF- β signaling through smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 659–693.
- Fernley, R. T., Coghlan, J. P., Cran, E. J., Fei, T. W., Scoggins, B. A., & McGregor, A. (1978). Conversion of Angiotensin I To Angiotensin II in Sheep. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 5(5), 439–448.
- Ferrão, F. M., Lara, L. S., Axelband, F., Dias, J., Carmona, A. K., Reis, R. I., Costa-Neto, C. M., Vieyra, A., & Lowe, J. (2012). Exposure of luminal membranes of LLC-PK 1 cells to ANG II induces dimerization of AT 1/AT 2 receptors to activate SERCA and to promote Ca²⁺ mobilization. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 302(7), 875–883.
- Ferrario, C. M., & Strawn, W. B. (2006). Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Proinflammatory Mediators in Cardiovascular Disease. *American Journal of Cardiology*, 98(1), 121–128.

- Fischer, P. (2005). The Design, Synthesis and Application of Stereochemical and Directional Peptide Isomers: A Critical Review. *Current Protein & Peptide Science*, 4(5), 339–356.
- Flores, Y., (2021). Estudio de la acción cardioprotectora del retro-enantio de angiotensina (1-9) en isquemia-reperfusión. (Tesis de doctorado). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas de la Universidad de Chile
- Flores-Muñoz, 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. *Journal of Physiology*, 589(4), 939–951.
- Flores-Munoz, M., Work, L. M., Douglas, K., Denby, L., Dominiczak, A. F., Graham, D., & Nicklin, S. A. (2012). Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertension*, 59(2), 300–307.
- Fomovsky, G. M., Rouillard, A. D., & Holmes, J. W. (2012). Regional mechanics determine collagen fiber structure in healing myocardial infarcts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 52(5), 1083–1090.
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., & Eguchi, S. (2018). Angiotensin II signal transduction: An update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 98(3), 1627–1738.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171–177.
- Frangogiannis, N. G. (2006). The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxidants & redox signaling*, 8(11-12), 1907-1939.
- Frangogiannis, N. G. (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research*, 58(2), 88–111.
- Fu, X., Khalil, H., Kanisicak, O., Boyer, J. G., Vagnozzi, R. J., Maliken, B. D., Sargent, M. A., Prasad, V., Valiente-Alandi, I., Blaxall, B. C., & Molkentin, J. D. (2018). Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *Journal of Clinical Investigation*, 128(5), 2127–2143.
- Gonzalez, L., Novoa, U., Moya, J., Gabrielli, L., Jalil, J. E., García, L., Chiong, M., Lavandero, S., & Ocaranza, M. P. (2018). Angiotensin-(1-9) reduces cardiovascular and renal inflammation in experimental renin-independent hypertension. *Biochemical Pharmacology*, 156, 357–370.
- Goodman, M., & Chorev, M. (1979). On the Concept of Linear Modified Retro-Peptide Structures. *Accounts of Chemical Research*, 12(1), 1–7.
- Hafizi, S., Wharton, J., Morgan, K., Allen, S. P., Chester, A. H., Catravas, J. D., Polak, J. M., & Yacoub, M. H. (1998). Expression of functional angiotensin-converting enzyme and AT1 receptors in cultured human cardiac fibroblasts. *Circulation*, 98(23), 2553–2559.
- Hannan, R. E., Davis, E. A., & Widdop, R. E. (2003). Functional role of angiotensin II AT 2 receptor in modulation of AT 1 receptor-mediated contraction in rat uterine

- artery: Involvement of bradykinin and nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 140(5), 987–995.
- Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R., & Clark, K. L. (2002). Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Letters*, 532(1–2), 107–110.
- Hinz, B. (2007-a). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 526–537.
- Hinz, B. (2010). The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *Journal of Biomechanics*, 43(1), 146–155.
- Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M. L., & Gabbiani, G. (2007-b). The myofibroblast: One function, multiple origins. *American Journal of Pathology*, 170(6), 1807–1816.
- Horiguchi, M., Ota, M., & Rifkin, D. B. (2012). Matrix control of transforming growth factor- β function. *Journal of Biochemistry*, 152(4), 321–329.
- Hoyert, D. L., Heron, M. P., Murphy, S. L., & Kung, H. C. (2006). Deaths: final data for 2003. *National Vital Statistics Reports: From the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, 54(13), 1–120.
- Hussain, M., & Awan, F. R. (2018). Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Hypertension*, 40(4), 344–352.
- Ieda, m. (2011). cardiac fibroblasts regulate myocardial proliferation through β 1 Integrin. *Bone*, 23(1), 1–7.
- Ignotz, R. A., & Massague, J. (1986). Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 261(9), 4337–4345.
- Inostroza, E., (2020). - (Tesis de doctorado). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas de la Universidad de Chile
- Jackman, H. L., Massad, M. G., Sekosan, M., Tan, F., Brovkovich, V., Marcic, B. M., & Erdös, E. G. (2002). Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart role of cathepsin A. *Hypertension*, 39(5), 976–981.
- Katada, J., & Majima, M. (2002). AT2 receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *British Journal of Pharmacology*, 136(4), 484–491.
- Khalil, H., Kanisicak, O., Prasad, V., Correll, R. N., Fu, X., Schips, T., Vagnozzi, R. J., Liu, R., Huynh, T., Lee, S., Karch, J., & Molkenstein, J. D. (2017). Underlies Cardiac Fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 127(10), 3770–3783.
- Kim, H., Yoon, S. C., Lee, T. Y., & Jeong, D. (2009). Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicology Letters*, 184, 13–17.
- Kindrachuk, J., Scruten, E., Attah-Poku, S., Bell, K., Potter, A., Babiuk, L. A., Griebel, P. J., & Napper, S. (2011). Stability, toxicity, and biological activity of host defense peptide BMAP28 and its inversed and retro-inversed isomers. *Biopolymers*, 96(1), 14–24.

- Kittana, N. (2018). Angiotensin-converting enzyme 2–Angiotensin 1-7/1-9 system: novel promising targets for heart failure treatment. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 32(1), 14–25.
- Knowlton, A. A., Connelly, C. M., Romo, G. M., Mamuya, W., Apstein, C. S., Brecher, P., & Ngoy, S. (1992). Rapid expression of fibronectin in the rabbit heart after myocardial infarction with and without reperfusion. *Journal of Clinical Investigation*, 89(4), 1060–1068.
- Kobayashi, T., Liu, X., Wen, F. Q., Kohyama, T., Shen, L., Wang, X. Q., Hashimoto, M., Mao, L., Togo, S., Kawasaki, S., Sugiura, H., Kamio, K., & Rennard, S. I. (2006). Smad3 mediates TGF- β 1-induced collagen gel contraction by human lung fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(1), 290–295.
- Kokkonen, J. O., Saarinen, J., & Kovanen, P. T. (1997). Regulation of local angiotensin II formation in the human heart in the presence of interstitial fluid: Inhibition of chymase by protease inhibitors of interstitial fluid and of angiotensin-converting enzyme by ANG-(1-9) formed by heart carboxypeptidase A-. *Circulation*, 95(6), 1455–1463.
- Kreatsoulas, C., & Anand, S. S. (2010). The impact of social determinants on cardiovascular disease. *Canadian Journal of Cardiology*, 26(SUPPL. C), 8C-13C.
- Leask, A., & Abraham, D. J. (2004). TGF- β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18(7), 816–827.
- Li, N., Cai, R., Niu, Y., Shen, B., Xu, J., & Cheng, Y. (2012). Inhibition of angiotensin II-induced contraction of human airway smooth muscle cells by angiotensin-(1-7) via downregulation of the RhoA/ROCK2 signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(4), 811–818.
- Lijnen, P., Petrov, V., Rumilla, K., & Fagard, R. (2002). Stimulation of collagen gel contraction by angiotensin II and III in cardiac fibroblasts. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 3(3), 160–166.
- Lijnen, P., Petrov, V., & Fagard, R. (2003). Transforming growth factor- β 1-mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblasts. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 4(2), 113-118.
- Massagué, J., Seoane, J., & Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes and Development*, 19(23), 2783–2810.
- Matsubara, H., Kanasaki, M., Murasawa, S., Tsukaguchi, Y., Nio, Y., & Inada, M. (1994). Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *Journal of Clinical Investigation*, 93(4), 1592–1601.
- Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 292(1), 82–97.
- Mendoza-Torres, E., Riquelme, J. A., Vielma, A., Sagredo, A. R., Gabrielli, L., Bravo-Sagua, R., Jalil, J. E., Rothermel, B. A., Sanchez, G., Ocaranza, M. P., & Lavandero, S. (2018). Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion

- injury by angiotensin-(1–9) through an AT₂ R and Akt-dependent mechanism. *Pharmacological Research*, 135, 112–121.
- Mifune, M., Sasamura, H., Shimizu-Hirota, R., Miyazaki, H., & Saruta, T. (2000). Angiotensin II Type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 36(5), 845–850.
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile (2014). Departamento de Estadísticas e Información en salud (DEIS). Disponible en: <https://www.deis.cl>. (Visita:20/11/2018)
- Miura, S. I., Matsuo, Y., Kiya, Y., Karnik, S. S., & Saku, K. (2010). Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT₁ and AT₂ receptors. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(1), 85-90.
- Nakajima, M., Hutchinson, H. G., Fujinaga, M., Hayashida, W., Morishita, R., Zhang, L., Horiuchi, M., Pratt, R. E., & Dzau, V. J. (1995). The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: Gain-of-function study using gene transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), 10663–10667.
- Norambuena-Soto, I., Ocaranza, M. P., Cancino-Arenas, N., Sanhueza-Olivares, F., Villar-Fincheira, P., Leiva-Navarrete, S., Mancilla-Medina, C., Moya, J., Novoa, U., Jalil, J. E., Castro, P. F., Lavandero, S., & Chiong, M. (2020). Angiotensin-(1–9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1-dependent mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 180(July), 114190.
- Nuñez, A., (2018). Evaluación de estabilidad y bioactividad del péptido retro-enantio análogo de angiotensina-(1-9) (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile
- Ocaranza, María Paz, Godoy, I., Jalil, J. E., Varas, M., Collantes, P., Pinto, M., Roman, M., Ramirez, C., Copaja, M., Diaz-Araya, G., Castro, P., & Lavandero, S. (2006). Enalapril attenuates downregulation of angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension*, 48(4), 572–578.
- Ocaranza, María Paz, & Jalil, J. E. (2012). Protective role of the ACE2/Ang-(19) axis in cardiovascular remodeling. *International Journal of Hypertension*, 2012.
- Ocaranza, Maria Paz, Lavandero, S., Jalil, J. E., Moya, J., Pinto, M., Novoa, U., Apablaza, F., González, L., Hernández, C., Varas, M., López, R., Godoy, I., Verdejo, H., & Chiong, M. (2010). Angiotensin-(1-9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *Journal of Hypertension*, 28(5), 1054–1064.
- Ocaranza, Maria Paz, Moya, J., Barrientos, V., Alzamora, R., Hevia, D., Morales, C., Pinto, M., Escudero, N., García, L., Novoa, U., Ayala, P., Díaz-Araya, G., Godoy, I., Chiong, M., Lavandero, S., Jalil, J. E., & Michea, L. (2014). Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *Journal of Hypertension*, 32(4), 771–783.
- Ohkubo, N., Matsubara, H., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Tsutumi, Y., Shibazaki, Y., Iwasaka, T., & Inada, M. (1997).

- Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation*, 96(11), 3954–3962.
- Ocaranza, M., Riquelme, J. A., García, L., Jalil, J. E., Chiong, M., Santos, R. A. S., & Lavandero, S. (2020). Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 17(2), 116–129.
- Porter, K. E., & Turner, N. A. (2009). Cardiac fibroblasts: At the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology and Therapeutics*, 123(2), 255–278.
- Prades, R., Oller-Salvia, B., Schwarzmaier, S. M., Selva, J., Moros, M., Balbi, M., Grazú, V., De La Fuente, J. M., Egea, G., Plesnila, N., Teixidó, M., & Giralt, E. (2015). Applying the retro-enantio approach to obtain a peptide capable of overcoming the blood-brain barrier. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(13), 3967–3972.
- Promega (2020). CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Datasheet. Disponible en: https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical_bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol/. Visita:24/8/21
- Regitz-Zagrosek, V., Fielitz, J., & Fleck, E. (1998). Myocardial angiotensin receptors in human hearts. *Basic Research in Cardiology*, 93(2 SUPPL.), 37–42.
- Resnick, N., Yahav, H., Shay-Salit, A., Shushy, M., Schubert, S., Zilberman, L. C. M., & Wofovitz, E. (2003). Fluid shear stress and the vascular endothelium: For better and for worse. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81(3), 177–199.
- Rifkin, D. B., Mazzeri, R., Munger, J. S., Noguera, I., & Sung, J. (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *Apmis*, 107(1), 80–85.
- Rivas-Santisteban, R., Rodriguez-Perez, A. I., Muñoz, A., Reyes-Resina, I., Labandeira-García, J. L., Navarro, G., & Franco, R. (2020). Angiotensin AT1 and AT2 receptor heteromer expression in the hemilesioned rat model of Parkinson's disease that increases with levodopa-induced dyskinesia. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 1–16.
- Roell, K. R., Reif, D. M., & Motsinger-Reif, A. A. (2017). An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. *Frontiers in Pharmacology*, 8(APR), 1–11.
- Schiller, M., Javelaud, D., & Mauviel, A. (2004). TGF- β -induced SMAD signaling and gene regulation: Consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *Journal of Dermatological Science*, 35(2), 83–92.
- Schmieder, R. E., Hilgers, K. F., Schlaich, M. P., & Schmidt, B. M. (2007). Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet*, 369(9568), 1208–1219.
- Schultz, J. E. J., Witt, S. A., Glascock, B. J., Nieman, M. L., Reiser, P. J., Nix, S. L., Kimball, T. R., & Doetschman, T. (2002). TGF- β 1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *Journal of Clinical Investigation*, 109(6), 787–796.
- Selvetella, G., Hirsch, E., Notte, A., Tarone, G., & Lembo, G. (2004). Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: Points of convergence and divergence. *Cardiovascular Research*, 63(3), 373–380.

- Selvetella, G., & Lembo, G. (2005). Mechanisms of Cardiac Hypertrophy. *Heart Failure Clinics*, 1(2), 263–273.
- Serini, G., Bochaton-Piallat, M. L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., & Gabbiani, G. (1998). The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1. *Journal of Cell Biology*, 142(3), 873–881.
- Shah, R., Wang, Y., & Foody, J. A. M. (2008). Effect of Statins, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, and Beta Blockers on Survival in Patients \geq 65 Years of Age with Heart Failure and Preserved Left Ventricular Systolic Function. *American Journal of Cardiology*, 101(2), 217–222.
- Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700.
- Sotomayor-Flores, C., Rivera-Mejías, P., Vásquez-Trincado, C., López-Crisosto, C., Morales, P. E., Pennanen, C., Polakovicova, I., Aliaga-Tobar, V., García, L., Roa, J. C., Rothermel, B. A., Maracaja-Coutinho, V., Ho-Xuan, H., Meister, G., Chiong, M., Ocaranza, M. P., Corvalán, A. H., Parra, V., & Lavandero, S. (2020). Angiotensin-(1–9) prevents cardiomyocyte hypertrophy by controlling mitochondrial dynamics via miR-129-3p/PKIA pathway. *Cell Death and Differentiation*, 27(9), 2586–2604.
- Souders, C. A., Bowers, S. L. K., & Baudino, T. A. (2009). Cardiac fibroblast: The renaissance cell. *Circulation Research*, 105(12), 1164–1176.
- Staufenberger, S., Jacobs, M., Brandstatter, K., Hafner, M., Regitz-Zagrosek, V., Ertl, G., & Schorb, W. (2001). Angiotensin II type1 receptor regulation and differential trophic effects on rat cardiac myofibroblasts after acute myocardial infarction. *Journal of Cellular Physiology*, 187(3), 326–335.
- Stone, V., Johnston, H., & Schins, R. P. F. (2009). Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations in vitro methods for nanotoxicology Vicki Stone et al. *Critical Reviews in Toxicology*, 39(7), 613–626.
- Su, S., Su, S., & Chen, J. (2015). Collagen Gel Contraction Assay. *Protocol Exchange*, 10–13.
- Sumiyoshi, K., Nakao, A., Setoguchi, Y., Okumura, K., Tsuboi, R., & Ogawa, H. (2003). Smads regulate collagen gel contraction by human dermal fibroblasts. *British Journal of Dermatology*, 149(3), 464–470.
- Tousoulis, D., Kampoli, A.-M., Tentolouris Nikolaos Papageorgiou, C., & Stefanadis, C. (2011). The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Current Vascular Pharmacology*, 10(1), 4–18.
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Ohkubo, N., Mori, Y., Nozawa, Y., Murasawa, S., Kijima, K., Maruyama, K., Masaki, H., Moriguchi, Y., Shibasaki, Y., Kamihata, H., Inada, M., & Iwasaka, T. (1998). Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circulation Research*, 83(10), 1035–1046.
- Turner, A. J., Tipnis, S. R., Guy, J. L., Rice, G. I., & Hooper, N. M. (2002). ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallopeptidase and a homologue of angiotensin-

- converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(4), 346–353.
- Unger, T. (2002). The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *American Journal of Cardiology*, 89(2 SUPPL. 1), 3–9.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., & Tummino, P. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14838–14843.
- Villalobos, E., Criollo, A., Schiattarella, G. G., Altamirano, F., French, K. M., May, H. I., Jiang, N., Nguyen, N. U. N., Romero, D., Roa, J. C., García, L., Diaz-Araya, G., Morselli, E., Ferdous, A., Conway, S. J., Sadek, H. A., Gillette, T. G., Lavandero, S., & Hill, J. A. (2019). Fibroblast Primary Cilia Are Required for Cardiac Fibrosis. *Circulation*, 139(20), 2342–2357.
- Vivar, R., Humeres, C., Muñoz, C., Boza, P., Bolivar, S., Tapia, F., Lavandero, S., Chiong, M., & Diaz-Araya, G. (2016). FoxO1 mediates TGF-beta1-dependent cardiac myofibroblast differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(1), 128–138.
- Warnecke, C., Kaup, D., Marienfeld, U., Poller, W., Yankah, C., Gräfe, M., Fleck, E., & Regitz-Zagrosek, V. (2001). Adenovirus-mediated overexpression and stimulation of the human angiotensin II type 2 receptor in porcine cardiac fibroblasts does not modulate proliferation, collagen I mRNA expression and ERK1/ERK2 activity, but inhibits protein tyrosine phosphatases. *Journal of Molecular Medicine*, 79(9), 510–521.
- Weber, K. T. (1989). Cardiac interstitium in health and disease: The fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology*, 13(7), 1637–1652.
- Wen, B., Liang, J., Deng, X., Chen, R., & Peng, P. (2015). Effect of fluid shear stress on portal vein remodeling in a rat model of portal hypertension. *Gastroenterology Research and Practice*, 2015, 1–8.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12), 872–884.
- Westermeier, F., Bustamante, M., Pavez, M., García, 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). *Pharmacological Research*, 101, 41–55.
- Wipff, P. J., & Hinz, B. (2008). Integrins and the activation of latent transforming growth factor β 1 - An intimate relationship. *European Journal of Cell Biology*, 87(8–9), 601–615.
- Wong, N. D., Sciammarella, M. G., Polk, D., Gallagher, A., Miranda-Peats, L., Whitcomb, B., ... & Berman, D. S. (2003). The metabolic syndrome, diabetes, and subclinical atherosclerosis assessed by coronary calcium. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(9), 1547-1553.

- Yip, D. K., & Auersperg, N. (1972). The dye-exclusion test for cell viability: Persistence of differential staining following fixation. *In Vitro: Journal of the Tissue Culture Association*, 7(6), 323–329.
- Zhao, X. H., Laschinger, C., Arora, P., Szászi, K., Kapus, A., & McCulloch, C. A. (2007). Force activates smooth muscle α -actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 120(10), 1801–1809.
- Zi, Z., Chapnick, D. A., & Liu, X. (2012). Dynamics of TGF- β /Smad signaling. *FEBS Letters*, 586(14), 1921–1928.