

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR  
E INGENIERÍA GENÉTICA**



**TÍTULO:**

**PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN KRÜPPEL-LIKE EN LA  
REMODELACIÓN CARDÍACA ASOCIADA A HIPERTROFIA EN UN  
MODELO MURINO SIMILAR A FALLA  
CARDÍACA POSTINFARTO**

**PRESENTADO POR:**

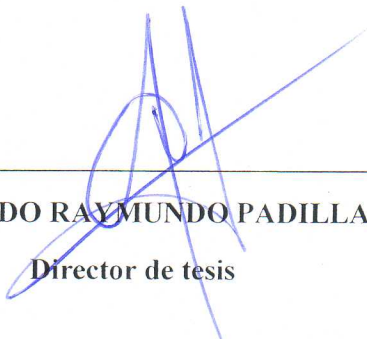
**MÉDICA CIRUJANA. MICHELLE GIOVANNA SANTOYO SUÁREZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA  
GENÉTICA**

Monterrey N.L., Julio 2023.

PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN KRÜPPEL-LIKE EN LA  
REMODELACIÓN CARDÍACA ASOCIADA A HIPERTROFIA EN UN MODELO  
MURINO SIMILAR A FALLA CARDÍACA POSTINFARTO

**Aprobación de la tesis:**



---

**DR. C. GERARDO RAYMUNDO PADILLA RIVAS**

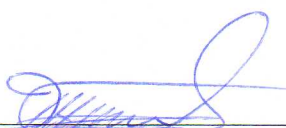
**Director de tesis**



---

**DR. C. JOSÉ FRANCISCO ISLAS CISNEROS**

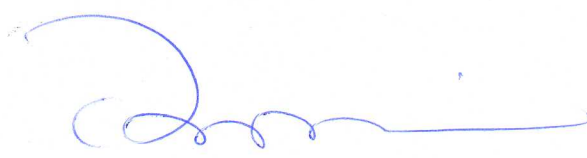
**Co-director de tesis**



---

**DR. C. JORGE ÁNGEL ISIDRO ASCACIO MARTÍNEZ**

**Miembro de la Comisión de Tesis**



---

**DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ**

**Sub Director de Estudios de Posgrado**

## AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. ANTECEDENTES</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1. Enfermedades Cardiovasculares</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.1. Infarto Agudo al Miocardio</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2. Cardiogénesis y programación fetal cardíaca</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3. Factores Krüppel-like: Definición</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.1. Estructura y Función</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.2. Clasificación Filogenética</b> .....	<b>26</b>
<b>1.3.3 KLFs y su involucramiento en el desarrollo embrionario del corazón</b> .....	<b>28</b>
<b>1.3.4 KLFs en el metabolismo energético del corazón</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3.5 KLFs en enfermedades cardiovasculares</b> .....	<b>31</b>
<b>1.3.5.1 Enfermedad Arterial Coronaria y Aterosclerosis</b> .....	<b>32</b>
<b>1.3.5.2 Infarto al miocardio y remodelación cardíaca</b> .....	<b>34</b>
<b>1.3.5.3 Cardiopatías congénitas</b> .....	<b>36</b>
<b>1.4 Isoproterenol en la inducción de patologías cardiovasculares</b> .....	<b>39</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>42</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>43</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1. Objetivo general</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>43</b>
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>44</b>
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	<b>45</b>
<b>6.1 Animales de Experimentación</b> .....	<b>45</b>
<b>6.2 Determinación de la dosis óptima de isoproterenol para inducción de hipertrofia cardíaca</b> .....	<b>45</b>
<b>6.3 Administración de isoproterenol</b> .....	<b>45</b>
<b>6.4 Eutanasia por dislocación cervical</b> .....	<b>46</b>
<b>6.5 Cardiectomía: Obtención y almacenamiento de las muestras</b> .....	<b>46</b>
<b>6.6 Obtención de primers</b> .....	<b>46</b>
<b>6.7 Extracción de ARN total, Retrotranscripción y q-PCR</b> .....	<b>47</b>
<b>6.8 Cálculo de eficiencia de primers</b> .....	<b>47</b>
<b>6.9 Cuantificación génica relativa por método de Pfaffl</b> .....	<b>48</b>
<b>6.10 Análisis estadístico</b> .....	<b>48</b>
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>

7.1	Determinación de dosis óptima de isoproterenol para inducción de hipertrofia cardíaca patológica.....	49
7.2	Pares de primers seleccionados.....	54
7.3	Extracción de ARN total y cuantificación por Espectrofotometría UV-Vis con Nanodrop 2000. ....	54
7.4	Retrotranscripción de ARN.....	55
7.5	Cálculos de eficiencia de primers.....	56
7.6	PCR en tiempo real .....	58
7.7	Resultados de Expresión Génica Relativa.....	59
8.	DISCUSIÓN.....	72
8.1	<i>Expresión génica relativa de KLF-3</i> .....	72
8.2	<i>Expresión génica relativa de KLF-4</i> .....	73
8.3	<i>Expresión génica relativa de KLF-6</i> .....	73
8.4	<i>Expresión génica relativa de KLF-11</i> .....	74
8.5	<i>Expresión génica relativa de KLF-12</i> .....	75
8.6	<i>Expresión génica relativa de KLF-13</i> .....	76
8.7	<i>Expresión génica relativa de KLF-15</i> .....	76
8.8	<i>Expresión génica relativa de GATA-4</i> .....	77
8.9	<i>Expresión génica relativa de MEF2C</i> .....	78
8.10	<i>Expresión génica relativa de TBX5</i> .....	79
9.	CONCLUSIONES.....	80
10.	RESUMEN GRÁFICO .....	81
11.	PERSPECTIVAS .....	82
12.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....	85
13.	REFERENCIAS .....	86
14.	APÉNDICES.....	98
13.1	Extracción de ARN con método de Trizol-Cloroformo .....	98
13.2	Síntesis de ADNc.....	99
13.3	RT-qPCR. ....	100

## I. DEDICATORIA

Para Fidel Santoyo Gutiérrez, Blanca Leticia Suárez Marín y Fidel Ernesto Santoyo Suárez.

Papá, te siento en el sol que me abraza todos los días.

Mamá, te recuerdo en las flores que cuidabas con tanto esmero.

Sury, te veo en las aves que admirabas con exceso.

Han pasado más de tres años sin ustedes y sin embargo no ha habido un solo día en el que no los piense.

Los amo donde quiera que estén.

## II. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, no puedo más que agradecer a Dios, porque a pesar de las dificultades experimentadas en los últimos años, nunca ha soltado mi mano. Para mí, muestra de esto es que, a pesar de haber llegado a una ciudad nueva, sin nadie que viera por mí, de alguna forma fui dirigida hacia este Departamento donde he encontrado personas tan bondadosas.

**Dr. Gerardo Padilla**, quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su constante apoyo y preocupación, tanto en el ámbito académico como en el personal. Agradezco especialmente su generosidad al mostrarme la ciudad y sus alrededores, actuando como mi guía turístico, jajaja. Su amabilidad ha dejado una huella duradera en mí.

**Dr. Francisco Islas**, le estoy enormemente agradecida por brindarme la oportunidad de unirme a su línea de investigación y participar en sus proyectos adyacentes. Esta experiencia ha sido excepcionalmente enriquecedora para mi crecimiento y desarrollo como investigadora. Además, quisiera agradecerle por sus recomendaciones de anime, jajaja.

**Dr. Jorge Ascacio**, mi sincero agradecimiento por su continua disponibilidad y apoyo brindado a lo largo del desarrollo de este proyecto. Su opinión ha sido de gran valor y su disposición para ayudar ha sido invaluable.

**Dra. Nancy Garza**, a pesar de no formar parte oficialmente de mi comisión, siempre estuvo dispuesta a revisar mis avances y ofreció sugerencias sumamente acertadas. Su apoyo fue fundamental para el éxito de este trabajo y estoy sinceramente agradecida por su generosidad y buena disposición.

**Dra. Ana María Rivas**, quiero agradecerle sinceramente por su apoyo y comprensión. Sus palabras de aliento y su apoyo al inicio de mi maestría significaron mucho para mí.

A mis compañeros de generación, **Chris y Pola**, gracias por permitirme hacer estupideces con ustedes estos dos años. Espero que nuestra amistad perdure por muchísimos más. Gracias también a los amigos con los que compartí el laboratorio durante este tiempo: **Pablo, Adry, Antonio, Jimena, Andrés** y, recientemente **Óscar y Selene**. Sin su ayuda, consejos y palabras de apoyo, la realización de mi tesis habría sido un fracaso. Gracias también a **Sofy**,

a **Fer**, a **Samuel**. Si bien no fuimos parte del mismo laboratorio, a lo largo de estos dos años formé con ustedes un lazo de amistad que difícilmente olvidaré. Gracias **Gali y Amairani**. Nos vimos poco en el último año, sin embargo, agradezco su amistad y el haberme brindado un espacio seguro para compartir nuestras tragedias académicas y personales.

A todos ustedes amigos, muchas gracias. Me quedo con los momentos de risa desquiciada que vivimos juntos.

No puedo dejar de agradecer de corazón a las increíbles secretarias del Departamento. Chicas, sin ustedes, el caos se apoderaría del lugar en cuestión de horas. Su labor incansable y dedicación han sido la columna vertebral de nuestro Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. Siempre están ahí para resolver cualquier situación y su amabilidad contagiosa nos llena de energía. **Juany y Violeta**, gracias por ser nuestras heroínas cotidianas y mantener todo en orden. **Laura**, gracias por siempre recibirnos con una sonrisa y por tantas veces que te hice hacer malabares entre la agenda de auditorio, biblioteca, sala de juntas, etcétera. Un agradecimiento especial a **Deyanira**, quien, desde el principio, a pesar de no llevar mucho tiempo en el departamento, se esforzó al máximo para resolver eficientemente todas mis dudas. Siempre estuvo al tanto de mis pendientes escolares, incluso más que yo misma. Pero más allá de eso, quiero agradecerle por brindarme su confianza y amistad. Y hablando del equipo de trabajo del Departamento, muchas gracias también a **Macri**, quien siempre estuvo presente, asegurándose de que tuviéramos un espacio de trabajo limpio y organizado para llevar a cabo nuestras actividades diarias.

Pasando a agradecimientos más personales, **tío Javier y tía Olivia**, no encuentro palabras suficientes para expresar mi gratitud y el profundo afecto que siento hacia ustedes. Su amor incondicional, apoyo constante y guía sabia han sido un regalo invaluable. Han estado presentes en cada etapa de mi vida, brindándome consuelo, orientación y cariño. Han sido mi refugio y han llenado el vacío que dejó la ausencia de mis padres.

**Tía Judith y tía Eli**, quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su constante apoyo y preocupación, incluso a pesar de la distancia que nos separa. Aunque nuestras interacciones puedan ser limitadas por la distancia física, nunca he sentido su ausencia. Siempre encuentro



consuelo en saber que están ahí, dispuestas a escucharme, aconsejarme y animarme en cada paso que doy.

**Maye**, quiero expresar lo especial que eres para mí y cómo has ocupado un lugar muy significativo en mi vida. Admiro profundamente tu dedicación y pasión por la ciencia. Gracias por ser una verdadera inspiración para mí mientras navego por este nuevo mundo. Además de ser una científica brillante, también eres una amiga incondicional. Tu apoyo y aliento han sido fundamentales para mi crecimiento personal y académico. Me has animado en momentos difíciles y celebrado mis éxitos con alegría genuina, te quiero mucho.

Finalmente, pero no menos importante: **Álvaro**. No encuentro las palabras adecuadas para expresar el profundo amor que siento por ti. Mi gratitud hacia ti es infinita. Has estado a mi lado desde hace ya casi diez años, sin importar las circunstancias. Cuando dudo de mis capacidades, tú siempre estás ahí para recordarme mis fortalezas y resaltar mis logros, incluso aquellos que considero pequeños. Tu amor incondicional y apoyo constante han sido la base de mi bienestar y felicidad. No puedo imaginar mi vida sin ti. Sigamos caminando juntos, enfrentando cada desafío con valentía y celebrando cada momento de felicidad. Álvaro, te amo más de lo que las palabras pueden expresar. Tu presencia en mi vida es un regalo invaluable que siempre atesoraré.

### **III. FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo recibió financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por medio de la convocatoria Ciencia de Frontera 2019, bajo el proyecto concedido al Dr. C. José Francisco Islas Cisneros.

## IV. LUGAR DE TRABAJO

Esta investigación se llevó a cabo en la **Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)**, *Facultad de Medicina y Hospital Universitario “José Eleuterio González”, Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.*

Bajo la dirección de:

- Dr. C. Gerardo Raymundo Padilla Rivas  
*Director*
- Dr. C. José Francisco Islas Cisneros  
*Codirector*
- Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez  
*Miembro de la comisión*

Con la colaboración de las siguientes dependencias:

- **Departamento de Farmacología y Toxicología.**

Colaboradores:

- Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño  
*Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.*
- Dra. Med. Lourdes Garza Ocañas  
*Departamento de Farmacología y Toxicología.*
- M.C. M.V.Z. Gilberto Arévalo Martínez.  
*Departamento de Fisiología*

*Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el número de registro BI-000026*

## V. LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Fases de la reparación cardíaca postinfarto.....	19
Ilustración 2. Progresión de la cardiopatía isquémica.....	20
Ilustración 3. La cardiogénesis tiene su origen en la gastrulación.....	21
Ilustración 4. Descripción general del desarrollo del corazón.....	22
Ilustración 5. Dedos de Zinc.....	24
Ilustración 6. Árbol filogenético de los factores de transcripción Krüppel-like.....	26
Ilustración 7. Engrosamiento valvular atribuido a mutación en KLF-3.....	28
Ilustración 8. Aterosclerosis.....	31
Ilustración 9. Malformaciones en extremidades superiores, encontradas en el Síndrome de Holt Oram .....	36
Ilustración 10. Estrategia experimental general .....	43
Ilustración 11. Abordaje Quirúrgico utilizado .....	48
Ilustración 12. Corazón control comparado con corazón del día 21 después de la inducción de daño cardíaco .....	51
Ilustración 13. Espectro de Absorción de ARN total de muestra de corazón control.....	54
Ilustración 14. Espectro de Absorción de ADN complementario de muestra de corazón, de 2 días posteriores a la administración de isoproterenol.....	54
Ilustración 15. Curva de disociación de KLF-2.....	57
Ilustración 16. Curva de disociación de KLF-3.....	57
Ilustración 17. Curva de disociación de KLF-4. ....	58
Ilustración 18. Curva de disociación de KLF-6. ....	58
Ilustración 19. Curva de disociación de KLF-7. ....	58
Ilustración 20. Curva de disociación de KLF-11. ....	58
Ilustración 21. Curva de disociación de KLF-12. ....	59
Ilustración 22. Curva de disociación de KLF-13 .....	59
Ilustración 23. Curva de disociación de KLF-15.....	59
Ilustración 24. Curva de disociación de KLF-17. ....	59

Ilustración 25. Curva de disociación del gen GAPDH.....	60
Ilustración 26. Curva de disociación del gen GATA4. ....	60
Ilustración 27. Curva de disociación del gen MEF2C. ....	60
Ilustración 28. Curva de disociación del gen TBX5. ....	60
Ilustración 29. Resumen gráfico. Posibles funciones atribuidas a los KLFs analizados....	80
Ilustración 30. Corte histológico de corazón control en tinción de Tricrómico de Masson 300x.....	81

## VI. LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Crecimiento cardíaco post-administración de Isoproterenol.....	51
Gráfica 2. QRT-PCR (ANP: estrés cardíaco y $\alpha$ -MHC: hipertrofia).....	52
Gráfica 3. Eficiencia de primers para el gen GAPDH.....	55
Gráfica 4. Eficiencia de primers para el gen KLF-6.....	55
Gráfica 5. Eficiencia de primers para el gen KLF-12. ....	55
Gráfica 6. Eficiencia de primers para el gen KLF-15. ....	56
Gráfica 7. Expresión Génica Relativa de KLF-3. ....	61
Gráfica 8. Expresión Génica Relativa de KLF-4.....	62
Gráfica 9. Expresión Génica Relativa de KLF-6. ....	63
Gráfica 10. Expresión Génica Relativa de KLF-11. ....	64
Gráfica 11. Expresión Génica Relativa de KLF-12. ....	65
Gráfica 12. Expresión Génica Relativa de KLF-13. ....	66
Gráfica 13. Expresión Génica Relativa de KLF-15. ....	67
Gráfica 14. Expresión Génica Relativa de GATA4. ....	68
Gráfica 15. Expresión Génica Relativa de MEF2C. ....	69
Gráfica 16. Expresión Génica Relativa de TBX5. ....	70
Gráfica 17. Expresión génica relativa cardíaca de factores de diferenciación, KLFs, Colágena 1 y citocinas proinflamatorias tras la administración de isoproterenol.....	78
Gráfica 18. Expresión génica relativa cardíaca de diferentes canales iónicos cardíacos y de la Proteína Morfogénica de Hueso 2 (BMP2) .....	79

## VII. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Supervivencia de grupos al día 21.....	48
Tabla 2. Resultados de Morfometría cardíaca.....	49
Tabla 3. Resultados de Morfometría cardíaca (Continuación).....	50
Tabla 4. Listado de primers.....	53
Tabla 5. Eficiencia de primers para el gen GAPDH.....	55
Tabla 6. Eficiencia de primers para el gen KLF6.....	55
Tabla 7. Eficiencia de primers para el gen KLF12.....	55
Tabla 8. Eficiencia de primers para el gen KLF15.....	56
Tabla 9. Resultados del cálculo de eficiencia de primers.....	56
Tabla 10. Condiciones de reacción de amplificación.....	99

## VIII. LISTA DE ABREVIATURAS

- OMS** Organización Mundial De La Salud
- CVD** Enfermedades Cardiovasculares
- IAM** Infarto Agudo Al Miocardio
- DAMP** Patrones Moleculares Asociados A Daño
- VEGF** Factor De Crecimiento Endotelial Vascular
- IP-10** Proteína-10 Inducible Por IFN- $\Gamma$
- KLF** Krüppel-Like Factor
- SRF** Factor De Respuesta A Suero
- NLS** Señal De Localización Nuclear
- HDAC** Histonas Desacetilasa
- ANP** Péptido Natriurético Atrial
- FGF** Factor De Crecimiento Fibroblástico
- CAD** Enfermedad De Las Arterias Coronarias
- EC** Células Endoteliales
- PECAM-1** Molécula De Adhesión De Células Endoteliales Plaquetarias
- VE-Cadherina** Cadherina Endotelial Vascular
- VEGFR2/3** Receptor De Crecimiento Endotelial Vascular 2/3
- MEF2** Factor Potenciador De Miocitos-2
- VCAM-1** Molécula De Adhesión Vascular-1
- VSMC** Células Del Músculo Liso Vascular
- NF-Kb** Factor Nuclear Kappa B
- PISCO** Oclusión Intermitente Del Seno Coronario Controlada Por Presión
- FAO** Oxidación De Ácidos Grasos
- SPTLC1** Subunidad 1 Y 2 De Base De Cadena Larga De Serina Palmitoiltransferasa
- Dbcm** Miocardiopatía Diabética
- NOX4** NADPH Oxidasa 4
- CC** Cardiopatías Congénitas

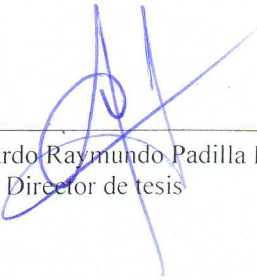


## IX. RESUMEN

**Méd. Michelle Giovanna Santoyo Suárez**

**Título:** “PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN KRÜPPEL-LIKE EN LA REMODELACIÓN CARDÍACA ASOCIADA A HIPERTROFIA EN UN MODELO MURINO SIMILAR A FALLA CARDÍACA POSTINFARTO”

**INTRODUCCIÓN:** El infarto agudo al miocardio (IAM) es la principal y más grave manifestación clínica de la cardiopatía isquémica. Este consiste en la obstrucción abrupta del flujo sanguíneo en ramas principales de las arterias coronarias, llevando a la isquemia y necrosis de los cardiomiocitos. El tejido dañado suele responder con una hipertrofia patológica y reemplazo por cicatriz fibrótica, causando cambios en la biomecánica y bioquímica cardíaca, conduciendo a un deterioro progresivo en la funcionalidad del órgano y eventualmente a la falla cardíaca. Estas condiciones patológicas favorecen la reactivación una “reprogramación fetal” en el corazón adulto, en los que se ven involucrados factores de maduración cardíaca como *GATA4*, *MEF2c* y *TBX5*, entre otros. Existe evidencia que sugiere que los factores Krüppel-like podrían desempeñar un papel fundamental en la regulación de genes cardíacos. Específicamente, dos factores clave, *KLF-15* y *KLF-4*, parecen funcionar de forma independiente para habilitar los mecanismos represores de la hipertrofia y la expresión génica “fetal”, e inducir la maduración de los cardiomiocitos. Con este proyecto, se pretende averiguar si el resto de los factores de transcripción Krüppel-like, cumplen o no con un rol en los mecanismos adaptativos presentados en la hipertrofia patológica. **OBJETIVO:** Evaluar la expresión de factores de transcripción Krüppel-like en un modelo murino de hipertrofia patológica similar a falla cardíaca postinfarto. **METODOLOGÍA:** En un modelo murino de hipertrofia patológica con inducción química por isoproterenol, se realizó extracción de ARN a diferentes tiempos utilizando el método de Trizol-Cloroformo. El ARN fue sometido a retrotranscripción y se realizó PCR en tiempo real utilizando el kit de mezcla maestra Fast SYBR™ Green. Se realizó una cuantificación relativa de la expresión génica de los diferentes factores seleccionados, usando el método de Pfaffl. **RESULTADOS:** La administración de isoproterenol indujo crecimiento cardíaco con elevación de marcadores moleculares de hipertrofia y estrés. De igual forma provocó variaciones estadísticamente significativo en los factores de transcripción KLFs y GMT a diferentes puntos en el tiempo. **CONCLUSIÓN:** El insulto cardíaco con isoproterenol permitió la inducción de hipertrofia cardíaca con reactivación del programa de genes fetales cardíacos (*GATA4*, *MEF2C*, *TBX5*) y la expresión de diversos tipos de KLFs.

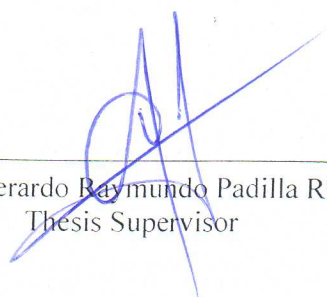
  
Dr. C. Gerardo Raymundo Padilla Rivas  
Director de tesis

## X. ABSTRACT

**M.D. Michelle Giovanna Santoyo Suárez**

**TITLE:** "ROLE OF KRÜPPEL-LIKE TRANSCRIPTION FACTORS IN CARDIAC REMODELING ASSOCIATED WITH HYPERTROPHY IN A MURINE MODEL SIMILAR TO POST-INFARCTION HEART FAILURE"

**INTRODUCTION:** Acute myocardial infarction (AMI) is the main and most serious clinical manifestation of ischemic heart disease. This consists of the abrupt obstruction of blood flow in main branches of the coronary arteries, leading to ischemia and necrosis of cardiomyocytes. Damaged tissue often responds with pathologic hypertrophy and fibrotic scar replacement, causing changes in cardiac biomechanics and biochemistry, leading to progressive deterioration in organ functionality and eventually heart failure. These pathological conditions favor the reactivation of "fetal reprogramming" in the adult heart, in which cardiac maturation factors such as GATA4, MEF2c and TBX5, among others, are involved. There is evidence to suggest that Krüppel-like factors could play a fundamental role in the regulation of cardiac genes. Specifically, two key factors, KLF-15 and KLF-4, appear to function independently to enable repressor mechanisms of hypertrophy and "fetal" gene expression, and to induce cardiomyocyte maturation. With this project, it is intended to assess if the rest of the Krüppel-like transcription factors play a role in the adaptive mechanisms presented in pathological hypertrophy. **OBJECTIVE:** To evaluate the expression of Krüppel-like transcription factors in a murine model of pathological hypertrophy similar to postinfarction heart failure. **METHODOLOGY:** In a murine model of pathological hypertrophy with chemical induction by isoproterenol, RNA extraction was performed at different times using the Trizol-Chloroform method. RNA was reverse transcribed and real-time PCR was performed using the SYBR™Green Fast Master Mix Kit. A relative quantification of the gene expression of the different selected factors was performed, using the Pfaffl method. **RESULTS:** The administration of isoproterenol induced cardiac growth with elevation of molecular markers of hypertrophy and stress. Similarly, it caused statistically significant variations in the transcription factors KLFs and GMT at different points in time. **CONCLUSION:** Cardiac insult with isoproterenol allowed the induction of cardiac hypertrophy with reactivation of the fetal cardiac gene program (GATA4, MEF2C, TBX5) and the expression of various types of KLFs.



---

Dr. C. Gerardo Raymundo Padilla Rivas  
Thesis Supervisor

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Enfermedades Cardiovasculares

Al menos hasta el año 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) las enfermedades cardiovasculares (CVD) fueron la principal causa de muerte a nivel mundial (OMS, 2020). Las causas más comunes de morbilidad y mortalidad por CVD son la cardiopatía isquémica, el evento vascular cerebral y la falla cardíaca congestiva (Gaziano *et al.*, 2006). Estas enfermedades representan al menos el 80% de las CVD en todo el mundo. Todas ellas coinciden en tener como principal factor de riesgo la aterosclerosis. Este fenómeno se caracteriza por el depósito de colesterol LDL en las paredes arteriales, formando estrías grasas que al ser oxidadas liberan partículas proinflamatorias como quimiocinas y moléculas de adhesión vascular (Sarre-Álvarez *et al.*, 2018). Esto favorece la evolución hacia placas fibrosas que disminuyen progresivamente el diámetro de la luz arterial. El flujo turbulento de la sangre a través de un vaso parcialmente ocluido predispone al endotelio a daño por fuerzas de cizallamiento, las cuales pueden llevar a la ruptura de la placa, provocando trombosis o embolismo vascular, y, por lo tanto, dando pie a la aparición de cardiopatía isquémica en cualquiera de sus dos formas clínicas principales: angina o infarto agudo al miocardio (Baynes & Dominiczak, 2019; Pedro-Botet *et al.*, 2020).

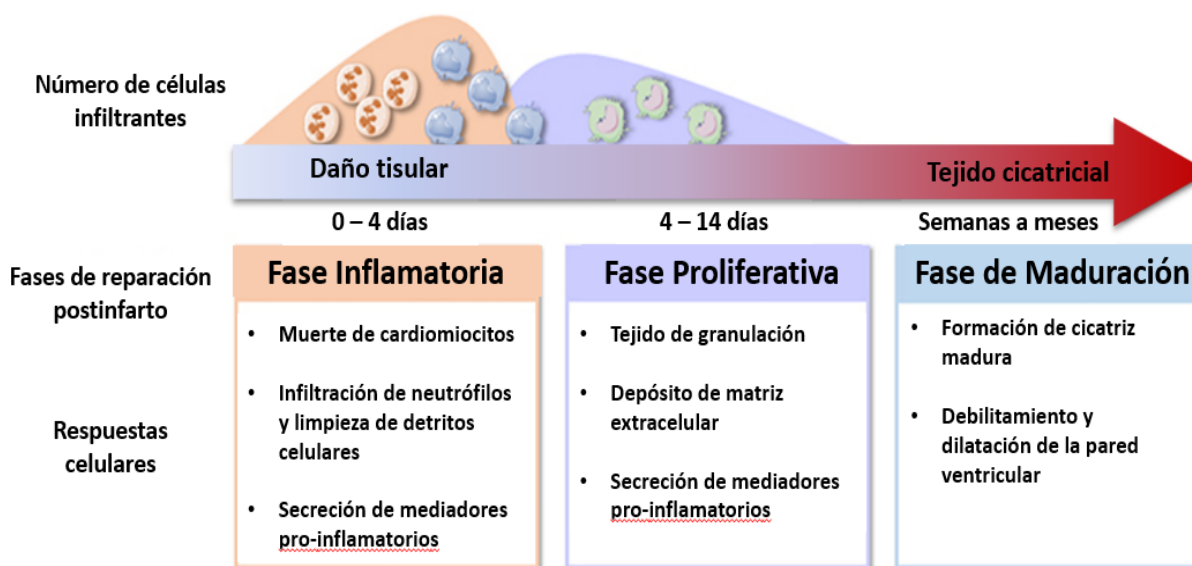
En la actualidad, sin considerar las muertes por COVID-19, la cardiopatía isquémica es la principal causa de defunción en los países desarrollados y es uno de los principales contribuyentes a la carga de morbilidad en los países en desarrollo (OMS, 2020). En esta patología se centrará la descripción de este proyecto.

### 1.1.1. Infarto Agudo al Miocardio

El infarto agudo al miocardio (IAM) es la principal y más grave manifestación clínica de la cardiopatía isquémica. El IAM consiste en la obstrucción abrupta del flujo sanguíneo en ramas principales de las arterias coronarias, llevando a la isquemia de los cardiomiocitos (López *et al.*, 2017). De no restaurarse la irrigación sanguínea, el tejido miocárdico afectado

sufrirá la disminución en el aporte de oxígeno (hipoxia), pasando a un estado de anoxia y finalmente, necrosis tisular.

De forma general, el proceso de reparación cardíaca postinfarto puede dividirse en las siguientes fases (**Ilustración 1**):



*Ilustración 1. Fases de la reparación cardíaca postinfarto. Adaptada de “Hacia la regeneración del corazón: estrategias de bioingeniería para la inmunomodulación” (Ferrini et al., 2019).*

### 1. Fase inflamatoria

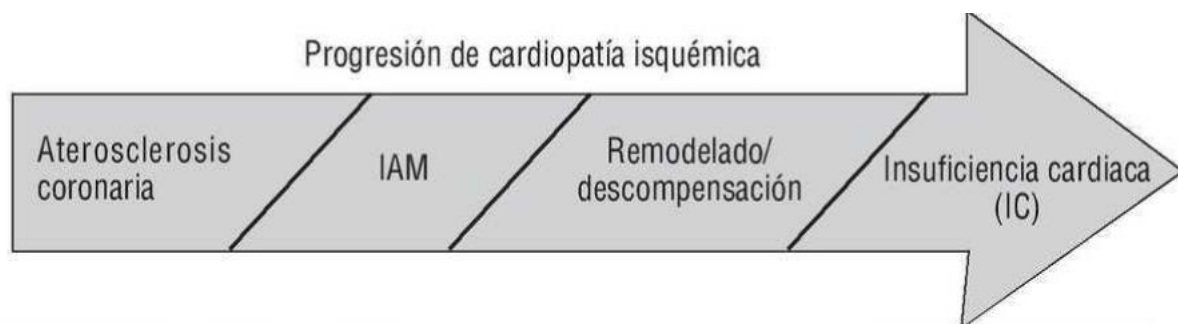
En esta fase, la hipoxia durante el periodo de isquemia daña la integridad de las células endoteliales vasculares, aumentando la permeabilidad de los vasos sanguíneos y favoreciendo la infiltración por leucocitos. Si la isquemia es lo suficientemente prolongada, se activarán programas de muerte celular (principalmente, necrosis, y, en menor grado, apoptosis y autofagia), esto tendrá como resultado la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), que al unirse a los receptores de reconocimiento de patrones del sistema inmune innato, activarán una cascada de mediadores de inflamación, incluyendo citocinas proinflamatorias (IL-1, TNF, IL-6, IL-18), quimiocinas y moléculas de adhesión celular (Prabhu & Frangogiannis, 2016).

### ***Fase reparativa y proliferativa***

Consiste en la inhibición y resolución de la fase inflamatoria. Este proceso es dependiente de la secreción de mediadores anti-inflamatorios (IL-10, TGF- $\beta$  y mediadores lipídicos pro-resolutivos, entre otros) (Brennan *et al.*, 2021), que entorpecen la migración y entrada de neutrófilos, así como también, favorecen su apoptosis y fagocitosis por los macrófagos. En esta fase, los monocitos y macrófagos cumplen un papel fundamental al secretar metaloproteinasas y catepsinas para la degradación de la matriz extracelular. Las células vasculares responden con una regulación al alza del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que será de vital importancia para la neovascularización de la zona infartada (Zou *et al.*, 2019). De igual forma, esta fase es caracterizada por la expansión de fibroblastos cardiacos y su transdiferenciación hacia miofibroblastos sintetizadores de colágeno, en un proceso mediado por TGF- $\beta$  (Vallée & Lecarpentier, 2019).

### ***2. Fase de maduración***

Por último, la fase proliferativa es seguida por la maduración de la cicatriz formada durante la secreción de fibras de colágeno por los miofibroblastos. En esta etapa, la nueva matriz extracelular forma entrecruzamientos y las células reparativas son inactivadas. Los mecanismos moleculares implicados en la quiescencia de los miofibroblastos son desconocidos aún a la fecha, sin embargo, evidencia sugiere que la proteína-10 inducible por IFN- $\gamma$  (IP-10) inhibe la migración de miofibroblastos y contribuye a la contención de la respuesta fibrótica en la zona infartada (Dobaczewski *et al.*, 2006).

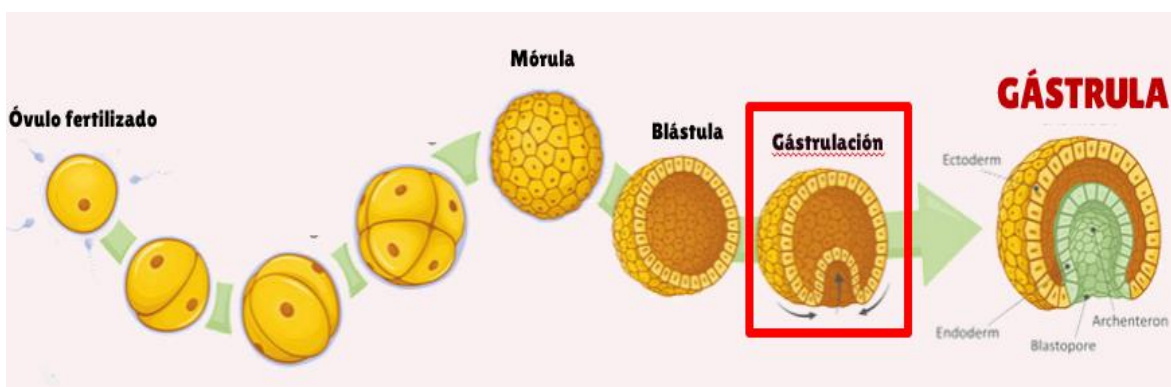


**Ilustración 2. Progresión de la cardiopatía isquémica.** Adaptada de "Fundamentos de la terapia celular para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares: no hay una célula adecuada para todo", (Taylor & Robertson, 2009).

En este contexto, dentro de la progresión de la cardiopatía (**Ilustración 2**), una respuesta fibrótica hiperactiva provoca una remodelación excesiva, de forma tal que el IAM es también la causa más frecuente de falla cardíaca (Castillo & Sánchez, 2017). El tejido dañado, al ser reemplazado por tejido fibrótico, induce cambios geométricos, biomecánicos y bioquímicos en el corazón. Inicialmente, este proceso es crucial para prevenir la ruptura de la pared ventricular en el periodo postinfarto, sin embargo, una respuesta fibrótica exagerada conlleva efectos perjudiciales, al conducir a la pérdida progresiva de la función cardiovascular y con ello, a una falla cardíaca establecida (Talman & Ruskoaho, 2016).

## 1.2. Cardiogénesis y programación fetal cardíaca

La cardiogénesis tiene su origen en la formación del mesodermo durante la gastrulación (**Ilustración 3**). En el desarrollo embrionario, el factor de transcripción *MESP1* es considerado como el principal regulador del destino cardíaco, al conducir hacia la diferenciación de cardiomiocitos a través de la inhibición dependiente de DKK-1 de la vía WNT. Una vez que el mesodermo cardiogénico se ha especificado, la vía canónica de WNT regula el mantenimiento de las células progenitoras cardíacas, mientras que la vía NOTCH su diferenciación. Más aún, la inducción de *MESP1* permite la regulación positiva de varios factores de transcripción, involucrados en el desarrollo cardíaco (**Ilustración 4**), incluidos *TBX5*, *NKX2*, *MEF2c*, *GATA4*, *HAND2*, *MYOCD* e *ISL1*, entre otros (Burridge *et al.*, 2012).



**Ilustración 3.** La cardiogénesis tiene su origen en la gastrulación. Adaptada de: "Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation" (Zhai *et al.*, 2021).

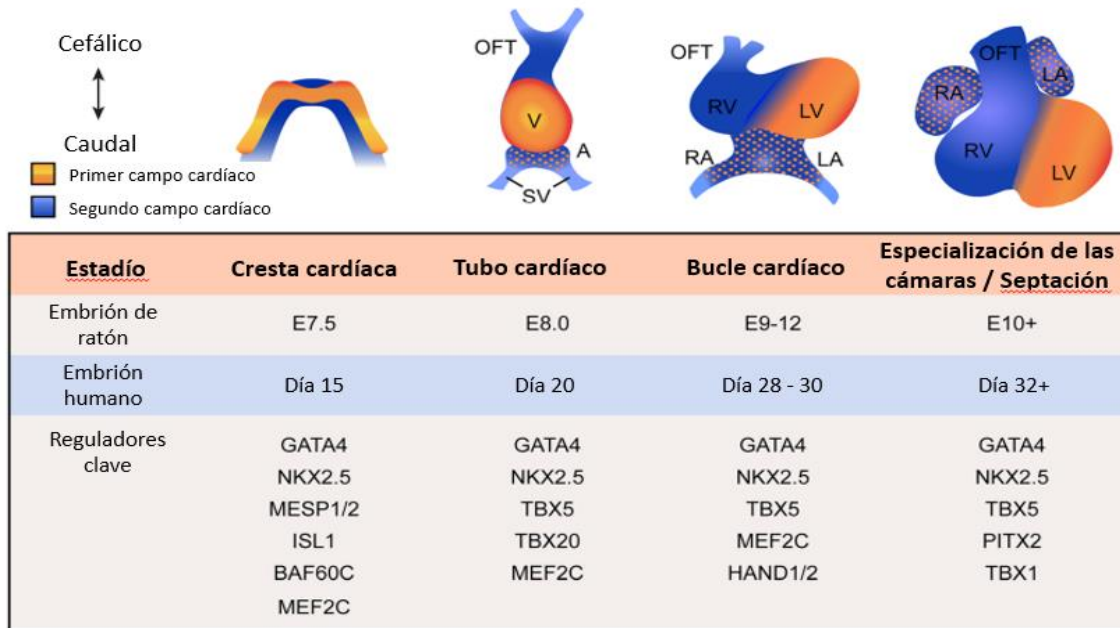


Ilustración 4. Descripción general del desarrollo del corazón. Adaptada de "Regulación molecular de la diferenciación de cardiomiocitos" ((Paige et al., 2015). LA indica aurícula izquierda; VI, ventrículo izquierdo; OFT, tracto de salida; RA, aurícula derecha; RV, ventrículo derecho; y SV, seno venoso.

Una característica destacable del metabolismo cardíaco fetal es el uso predominante de carbohidratos para la producción de energía. En el período perinatal, este sistema es rápidamente reemplazado por la oxidación de ácidos grasos como sustrato energético. Esto se ve acompañado por la expresión de isoformas "adultas" de proteínas cardíacas. No obstante, en el corazón posnatal, existen condiciones patológicas (incluyendo hipoxia, isquemia, hipertrofia y diabetes) en las que ocurre un cambio en la expresión génica hacia un fenotipo embrionario, retornando así a la programación cardíaca fetal. Los cambios moleculares observados durante el proceso de hipertrofia patológica se asemejan a los observados durante el desarrollo cardíaco fetal y, por lo tanto, la hipertrofia cardíaca se describe a menudo como acompañada de la reactivación de un "programa de genes fetales".

Durante la última década, la evidencia sugiere que algunos miembros de la familia de **factores de transcripción Krüppel-like** podrían desempeñar un papel fundamental en la regulación de genes cardíacos. Específicamente, dos factores clave, los factores Krüppel-like 15 y 4 (KLF-15 y KLF-4), parecen funcionar de forma independiente para habilitar los mecanismos represores de la hipertrofia y la expresión génica "fetal", e inducir la maduración

de los cardiomiocitos (Pollak *et al.*, 2018). Como ejemplo, se sabe que el factor KLF-15 reprime directamente MEF2C y GATA4, así como también, se une a la región básica de la miocardina para dificultar la asociación de SRF, lo que da como resultado una expresión reducida de  $\alpha$ -actina esquelética (Zhou & Herring, 2005).

### **1.3. Factores Krüppel-like: Definición**

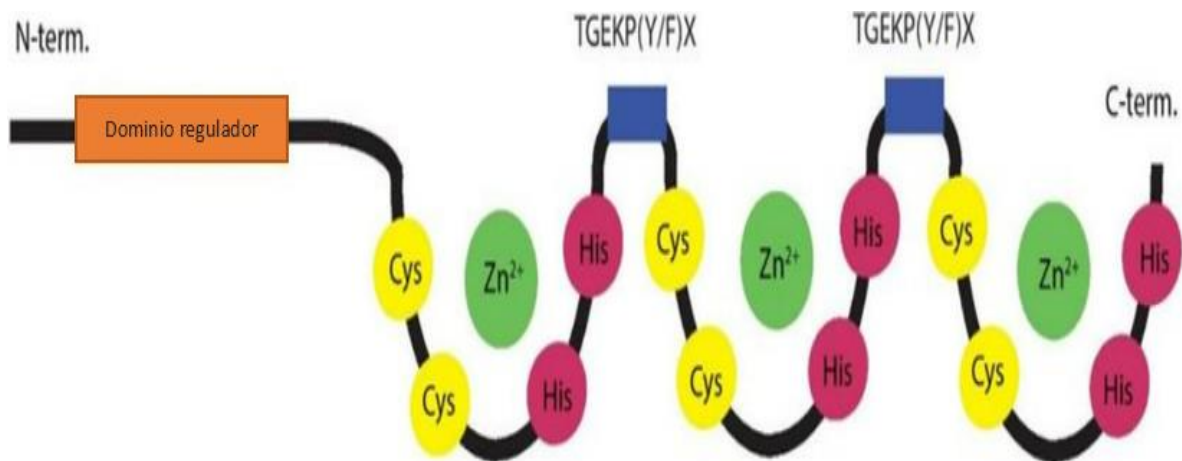
Los factores de transcripción conocidos como KLFs son un grupo de proteínas que desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica. Estas proteínas, pertenecientes a la familia de factores de transcripción con dedos de zinc, se caracterizan por su capacidad de unirse al ADN y modular la transcripción de los genes (Zakeri *et al.*, 2022). El nombre "KLFs" se deriva de su similitud con la proteína Krüppel, que se encuentra en la especie de mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. La proteína Krüppel, es conocida por su traducción alemana "lisiado", ya que al estar mutada condiciona a malformaciones significativas en el tórax y (Rane *et al.*, 2019), pertenece a la clase de genes gap y desempeña un papel esencial en el proceso de segmentación del tórax y el abdomen anterior durante el desarrollo embrionario de *Drosophila* (Schuh *et al.*, 1986). Cabe destacar En organismos eucariotas, los KLFs son importantes reguladores de la transcripción génica, capaces de activar o reprimir la expresión de genes involucrados en procesos tan diversos como crecimiento, diferenciación y muerte celular, así como también, el desarrollo y conservación de tejidos especializados (Tetreault *et al.*, 2013).

#### **1.3.1. Estructura y Función**

Hasta la fecha, se han identificado 17 KLF en el genoma humano, excluyendo el gen putativo KLF-18 que, debido a su proximidad cromosómica con KLF-17, se cree que aparece como una duplicación de este último (Pei & Grishin, 2013).

En general, los KLF se definen por tres dominios de dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> carboxilo terminales bien conservados en los que cada átomo de zinc está coordinado por dos cisteínas en un extremo de una hoja  $\beta$  y dos histidinas en una porción de hélice  $\alpha$  C-terminal, favoreciendo





**Ilustración 5.** Adaptada de “Krüppel-like transcription factors: a functional family” (Pearson *et al.*, 2009)

una estructura tetraédrica que permite plegarse en una configuración de proteína  $\beta\beta\alpha$  (Brayer & Segal, 2008; Swamynathan, 2010) (**Ilustración 5**). Estos dominios se encuentran muy conservados en toda la familia y se adhieren a la secuencia de consenso C-X2-5-C-X3-(F/Y)-X5- $\psi$ -X2-H-X3-5-H, donde X representa cualquier aminoácido y  $\psi$  es un residuo hidrofóbico (Wolfe *et al.*, 2000). Además, se puede encontrar un espaciador de siete aminoácidos TGEKP(Y/F)X entre cada dedo (Pearson *et al.*, 2008). Los primeros dos dedos de zinc tienen 25 aminoácidos cada uno, mientras que el tercero tiene solo 23 (McConnell & Yang, 2010). Cada motivo de dedo de zinc es capaz de unirse a tres pares de bases en regiones ricas en GC, incluidas varias secuencias de consenso (elementos CACCC-, GC-, GT-box) ubicadas en promotores de genes diana (Oishi & Manabe, 2018). El dominio amino terminal de los factores de transcripción KLFs exhibe una notable variabilidad en su organización, presentando una diversidad de dominios de unión que pueden ejercer tanto funciones represivas como activadoras. Asimismo, se ha observado la presencia de una señal de localización nuclear (NLS) en proximidad o incluso dentro de los dedos de zinc de estos factores de transcripción (Kaczynski *et al.*, 2003). Estas características estructurales y funcionales del dominio amino terminal de los KLFs son de gran relevancia en la comprensión de su papel en la regulación génica y en la interacción con otros componentes del núcleo celular.

### 1.3.2. Clasificación Filogenética

Debido a sus similitudes estructurales y dominios de unión, los KLF se pueden subdividir en tres grupos filogenéticos (**Ilustración 6**):

- **Grupo 1:** Incluye KLF-3, KLF-8 y KLF-12. Estos factores desempeñan un papel crucial en la represión de la expresión génica al interactuar con la proteína CtBP a través de su dominio C-terminal (Chinnadurai, 2007). Una vez establecida la unión entre los KLFs y CtBP, se desencadena un proceso de correpresión que depende de la actividad de HDAC (histona desacetilasa), lo que conduce a una mayor compactación de la estructura del ADN debido al estrechamiento de las histonas asociadas al gen diana. Estos hallazgos fueron confirmados por Turner y Crossley, quienes demostraron que mutaciones en el motivo de unión de CtBP en el factor de transcripción KLF-3 resultaron en una pérdida de capacidad para reprimir la expresión génica en células SL2 (Turner & Crossley, 1998). Además de la represión mediada por HDAC, también se ha postulado la existencia de un mecanismo de represión génica independiente de HDAC, en el cual CtBP recluta el complejo de proteínas asociadas a PcG (polycomb group) (Chinnadurai, 2002).
- **Grupo 2:** Incluye KLF-1, KLF-2, KLF-4, KLF-5, KLF-6 y KLF-7. Su mecanismo de acción principal implica el reclutamiento de factores de actividad de acetiltransferasa, como CBP, p300 y P/CAF, lo que conduce a la remodelación de la cromatina y en última instancia, a la activación de la transcripción génica (McConnell & Yang, 2010). Sin embargo, KLF-2 y KLF-4 también poseen dominios con función represora adyacentes a sus dominios de activación (Kawata *et al.*, 2022).
- **Grupo 3:** Incluye KLF-9, KLF-10, KLF-11, KLF-13, KLF-14 y KLF-16, quienes funcionan como represores transcripcionales a través de su unión a SinA3 (Memon & Lee, 2018). Esta interacción es posible gracias a la presencia de una secuencia de consenso hidrófoba en los dominios N-terminales de los factores KLF. Esta secuencia, conocida como motivo  $\alpha$ -helicoidal conservado AA/VXXL, facilita la unión al dominio de hélice anfipática emparejado de SinA3. A su vez, SinA3 actúa como un andamio para reclutar otros modificadores de la cromatina, como HDAC1, HDAC2, Mad, Ume6, MeCP2, N-CoR e Ikaros, lo que contribuye a la represión de la expresión génica (McConnell & Yang, 2010).

Finalmente, KLF-15, KLF-17 y KLF-18 aún no se han incorporado a ninguno de estos grupos filogenéticos, ya que sus dominios de interacción aún no se han determinado, pero se ha reportado expresión tisular en hueso, riñón y testículo.

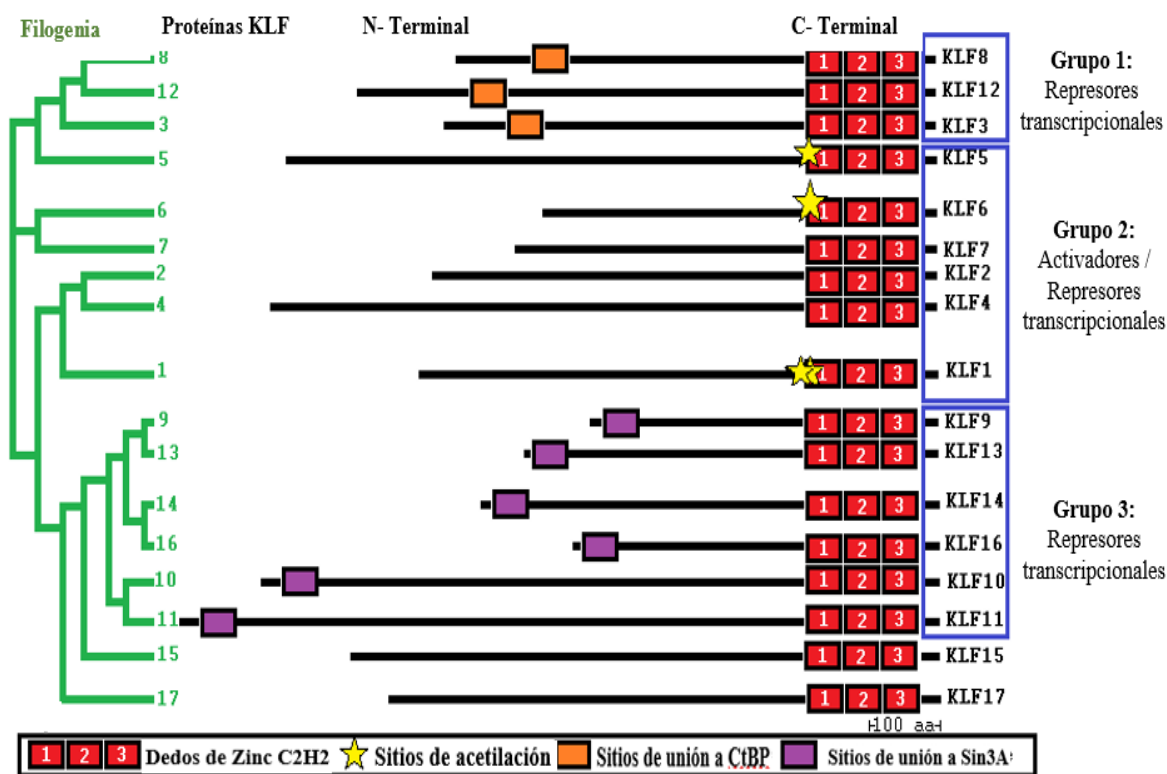


Ilustración 6. Árbol filogenético de los factores de transcripción Krüppel-like. Adaptado de "Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases" (McConell & Yang, 2010).

Los KLF como familia se pueden encontrar en varios sistemas de órganos, a saber, el sistema hematopoyético, gastrointestinal, respiratorio, nervioso, inmunológico y cardiovascular (Chang *et al.*, 2017a). Por ejemplo, los KLF con un patrón de expresión ubicuo son los KLF 6, 7, 8, 9, 10 y 11, mientras que otros con una expresión más restringida son KLF-1, que está presente en eritroides y mastocitos, y KLF-2, que está involucrado en el desarrollo de pulmones y vasos. En particular, KLF-1 y KLF-2 son fundamentales en la eritropoyesis embrionaria, ya que regulan genes involucrados en la proliferación celular y el control del

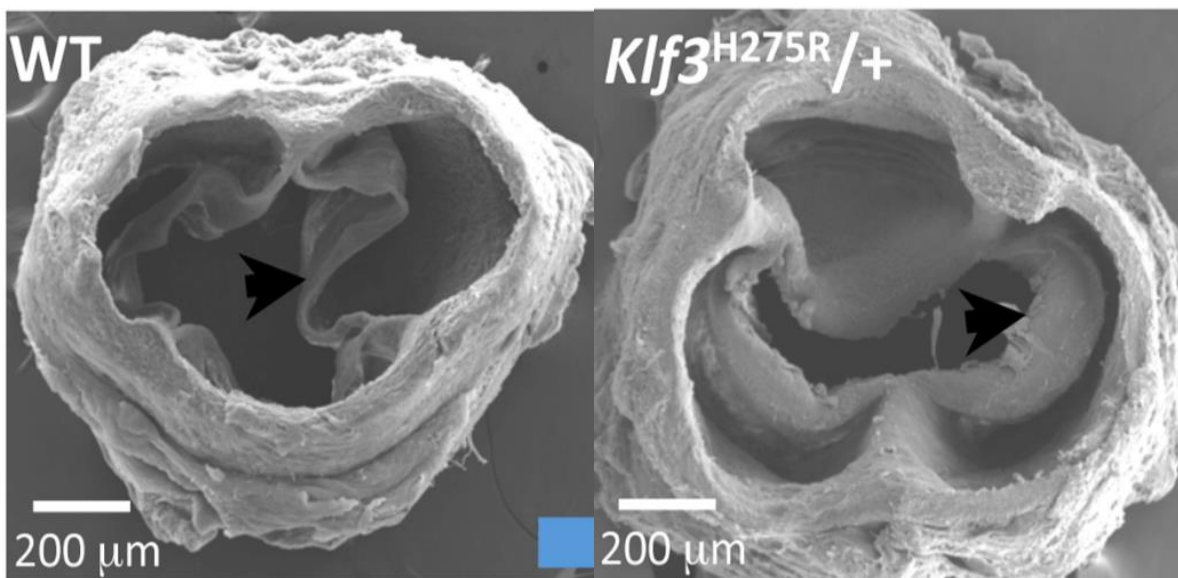
ciclo celular, como FoxM1, Sphk1, Pthr y CD24a, promoviendo así la maduración de los precursores eritroides (Vinjamur *et al.*, 2014). En cuanto al corazón, se comienza a dilucidar la expresión y función de estos KLF. A continuación, se describirán sus funciones cardíacas tanto fisiológicas como patológicas, comenzando desde la cardiogénesis.

### **1.3.3 KLFs y su involucramiento en el desarrollo embrionario del corazón**

Los factores de transcripción pertenecientes a la familia KLF han adquirido amplio reconocimiento debido a su papel primordial en el proceso de cardiogénesis, desde las etapas más tempranas del desarrollo embrionario. Entre estos factores destaca KLF-13, cuya relevancia radica en su contribución significativa a la activación de dos factores de transcripción cardíacos fundamentales, GATA-4 y TBX-5, los cuales se expresan de manera prominente en el endocardio y el miocardio durante el desarrollo embrionario. Análisis exhaustivos en corazones murinos han permitido identificar la aparición temprana de KLF-13 en el día embrionario 9.5, manifestándose principalmente en el miocardio auricular en desarrollo, las trabéculas ventriculares, el septo interventricular, las válvulas atrioventriculares y el tronco arterioso. Sin embargo, su presencia experimenta una disminución posterior en el corazón posnatal. Los estudios en ratones knockout de KLF-13 han evidenciado la presencia de hipotrabeculación ventricular, anomalías en el septo auricular y un retraso en la formación de los cojinetes auriculoventriculares, tal como fue reportado por Lavallée *et al.* en 2006 (Lavallée *et al.*, 2006).

Otro miembro crucial de la familia KLF durante el desarrollo embrionario es KLF-15, cuyo desempeño ha sido establecido en la regulación de la expresión de factores de transcripción, como GATA-4 y MEF2C, ambos esenciales para el desarrollo cardíaco (Leenders *et al.*, 2010). KLF-15 establece interacciones con estos factores para reprimir la expresión de un conjunto de genes cardíacos involucrados en el crecimiento del corazón. Dentro de este conjunto se incluyen los genes que codifican las cadenas pesadas de miosina, elementos esenciales para la contracción del músculo cardíaco y marcadores críticos del desarrollo cardíaco, así como Nppa, responsable de la producción del péptido natriurético atrial (ANP), una hormona sintetizada por el corazón encargada de regular la presión arterial y el equilibrio de líquidos. Por consiguiente, se considera a KLF-15 como un factor inhibidor de la

hipertrofia cardíaca, en contraste con las características observadas en KLF-13. El proceso de desarrollo cardíaco depende de respuestas hemodinámicas esenciales generadas por la fuerza de cizallamiento del flujo sanguíneo. Se ha constatado que las mutaciones presentes en el gen KLF-2, el cual responde a dicho flujo, pueden ocasionar una relocalización incorrecta de la proteína N-cadherina desde la superficie lateral hacia la apical de los cardiomiocitos, conduciendo a un fenotipo de extrusión abluminal. Se postula que este fenotipo se produce mediante la inhibición de la vía de señalización del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), proporcionando así nuevos conocimientos sobre la preservación de la integridad de la pared miocárdica mediada por KLF-2 (Rasouli *et al.*, 2018). Cabe destacar que la función de KLF-2 se extiende hacia la maduración de las valvas cardíacas, donde activa señales paracrinas de Wnt9b que son fundamentales para suprimir la proliferación de las células mesenquimales y promover su condensación en el subendocardio, lo cual culmina en la transformación de un cojín celular en una válvula madura (Goddard *et al.*, 2017). Además de KLF-2, se ha vinculado a otros miembros de la familia KLF con el desarrollo valvular. Por ejemplo, investigaciones previas han evidenciado que mutaciones en KLF-3 están asociadas con la estenosis de la válvula aórtica, así como con hipertrofia biventricular y una disminución en el tamaño de las cámaras cardíacas (**Ilustración 7**). Este hallazgo adquiere una notable relevancia considerando que previamente no se le había atribuido una función cardíaca a KLF-3 (Kelsey *et al.*, 2013).



*Ilustración 7. Engrosamiento valvular atribuido a mutación en KLF-3. Recuperado de Kelsey, L. et al. (2013).*

### 1.3.4 KLFs en el metabolismo energético del corazón

La familia de factores de transcripción KLF ha sido previamente vinculada al metabolismo y la bioenergética del corazón. En condiciones normales, el corazón satisface sus altas demandas energéticas principalmente mediante la oxidación de ácidos grasos (70%), mientras que la glucosa y otros sustratos como el lactato y los cuerpos cetónicos tienen un papel secundario (30%) (Lopaschuk *et al.*, 2010). Sin embargo, el corazón exhibe una notable plasticidad metabólica que le permite adaptarse a situaciones de aumento en los requerimientos energéticos o escasez de carbohidratos, modificando la proporción de energía obtenida a través de la oxidación de ácidos grasos. En este contexto, KLF-15 desempeña un papel crítico como regulador del metabolismo lipídico en el corazón. Mediante su interacción con la enzima acetiltransferasa p300, KLF-15 induce cambios en la estructura de la cromatina y activa genes metabólicos clave implicados en el transporte, activación y descomposición de lípidos, así como en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y la función peroxisomal (Prosdocimo *et al.*, 2014).

De manera similar, se ha descubierto que KLF-5 desempeña una función crucial en la regulación de la producción de energía en el tejido cardíaco. Este factor de transcripción ejerce un papel crítico en la regulación del gen PPAR $\alpha$ , implicado en el metabolismo de los ácidos grasos. Estudios realizados por Drosatos *et al.* han demostrado que KLF-5 actúa como un regulador positivo de PPAR $\alpha$  en el corazón y que su inhibición conduce a disfunción cardíaca al reducir la expresión de diversos genes relacionados con la oxidación de ácidos grasos, como PPAR coactivador 1a (Pgc1a), acil-CoA oxidasa (Acox) y carnitina palmitoiltransferasa 1b (Cpt1b). Además, se ha observado una correlación entre los cambios en la expresión de KLF-5 y los niveles de expresión de PPAR $\alpha$  en casos de diabetes. Estos hallazgos resaltan la importancia de KLF-5 en el mantenimiento de una función cardíaca adecuada y sugieren que KLF-5 podría representar un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento de diferentes formas de disfunción cardíaca asociadas con alteraciones en PPAR $\alpha$  y deficiencia energética (Drosatos *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha investigado el papel de KLF-15 en la homeostasis de la glucosa, revelando su participación vital en la regulación del transportador de glucosa GLUT-4, el cual es sensible a la insulina y se encuentra presente en el tejido muscular y adiposo. Estudios

realizados por Gray *et al.* han demostrado que la sobreexpresión de KLF-15 induce la expresión de GLUT-4, generando un incremento funcional en la captación de glucosa tanto en condiciones basales como en respuesta a la insulina (Gray *et al.*, 2002). En el caso del tejido cardíaco, se ha establecido que, durante estados fisiológicos y patológicos como el ejercicio o la hipertrofia, el corazón depende cada vez más del metabolismo de la glucosa como fuente de energía (Tran & Wang, 2019).

Además, se ha descubierto que KLF-15 está involucrado en la regulación del ciclo circadiano. La ausencia de KLF-15 conlleva alteraciones en el ritmo circadiano de varios genes, ya que se ha observado que KLF-15 regula genes relacionados con el catabolismo de lípidos y aminoácidos, los cuales desempeñan un papel crucial en la generación de ATP durante la fase activa del ciclo circadiano. Asimismo, KLF-15 controla la expresión diurna de Kv channel interacting protein 2 (KChIP2), una proteína esencial para la generación de corrientes de potasio en el corazón. La falta de KLF-15 interrumpe la variación diurna en la repolarización cardíaca, aumentando el riesgo de arritmias ventriculares. En resumen, KLF-15 emerge como un regulador clave de eventos fisiológicos y patológicos dependientes del tiempo en el corazón, incluyendo la frecuencia cardíaca, la presión arterial, las arritmias, la muerte súbita cardíaca y el infarto de miocardio (Oishi & Manabe, 2018).

### **1.3.5 KLFs en enfermedades cardiovasculares**

Las enfermedades cardiovasculares (CVD) son la principal causa de muerte a nivel mundial, afectando los vasos sanguíneos y el corazón en diferentes niveles. Las CVD son diversas y abarcan varias condiciones, siendo la enfermedad coronaria, el accidente cerebrovascular y la insuficiencia cardíaca las causas más comunes de morbilidad y mortalidad a nivel global (Santoyo-Suarez *et al.*, 2023). La etiología de las CVD es compleja y aún no se comprende completamente, sin embargo, enfoques recientes han destacado el papel de la familia KLF en numerosos mecanismos relacionados con estas enfermedades. En la siguiente sección nos centraremos en describir la participación de las proteínas KLF en la enfermedad de las arterias coronarias, la aterosclerosis y la remodelación cardíaca asociada a la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca.

### 1.3.5.1 Enfermedad Arterial Coronaria y Aterosclerosis

La enfermedad de las arterias coronarias (CAD), una afección cardiovascular, se caracteriza por la progresiva estrechez del lumen arterial, lo que resulta en una reducción del flujo sanguíneo al miocardio (Malakar *et al.*, 2019). La aterosclerosis es la principal causa subyacente de la CAD, un proceso patológico en el cual se acumula colesterol LDL oxidado en las paredes arteriales, estimulando así la formación de células espumosas a partir de la diferenciación de macrófagos y la acumulación de leucocitos, lo que conduce a la formación de placas ateroscleróticas que obstruyen el lumen arterial (**Ilustración 8**) (Pedro-Botet *et al.*, 2020).

La turbulencia del flujo sanguíneo a través de estas obstrucciones desencadena daño endotelial, lo que resulta en disfunción endotelial. La presencia de flujo sanguíneo turbulento en un vaso parcialmente obstruido (o incluso las variaciones normales en el curso de los vasos sanguíneos, como se observa en las bifurcaciones arteriales) provoca la lesión del endotelio debido a las fuerzas de cizallamiento (Baynes & Dominiczak, 2019).

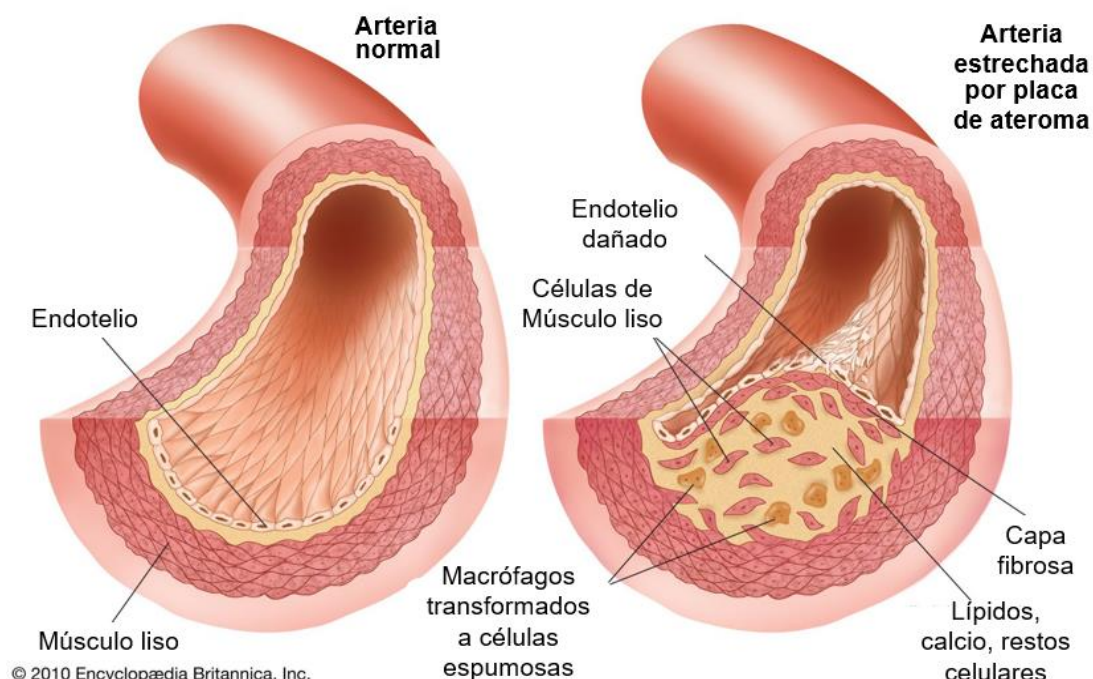


Ilustración 8. Aterosclerosis. Arteria normal comparada con arteria afectada por aterosclerosis. Modificada de Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, March 29). atherosclerosis. Encyclopaedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/atherosclerosis>



El patrón de flujo sanguíneo tiene un papel importante en la homeostasis de los vasos sanguíneos, ya que la mecanotransducción de fuerzas laminares y de cizallamiento es necesaria para la activación de varias vías de señalización de células endoteliales (EC) (Baeyens *et al.*, 2016). KLF-2 se ha asociado a áreas de flujo sanguíneo laminar, en las que este último protege las paredes arteriales de la aterosclerosis al inducir un fenotipo protector en las células endoteliales. En regiones de bajo estrés de cizallamiento, se activa un complejo mecanosensorial compuesto por molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias (PECAM-1), cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) y receptor de crecimiento endotelial vascular 2/3 (VEGFR2/3). Estos factores activan la vía MEK2/ERK2 para regular al alza el factor potenciador de miocitos-2 (MEF2) y, por lo tanto, permiten la actividad transcripcional de KLF-2 (Chang *et al.*, 2017b). KLF-2 luego ejerce un efecto ateroprotector ya que regula a la baja la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y la E-selectina, moléculas que apoyan la migración y adhesión de leucocitos (Galkina & Ley, 2007). En este sentido, el ácido suberanilohidroxámico se ha identificado recientemente como un potente inductor farmacológico de KLF-2, capaz de reprimir la inflamación vascular y la aterosclerosis (Xu *et al.*, 2017)

Uno de los cambios cruciales en la progresión de la aterosclerosis es la transición de las células del músculo liso vascular (VSMC) de un fenotipo contráctil a uno proliferativo, con una mayor secreción de matriz extracelular, lo que lleva al engrosamiento de la capa íntima arterial (Gomez & Owens, 2012). Ante esta preocupación, la evidencia sugiere que KLF-5 puede desempeñar un papel en la promoción de este cambio fenotípico, ya que se encontró que la expresión de KLF-5 aumentó en las placas ateroscleróticas en comparación con el tejido aórtico humano normal.

KLF-4 no se expresa constitutivamente en VSMC, aunque puede inducirse transitoriamente después de una lesión vascular (Ghaleb & Yang, 2017). Después de la ligadura de la carótida, KLF-4 se activa rápidamente en las VSMC, lo que inhibe la expresión de los genes marcadores de diferenciación de las VSMC (SM-22 y  $\alpha$ -SMA). Se ha demostrado que KLF-4 bloquea estos marcadores durante la unión de las regiones promotoras que contienen el elemento de control de TGF- $\beta$  en SM-22 y  $\alpha$ -SMA (Adam *et al.*, 2000). Por el contrario, no se encontró unión de KLF-4 en carótidas no lesionadas. Además, en otro estudio, ratones

KLF-4 KO exhibieron una mayor proliferación de neoíntima después de una lesión vascular, lo que contribuyó a la reducción de la luz arterial. Estos resultados sugieren que KLF-4 ofrece un papel como regulador negativo de la formación de neoíntima (Yoshida *et al.*, 2008). Este efecto también se puede observar en células endoteliales no vasculares, en las que, aunque KLF-4 no afecta a los marcadores de diferenciación de SMC, regula a la baja la expresión de VCAM1 inducida por TNF- $\alpha$  al bloquear el sitio de unión de NF- $\kappa$ B al promotor de VCAM1. La expresión de moléculas de adhesión promueve la acumulación de células inflamatorias, que de manera similar contribuyen a la formación de neoíntima (Yoshida *et al.*, 2014).

La aterosclerosis y las fuerzas de cizallamiento asociadas a ella conducen a la ruptura de la placa, provocando trombosis o embolia vascular, dando lugar así a la aparición de cardiopatía isquémica en cualquiera de sus dos formas clínicas principales: angina o infarto agudo de miocardio (IAM) (Pedro-Botet *et al.*, 2020).

### **1.3.5.2 Infarto al miocardio y remodelación cardíaca**

El infarto de miocardio (IM) es la manifestación clínica principal y más grave de la cardiopatía isquémica. El IM consiste en la obstrucción brusca del flujo sanguíneo en las principales ramas de las arterias coronarias, que conduce a la isquemia de los cardiomiocitos (López *et al.*, 2017). Si no se restablece el aporte sanguíneo, el tejido miocárdico afectado sufrirá una disminución del aporte de oxígeno (hipoxia), pasando a un estado de anoxia y finalmente de necrosis tisular. Estas condiciones patológicas promueven una transición en la expresión génica hacia un fenotipo embrionario, regresando así a la programación cardíaca fetal (Dirkx *et al.*, 2013).

Esto se evaluó en un estudio en el que ocho pacientes fueron tratados con oclusión intermitente del seno coronario controlada por presión (PISCO), encontrando factores de transcripción morfogénicos cardíacos (GATA4, MEF2C, TBX5 y HAND2) en muestras de sangre. Luego, los sueros se cocultivaron con fibroblastos humanos y cardiomiocitos, y se encontró una regulación positiva en KLF-4 como resultado de los factores solubles liberados (Mohl *et al.*, 2018). Se ha demostrado que KLF-4 promueve la diferenciación de miofibroblastos cardíacos y la síntesis de colágeno en la fibrosis cardíaca inducida por

angiotensina II, a través de su unión al promotor TGF- $\beta$ 1. Esta interacción activa la vía TGF- $\beta$ 1/Smad3, aumentando la expresión de actina del músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA), un biomarcador de miofibroblastos, y la secreción de colágeno tipo I y tipo III, lo que contribuye a la inducción de un fenotipo proliferativo en los cardiomiocitos (Zhang *et al*, 2013).

El infarto de miocardio y sus alteraciones asociadas son la primera causa de insuficiencia cardíaca, condición de mal pronóstico, para la que el tratamiento de elección sigue siendo el trasplante cardíaco (Jencka, 2021). Dentro de la progresión de la cardiopatía isquémica, el músculo dañado, al ser reemplazado por tejido fibrótico, induce cambios geométricos, biomecánicos y bioquímicos en el corazón. Inicialmente, este proceso es crucial para prevenir la ruptura de la pared ventricular en el período posterior al infarto, sin embargo, una respuesta fibrótica exagerada tiene efectos perjudiciales, lo que lleva a una remodelación cardíaca y una pérdida progresiva de la función cardiovascular y, por lo tanto, a insuficiencia cardíaca establecida (Talman *et al.* al, 2016).

KLF-5 se ha identificado previamente como un factor prohipertrófico aumentado tanto en pacientes con insuficiencia cardíaca terminal como en ratones con miocardiopatía isquémica. Se desconocen los mecanismos exactos en los que KLF-5 es capaz de inducir la hipertrofia cardíaca, sin embargo, en un estudio realizado por Hoffman *et al*, se confirmó que, en ratones sometidos a ligadura de la arteria coronaria izquierda, KLF-5 sufrió un aumento de 2 veces en expresión a las 24 horas, y 4 veces a las 2 y 4 semanas. Esta regulación positiva de KLF-5 estuvo acompañada por una reducción en el acortamiento fraccional y la expansión de las dimensiones sistólica y diastólica final. Además, al utilizar el inhibidor farmacológico de KLF-5, ML264, se observó una mejoría de los parámetros ecocardiográficos, como la fracción de eyección, así como una reducción del volumen telediastólico y sistólico, ejerciendo un efecto protector frente a la miocardiopatía isquémica (Hoffman *et al.* al, 2021). Además, un grupo de investigación relacionado demostró que KLF-5 puede regular la expresión de PPAR- $\alpha$  y, por lo tanto, modificar la oxidación de ácidos grasos (FAO). El corazón depende de la FAO para producir  $\approx 70\%$  de su ATP y satisfacer sus demandas energéticas (Stanley *et al*, 2005), este proceso depende transcripcionalmente de PPAR- $\alpha$ , que puede ser activado por KLF-5 a través de unión directa al promotor (Drosatos *et al*, 2016; Pol *et al*, 2015). La ablación específica de miocitos cardíacos de KLF-5 resultó en una

disminución de PPAR- $\alpha$ , FAO, niveles de ATP cardíaco y acumulación de triacilglicerol (Drosatos *et al*, 2016). Curiosamente, a pesar de que se suprimió KLF-5, el modelo experimental también desarrolló signos de miocardiopatía dilatada, como la reducción del acortamiento fraccional y el aumento de las dimensiones internas del ventrículo izquierdo, lo que demuestra que una acumulación excesiva de lípidos en el corazón puede conducir a dilatación miocardiopatía (Park *et al*, 2008). Aunque en este estudio se sugirió que la miocardiopatía se desarrollaba de manera independiente a KLF, la evidencia reciente muestra un vínculo entre KLF-5 y la biosíntesis de ceramida. KLF-5 ha sido propuesto como un regulador transcripcional directo de SPTLC1 y SPTLC2 (subunidad 1 y 2 de base de cadena larga de serina palmitoiltransferasa [SPT], respectivamente), enzimas involucradas en el paso limitante de la velocidad de la síntesis de la ruta de novo de las ceramidas, produciendo ceramidas a partir de serina y palmitoil coenzima A (Hoffman *et al*, 2022; Park *et al*, 2008). Además, en el tema de la miocardiopatía diabética (DbCM), KLF-5 se ha relacionado con el estrés oxidativo a través de la regulación positiva de NADPH oxidasa 4 (NOX4), al unirse directamente al promotor de NADPH oxidasa 4 e inducir la expresión de NOX4 y conducir a la acumulación de superóxido de cardiomiocitos, disminución de la abundancia mitocondrial y un cambio en el perfil del lipidoma cardíaco hacia un ambiente rico en ceramidas, por lo tanto, contribuyendo a la fisiopatología de DbCM (Kyriazis, *et al.*, 2021).

### 1.3.5.3 Cardiopatías congénitas

Existe escasa información que relaciona a los KLFs con defectos de desarrollo. El **síndrome de Holt-Oram**, una enfermedad autosómica dominante caracterizada por defectos en las extremidades superiores, malformaciones cardíacas congénitas y enfermedades de la conducción eléctrica del corazón, se ha asociado típicamente a mutaciones en TBX5, un miembro de la familia de factores de transcripción T-box; sin embargo, nueva evidencia muestra que KLF-13 puede jugar un papel patogénico ya que ha sido identificado como un modificador genético de TBX5 (McDermott *et al*, 1993; Darwich *et al*, 2017). Estos dos genes se coexpresan en el miocardio de la almohadilla auriculoventricular, el tabique interauricular, el tabique interventricular y las trabéculas ventriculares en etapas tan tempranas como E11.5 en el desarrollo embrionario de ratones (Darwich *et al*, 2017). El

análisis de secuencias *in silico* mostró la conservación de los sitios de unión en el promotor Nppa para ambos genes, así como otros varios factores clave de transcripción cardiaca como Nppb, Vegfa y Nos3, todos ellos esenciales para el desarrollo del corazón. Para probar la existencia de interacción genética entre estos dos factores de transcripción en la morfogénesis del corazón, Darwich y cols. crearon un modelo de ratones heterocigotos dobles Tbx5 y Klf13, encontrando una relación significativamente menor de masa ventricular izquierda sobre peso corporal y defectos del tabique auricular en el 80 % de los ratones. Los patrones de expresión génica de los reguladores del desarrollo del corazón (Gata4, Mef2a, Erbb4, Vegfc y Myh7, entre otros) también se analizaron en heterocigotos Klf13 o Tbx5 fisiológicamente normales, así como en los dobles heterocigotos.

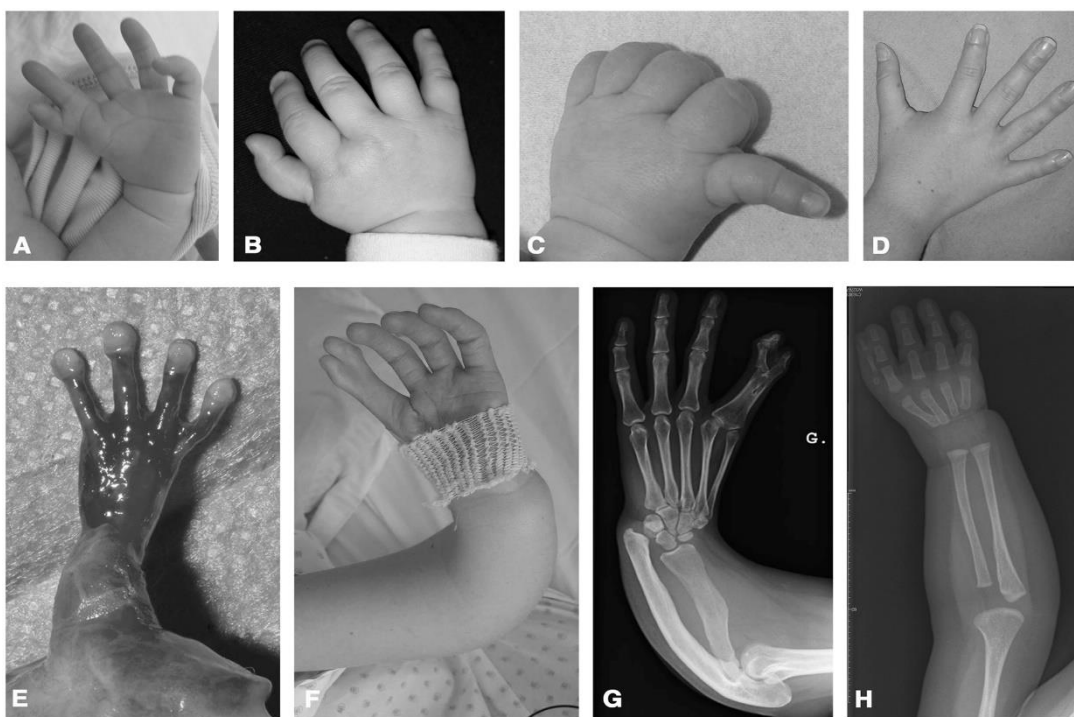


Ilustración 9. Malformaciones en extremidades superiores, encontradas en el Síndrome de Holt Oram. Recuperado de: "Holt-Oram syndrome: clinical and molecular description of 78 patients with TBX5 variants" (Vanlerberghe et al., 2019).

Los resultados mostraron una regulación al alza en heterocigotos Tbx5 o Klf13, pero similar a los niveles de control en los ratones heterocigotos dobles. Estos hallazgos sugieren un efecto compensatorio entre la pérdida de Klf13 o Tbx5, pero la incapacidad de activar estas

vías compensatorias cuando la disminución simultánea de ambos factores de transcripción (Darwich *et al*, 2017).

Además, en 2020, Li *et al* identificaron dos variantes de KLF-13 en pacientes con cardiopatías congénitas (CC). Se identificó una transversión de prolina en serina en la posición del aminoácido 163 (S156N) en un paciente con atresia de la válvula tricúspide, defectos del tabique ventricular y defectos del tabique auricular. Además, se encontró una transversión de serina en asparagina en la posición 156 (P163S) en una transposición de grandes arterias en un paciente de siete meses. Tanto S156N como P163S se ubicaron en la región de la Señal de localización nuclear 1 (NLS1), cerca del dominio de unión al ADN KLF-13. La expresión de la variante S156N fue notablemente más alta que la del tipo salvaje y tuvo una mayor actividad transcripcional al activar el promotor BNP, lo que sugiere que S156N es una mutación de ganancia de función. De lo contrario, con la variante P163S, que mostró una expresión similar en comparación con el tipo salvaje, pero con una actividad transcripcional más baja. La interacción física con TBX5 también se evaluó mediante coimmunoprecipitación. En este estudio, la variante P163S mostró una interacción física disminuida con la proteína TBX5. Por el contrario, S156N tenía una capacidad significativamente mayor para interactuar con TBX5. Aunque, los autores sugieren que la sobreexpresión de KLF-13 asociada a S156N podría estar acompañada de una mayor inestabilidad de la proteína, lo que resultaría en un fenotipo de pérdida de función (Li *et al*, 2020).

Resultados similares han sido descritos previamente por Lavallée y cols., donde identificaron KLF-13 como un modificador de GATA4, un factor de transcripción clave para los genes del péptido natriurético cardíaco NPPA y NPPB. En este estudio, KLF-13 Knockdown provocó defectos del tabique auricular, hipotrabeculación y miocardio hipoplásico en embriones de *Xenopus* (Lavallée *et al*, 2006). Mutaciones en GATA4 han sido reportadas previamente en pacientes con Tetralogía de Fallot, aunque aún no se ha establecido una relación directa entre KLF-13 y esta condición (Nemer *et al*, 2006).

Además, KLF-13 puede interactuar física y funcionalmente con GATA-6, un factor de transcripción que se expresa en las células del músculo liso y en los cardiomiocitos (Lavallée *et al*, 2006). Wang y colaboradores en 2020 informaron sobre una nueva variante de pérdida

de función de KLF-13, con activación reducida de los promotores GATA-6, GATA-4 y ANP. Esta mutación fue identificada en una familia china de tres generaciones, en la que cinco de los 18 miembros vivos de la familia tenían ventrículo derecho de doble salida y defectos del tabique ventricular (Wang *et al*, 2020). Otras variaciones en KLF-13 se han relacionado con defectos cardíacos congénitos, como el mutante Glu144\* KLF13 incapaz de transactivar los promotores del gen VEGF-a y ANP, asociado a conducto arterioso permeable y comunicación interventricular, así como válvula aórtica bicúspide (Abhinav *et al*, 2022).

Por último, KLF-4 se ha relacionado recientemente con el **síndrome de Marfan**, un trastorno hereditario común del tejido conectivo causado por mutaciones en el gen de la fibrilina-1, que se caracteriza por características físicas como aumento de la estatura, escoliosis, arnodactilia, dislocación del cristalino y trastornos cardiovasculares, incluida la mitral, prolapso de válvula y aneurisma aórtico que pueden desencadenar disección aórtica (Sponseller *et al*, 1995; Brown *et al*, 1975). Usando secuenciación unicelular, Pedroza y cols., identificaron KLF-4 como uno de varios genes de expresión enriquecidos en células de músculo liso que experimentan una modulación fenotípica hacia fibroblastos, en tejido de aneurisma aórtico de un modelo murino del síndrome de Marfan Fbn1C1041G/+ (Pedroza *et al*, 2020).

Con lo anteriormente expuesto, y considerando la escasa información existente sobre la mayoría de los KLF en la fisiopatología cardiovascular, el estudio de estos genes en el periodo de reparación tras IAM, es un área de oportunidad que pretendemos evaluar en un modelo murino de hipertrofia patológica similar a falla cardíaca postinfarto.

#### **1.4 Isoproterenol en la inducción de patologías cardiovasculares**

El isoproterenol, es el prototipo de fármaco agonista de receptores betaadrenérgicos. Se trata de una amina simpaticomimética sintética, estructuralmente relacionada con la adrenalina (Osborn, 2008). Sus efectos en el organismo incluyen aumento del gasto cardíaco, disminución de las resistencias vasculares periféricas y relajación del músculo liso bronquial e intestinal. Entre sus usos terapéuticos se encuentran bloqueos auriculoventriculares, paro

cardíaco, broncoespasmo y asma. Sin embargo, al tratarse de un agonista no selectivo, su uso en el entorno clínico ha ido disminuyendo, al ser reemplazado por drogas con mayor selectividad por receptores betaadrenérgicos individuales (Abel & Rorabaugh, 2007). No obstante, en el ámbito científico, el isoproterenol continúa siendo ampliamente utilizado para la inducción de patologías cardiovasculares. Además de lo ya descrito, el isoproterenol eal ser administrado, ejerce un efecto tanto cronotrópico como inotrópico positivo a nivel cardíaco, aumentando la velocidad y la fuerza de contracción del corazón. Esto puede inducir un desbalance en el consumo miocárdico de oxígeno, llevando a alteraciones como el infarto agudo al miocardio (Shapira-Schweitzer *et al.*, 2009). Estos efectos han motivado la utilización del isoproterenol en diversos modelos animales de daño cardiaco, con dosis variables (Grimm *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2018; Boarescu *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2020).

En lo concerniente a la realización de esta investigación, podemos destacar como antecedentes los siguientes modelos animales:

- **Grimm y cols., 1998.** “*Desarrollo de insuficiencia cardiaca tras la administración de isoproterenol en la rata: papel del sistema renina-angiotensina*”. Utilizando ratas de la cepa Sprague-Dawley, se probaron 6 dosis diferentes de isoproterenol: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mg/kg de peso corporal para determinar la dosis más eficaz que indujera un daño miocárdico significativo junto con una tasa de supervivencia aceptable. Se encontró que 150 mg/kg era la dosis óptima para lograr estos objetivos (Grimm *et al.*, 1998).
- **Liu y cols., 2018.** “*La curcumina alivia la hipertrofia cardíaca y la fibrosis inducida por isoproterenol a través de la inhibición de la autofagia y la activación de mTOR*”. Utilizando ratas de la cepa Sprague-Dawley, indujeron hipertrofia y fibrosis cardíaca al administrarles isoproterenol a dosis de 5 mg/kg/día por 7 días (Liu *et al.*, 2018).
- **Boarescu y cols., 2019.** “*Efectos de las nanopartículas de curcumina en el infarto de miocardio inducido por isoproterenol*”. Desarrollaron un modelo de infarto de miocardio en ratas Wistar, utilizando 100 mg/kg de isoproterenol administrados dos



veces, con la segunda dosis 24 horas después de la dosis inicial (Boarescu *et al.*, 2019).

- **Ali y cols., 2020.** “*La importancia de la frecuencia cardíaca en la disfunción cardíaca tipo takotsubo inducida por isoproterenol en ratas*”. Este grupo de trabajo desarrolló un modelo de disfunción cardíaca similar a enfermedad de Takotsubo, donde una dosis única de 50 mg/kg de isoproterenol administrada de forma intraperitoneal fue suficiente para obtener resultados satisfactorios (Ali *et al.*, 2020).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardíacas, constituyen uno de los problemas de salud pública más graves a los que se enfrentan los Estados Unidos y el mundo en desarrollo. Solo en los Estados Unidos, más de 3 millones de personas viven con una afección cardíaca, una estimación ubica a un tercio de estos sujetos en la categoría de infarto al miocardio, lo que resulta en más de 250 000 muertes al año (Mozafarian *et al.*, 2016). En México, de acuerdo con datos preliminares del INEGI, en el período de enero a junio 2021 se registraron 113,899 muertes asociadas a enfermedades cardíacas, colocándose como la segunda causa de muerte a nivel nacional, tan sólo superada por COVID-19 (145,159 defunciones) (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática [INEGI], 2021). Dado que el corazón tiene una capacidad regenerativa limitada, cuando éste se lesiona (como en el caso de la interrupción del flujo sanguíneo en el infarto), ocurre una serie de respuestas compensatorias, resultando en pérdida de cardiomiocitos, remodelación, hipertrofia, y, por último, fibrosis. El infarto al miocardio y las alteraciones asociadas a este, son la causa número uno de falla cardíaca, un padecimiento de mal pronóstico, para el cual, el tratamiento de elección continúa siendo el trasplante cardíaco (Jencka *et al.*, 2021). En la actualidad, la principal restricción para esta terapia es el limitado número de donantes potenciales, teniendo en nuestro país, cifras de trasplantes por año tan bajas como 25 cirugías en 2021 y tan sólo 9 en 2020 (Centro Nacional de Trasplantes [CENATRA], 2021). En este contexto, una estrategia factible es regular al alza la maduración de las células cardíacas residuales, para establecer un microambiente apropiado para la homeostasis del corazón. Sin embargo, aún en la actualidad, los mecanismos moleculares de maduración y diferenciación cardíaca no han sido definidos de forma concreta, por lo que proponemos un estudio exploratorio del papel de los KLF en la remodelación cardíaca observada en procesos de hipertrofia. Bajo una perspectiva clínica, comprender estos procesos aumentará la probabilidad de desarrollar terapias más efectivas, al identificar puntos clave en vías de señalización, que puedan en un futuro ser blancos terapéuticos para limitar la remodelación, hipertrofia y fibrosis cardíaca, e invariablemente ayudar a reducir la incidencia de falla cardíaca.

### **3. HIPÓTESIS**

Los factores de transcripción Krüppel-like están implicados en la hipertrofia patológica similar a falla cardíaca postinfarto en el modelo murino.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Estudiar la expresión de los factores de transcripción Krüppel-like en un modelo de hipertrofia patológica similar a falla cardíaca postinfarto.

#### **4.2. Objetivos específicos**

1. Estandarizar un modelo murino de hipertrofia patológica similar a falla cardíaca postinfarto, mediante la inducción con isoproterenol.
2. Cuantificar la expresión génica de factores de transcripción Krüppel-like en un modelo murino de hipertrofia patológica similar a falla cardíaca postinfarto.
3. Cuantificar la expresión génica de factores de diferenciación cardíaca (*Gata4*, *Mef2c* y *Tbx5*) en un modelo murino de hipertrofia patológica similar a falla cardíaca postinfarto.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

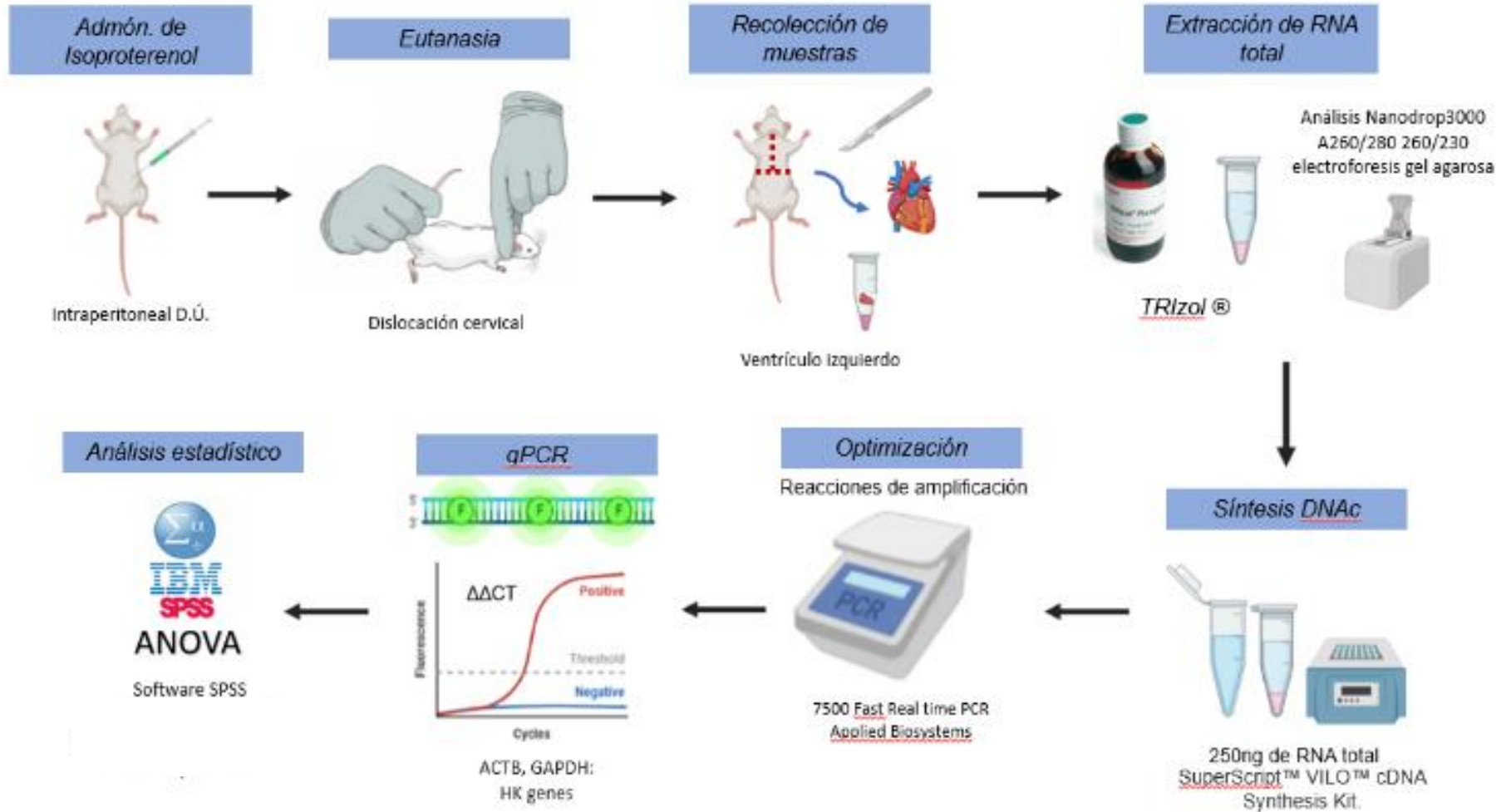


Ilustración10. Estrategia experimental general

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Animales de Experimentación**

Todos los experimentos se realizaron empleando ratas de la cepa Wistar ( $\approx 200$  gramos) estos fueron alojados en cajas de polimetilmetacrilato, mantenidas a  $20 - 24^\circ \text{C}$  en una habitación con un ciclo luz / oscuridad de 12 horas. El agua y comida (Labdiet5000) estuvo disponible *ad libitum* en la jaula.

### **6.2 Determinación de la dosis óptima de isoproterenol para inducción de hipertrofia cardíaca**

Se manejaron cinco grupos de cuatro ratas cada uno, a los cuales se les administraron las siguientes dosis de clorhidrato de isoproterenol (SKU: I5627 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) de forma intraperitoneal: 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg y 85 mg/kg, así como también, un grupo control al que se le administró únicamente solución salina. A los 21 días las ratas fueron sacrificadas y los corazones extraídos de los cuerpos. Éstos fueron pesados y medidos, y se seleccionó la dosis mínima que permita el desarrollo de hipertrofia con menor mortalidad a lo largo de los 21 días.

### **6.3 Administración de isoproterenol**

Se administró de forma intraperitoneal la dosis seleccionada de clorhidrato de isoproterenol (SKU: I5627 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), disuelta en 0.5 mL de solución fisiológica (Cloruro de Sodio al 0.9%) a temperatura ambiente, en dosis única. Al grupo control se le administró 0.5 mL de solución fisiológica de forma intraperitoneal en dosis única.

## 6.4 Eutanasia por dislocación cervical

Siguiendo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999, se toma al animal por la base de la cola con una mano para su acomodo y se ubica sobre una superficie donde el animal se sostenga. Con los dedos índice y pulgar de la otra mano o bien en su defecto un instrumento delgado pero rígido, se coloca este sobre la base del cráneo y se ejerce tracción hacia atrás del animal a través de la base de la cola, para ocasionar la dislocación cervical. Los sacrificios fueron realizados en los días uno a 21 post-administración de isoproterenol, a intervalos de 24 horas.

## 6.5 Cardiectomía: Obtención y almacenamiento de las muestras

Se accedió al tórax mediante una incisión en T invertida y esternotomía longitudinal. El corazón fue liberado pinzando y cortando los grandes vasos de la corona cordis (**Ilustración 7**). Se extrajo el corazón del cuerpo de la rata y se tomaron tres muestras del área ventricular izquierda. Las muestras fueron suspendidas en 150µL de TRIzol® (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

## 6.6 Obtención de primers

Se obtuvo una lista de primers previamente validados del repositorio Harvard Primer Bank y se verificó la especificidad de las secuencias mediante Nucleotide BLAST, bajo las siguientes condiciones de búsqueda:

- Bases de datos: Estándar
- Organismo: Rattus Norvegicus (taxid:10116)
- Selección de programa: Algoritmo Blastn

## 6.7 Extracción de ARN total, Retrotranscripción y q-PCR

El ARN total fue extraído con TRIzol® (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.), según el protocolo del fabricante (**Apéndice 1**). El ARN fue cuantificado midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando Nanodrop 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.). El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado mediante reacción de transcripción inversa con 250 µg de ARN total utilizando la transcriptasa inversa del kit SuperScript™ VILO™ cDNA Síntesis Kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) (**Apéndice 2**). El ADNc fue usado como plantilla para la qPCR, que se realizó siguiendo el protocolo SYBR-Green® FAST (Thermo Fisher Scientific, Inc.) (**Apéndice 3**). Las condiciones de reacción fueron llevadas a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fueron utilizados para normalizar la expresión de los genes diana. Los niveles de expresión relativa de los genes fueron calculados utilizando el método de Pfaffl con eficiencias corregidas.

## 6.8 Cálculo de eficiencia de primers

El cálculo de la eficiencia de los primers fue realizado de la siguiente manera:

Se realizaron diluciones seriadas de ADN complementario a las siguientes concentraciones: 1000 ng, 200 ng, 40 ng, 8 ng y 1.6 ng. Posteriormente amplificó el ADN complementario utilizando primers tanto para el gen de interés como para el control interno (GAPDH). Se graficó el CT en el eje y frente a la dilución logarítmica de ADN complementario en el eje x, y se determinó la pendiente de la recta. A continuación, la eficiencia de la PCR se calculó mediante la ecuación  $E=10^{(-1/m)}$ , donde m es la pendiente de la línea y E es la eficiencia.

Siguiendo las guías del protocolo de Nature “Análisis de datos de PCR en tiempo real mediante el método CT comparativo”, las eficiencias de primers en los diferentes genes se consideraron lo suficientemente similares cuando se encontraron en un rango de 10% con respecto del otro (1.8 a 2.2).

De acuerdo con las guías previamente mencionadas, la eficiencia de la PCR se puede aproximar por la forma de la gráfica de amplificación de la PCR. Este tipo de análisis solo debe realizarse en los gráficos de amplificación de PCR logarítmicos. Se espera que los primers que producen un gráfico de forma casi idéntica tengan una eficiencia similar.

## 6.9 Cuantificación génica relativa por método de Pfaffl

La cuantificación génica relativa por método de Pfaffl fue realizada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio de Expresión génica} = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}}{(E_{HKG})^{\Delta Ct_{HKG}}}$$

En donde los símbolos tienen los siguientes significados:

**E** = Eficiencia de primers

**GOI** = Gen de interés

**$\Delta Ct$**  = Diferencia en umbral de ciclos

**$\Delta Ct_{GOI}$**  = Ct control – Ct muestra en gen de interés

**HKG** = Gen endógeno

**$\Delta Ct_{HKG}$**  = Ct control – Ct muestra en gen endógeno

## 6.10 Análisis estadístico

Los datos recopilados fueron analizados utilizando el software SPSS versión 17.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL, EE. UU.). Se realizó comparación de medias con el método de ANOVA de un factor y prueba posthoc de Dunnett bilateral. Se consideró significativo un valor de  $P \leq 0,05$ .



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Determinación de dosis óptima de isoproterenol para inducción de hipertrofia cardíaca patológica

La mortalidad en los grupos en los que se administró isoproterenol a dosis de 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg y 85 mg/kg fue del 100% a las 24 horas, no obstante, se decidió continuar el experimento utilizando la dosis de 65 mg/kg, la cual demostró una supervivencia del 100% a los 21 días (**Tabla 1**). Se estandarizó un abordaje quirúrgico para la extirpación del corazón, descrito en la **Ilustración 11**. Se realizaron mediciones de peso y tamaño del corazón desde el día uno hasta el día 21 tras la administración de isoproterenol, a intervalos de 24 horas (**Tabla 2 y 3**).

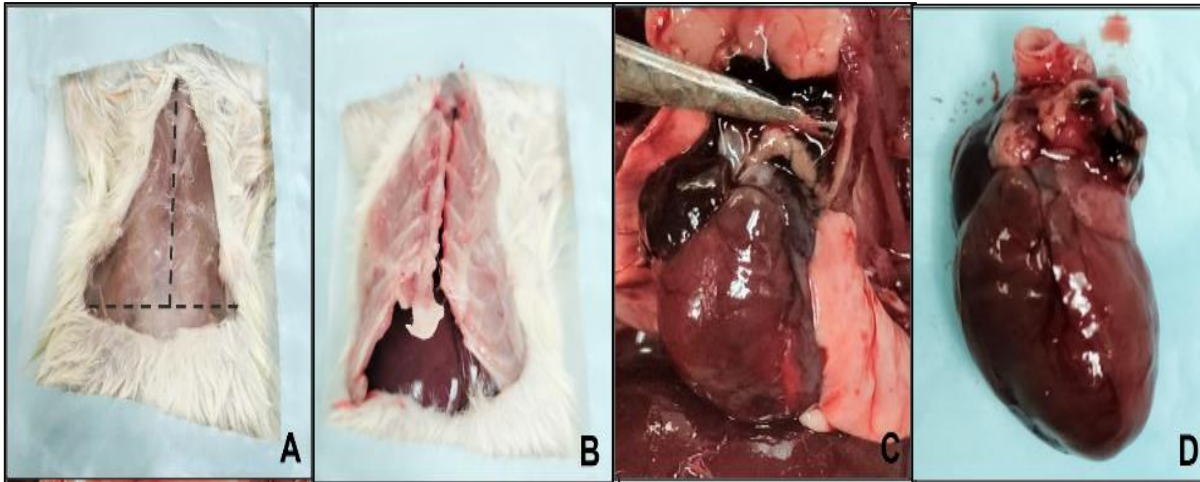


Ilustración 11. Abordaje Quirúrgico utilizado: Cardiectomía. A) Incisión en "T invertida". B) Esternotomía longitudinal. C) Pinzamiento de grandes vasos a nivel de la corona cordis. D) Corte y extirpación cardíaca.

Tabla 1. Supervivencia de grupos al día 21.

<b>Grupo</b>	<b>Supervivientes</b>	<b>Mortalidad (21 días)</b>
65 mg/kg	4	0%
70 mg/kg	0	100%
75 mg/kg	0	100%
80 mg/kg	0	100%
85 mg/kg	0	100%
Sol. Salina	4	0%

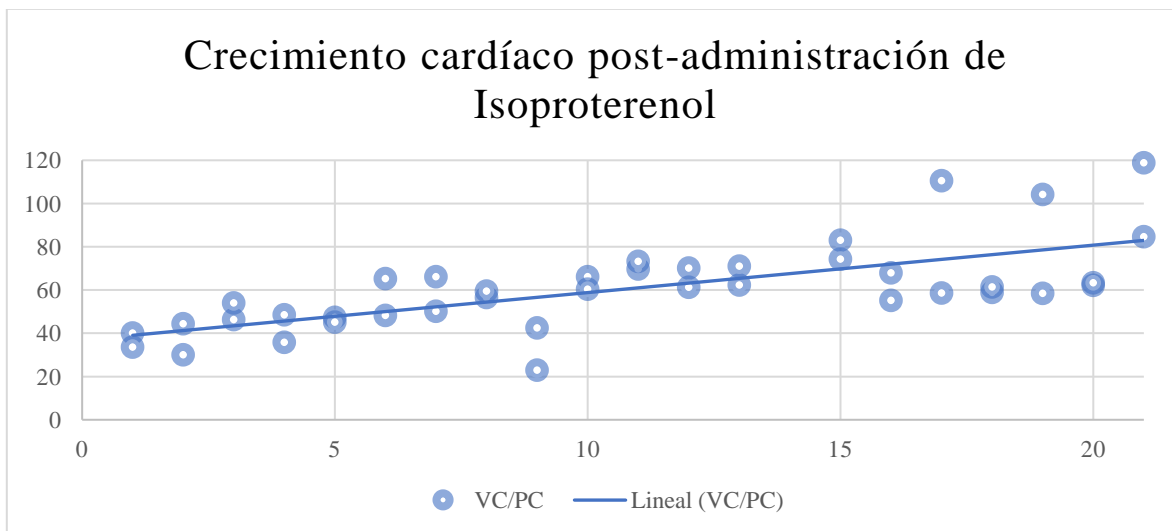
*Tabla 2. Resultados de Morfometría cardíaca.*

Día	Peso corporal (g)	Peso cardíaco (g)	Largo (mm)	Ancho (mm)
1	191	1	14.8	11.1
	245	1	13.6	12
2	240	1	17.6	12
	184	1	14	9.7
3	177	1	18.4	10.3
	170	1	18.4	10.9
4	183	0.8	14.7	12
	170	1	14.5	10
5	187	0.9	17.1	11.1
	181	0.8	17	10.7
6	207	0.8	15	12.6
	221	1	18.3	13.7
7	201	0.8	15.6	12.4
	203	1	17.3	13.6
8	193	1	16.1	12.7
	199	0.9	12.2	15.2
9	216	0.8	11.5	10.1
	188	0.7	13.2	12
10	160	0.8	16.4	12.4
	282	2	18.5	14.8
11	207	1.1	21.3	12.7
	218	1	20.3	13.7

*Tabla 3. Resultados de Morfometría cardíaca (Continuación).*

Día	Peso corporal (g)	Peso cardíaco (g)	Largo (mm)	Ancho (mm)
12	196	0.9	17.2	13.8
	210	1	17.6	13.2
13	193	0.8	11.2	16
	178	1	16.8	13.4
14	221	0.9	15.6	11.4
	192	0.6	13.4	12
15	166	1	16.3	14.2
	205	1.1	12	17.4
16	184	1.1	16	12.3
	210	1	18.1	13.7
17	186	0.7	16.9	12.4
	199	1.2	20.5	16
18	279	2	20	14
	187	2	19	12
19	207	2	20	12
	208	2	20.2	16
20	206	1	17	13.4
	251	2	18	14.5
21	184	1	10.5	18.8
	175	2	15.3	18

Los resultados obtenidos en la morfometría cardíaca fueron graficados como se plasma en la **Ilustración 12**, demostrando un crecimiento estadísticamente significativo al día 21 contra el tamaño del corazón control.



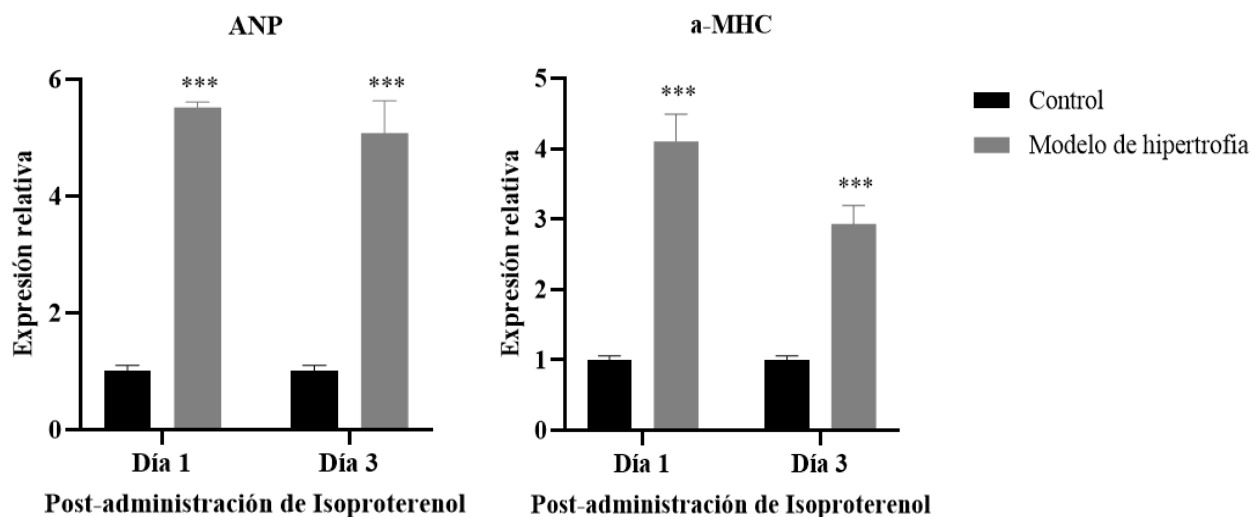
*Gráfica 1. Crecimiento cardíaco post-administración de Isoproterenol. Comparación de medias, ANOVA de un Factor (Post hoc: Dunnet bilateral). N= 42, \*\*\*P < 0,001 Día 21 post-administración de Isoproterenol, frente al control*

A continuación, se presenta una ilustración de vista macroscópica del corazón control en comparación con el día 21 post-administración de isoproterenol (**Ilustración 12**).



*Ilustración 12. Corazón control comparado con corazón del día 21 después de la inducción de daño cardíaco.*

Adicionalmente, para evaluar el efecto del isoproterenol, se cuantificó por medio de RT-qPCR la expresión génica del Péptido Auricular Natriurético (ANP) y la cadena pesada de miosina alfa ( $\alpha$ -MHC), marcadores moleculares de estrés cardíaco e hipertrofia, respectivamente (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. *QRT-PCR* (ANP: estrés cardíaco y  $\alpha$ -MHC: hipertrofia) en los corazones de ratones inyectados con 65 mg/kg de isoproterenol en comparación con controles a los 1 y 3 días. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \*\*\* $P < 0.001$

A partir de este punto, el resto de los experimentos fueron realizados con el fin de analizar la fase inicial del desarrollo de hipertrofia patológica, yendo desde el día uno hasta el día nueve tras la administración de isoproterenol. Para fines de esta tesis, los genes seleccionados para análisis fueron KLF-3, KLF-4, KLF-6, KLF-11, KLF-12, KLF-13 y KLF-15, así como también, los factores de diferenciación cardíaca previamente mencionados: GATA4, TBX5, MEF2C.

## 7.2 Pares de primers seleccionados

Las secuencias nucleotídicas correspondientes a los pares de primers seleccionados para la amplificación por PCR de los factores de transcripción Krüppel-like, así como también, factores de reprogramación fetal cardíaca, se presentan en la **tabla 4**. Se incluyen secuencias de primers para todos los KLFs reportados, con el fin de que puedan ser utilizados en proyectos posteriores de la misma línea de investigación.

*Tabla 4. Listado de primers.*

	<b>PRIMERBANK ID</b>	<b>FORWARD 5'-3'</b>	<b>REVERSE 5'-3'</b>
<b>KLF-1</b>	6754454a1	AGACTGTCTTACCCTCCATCAG	GGTCCTCTGATTTCCAGACTCAC
<b>KLF-2</b>	6680580a1	CTCAGCGAGCCTATCTTGCC	CACGTTGTTTAGGTCTCATCC
<b>KLF-3</b>	6680582a1	GAAGCCCAACAAATATGGGGT	GACAAGGAAACCATGAGAGG
<b>KLF-4</b>	6754456a1	GTGCCCCGACTAACCGTTG	TCGTTGAACTCCTCGGTCT
<b>KLF-5</b>	31981873a1	CCGGAGACGATCTGAAACACG	GTTGATGCTGTAAGGTATGCCT
<b>KLF-6</b>	26343563a1	GTTTCTGCTCGGACTCCTGAT	TTCTTGGAAAGATGCTACACATTG
<b>KLF-7</b>	31981436a1	TCCACGACACCGGCTACTT	GGGAGCAGCAAGGGGTCTA
<b>KLF-8</b>	146198805c1	TGGTTCGATGCAGGTATTCAA	AACAGAGCTGGTTCTCCATT
<b>KLF-9</b>	31542239a1	GCCGCCTACATGGACTTCG	GCCGTTACCTGTATGCAC
<b>KLF-10</b>	26335693a1	ATGCTCAACTTCGGCGCTT	CGCTTCCACCGCTCAAAG
<b>KLF-11</b>	23510267a1	CATGGACATTTGTGAGTCGATCC	CCTTTGGTAGATCAGGTGCAG
<b>KLF-12</b>	118130075c2	CAAGGGTCTCAAACGTCCAC	TGATCTACAGGCAATGAGTCC
<b>KLF-13</b>	---	GATGGGAATGTCCCTGTGGG	CTCACCAGGCTCTCTGTTGG
<b>KLF-14</b>	205360919c1	CTCCGTGTGCCTCAACAAGCTGC	CAGGCGCACCCAGGATAGC
<b>KLF-15</b>	12963561a1	GAGACCTTCTCGTCACCGAAA	GCTGGAGACATCGCTGTGAT
<b>KLF-16</b>	17505216a1	ATCCTGGCCGATCTGAGAGG	GTGCGAAGACTTGTAATAGGCT
<b>KLF-17</b>	88853590c3	TTCCCGTGGAGTCTCAGTGAT	GGAGTGCAACATCTGATC(A)CATA
<b>GATA4</b>	6679953a1	CCCTACCCAGCCTACATGG	ACATATCGAGATTGGGGTGTCT
<b>MEF2C</b>	13384624a1	ATGCCATCAGTGAATCAAAGGAT	GTGGTACGGTCTCCCAACT
<b>TBX5</b>	229577242c3	AATGGTCCGTAACCTGGCAAAG	GGATAATGTGTCCAAACGGGTC

## 7.3 Extracción de ARN total y cuantificación por Espectrofotometría UV-Vis con Nanodrop 2000.

ARN total de tejido cardíaco fue extraído utilizando el método Trizol-Cloroformo siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN fue cuantificado por medio de Espectrofotometría UV-Vis utilizando el equipo Nanodrop 2000. De igual forma se evaluaron parámetros de pureza,

procurando que la relación 260/280 se mantuviera en rangos de aproximadamente 2.0. A continuación, se presenta una imagen representativa de los espectros de absorción obtenidos (**Ilustración 13**):

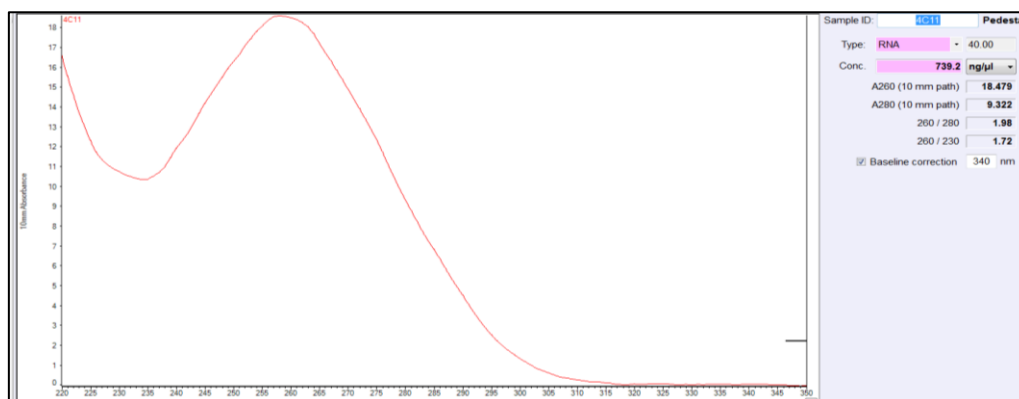


Ilustración 13. Espectro de Absorción de ARN total de muestra de corazón control.

## 7.4 Retrotranscripción de ARN

El ARN total fue retrotranscrito usando el kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis. El ARN fue cuantificado por medio de Espectrofotometría UV-Vis utilizando el equipo Nanodrop 2000. De igual forma se evaluaron parámetros de pureza, procurando que la relación 260/280 se mantuviera en rangos mayores a 1.8. A continuación se presenta una imagen representativa de los espectros de absorción obtenidos (**Ilustración 14**):

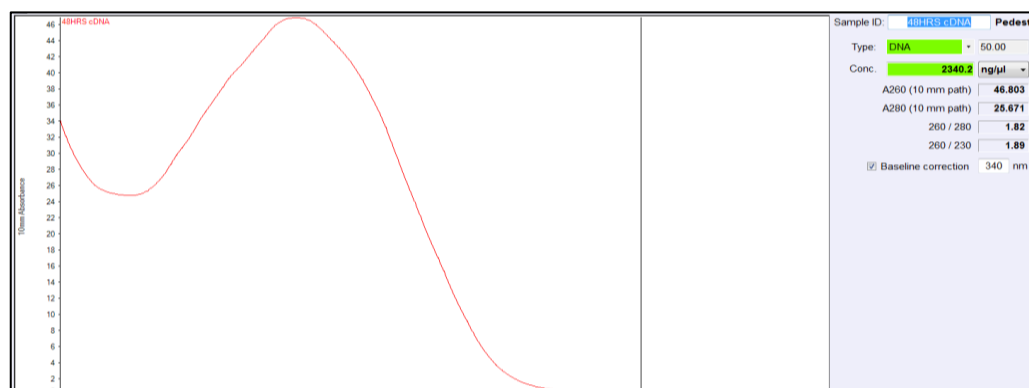
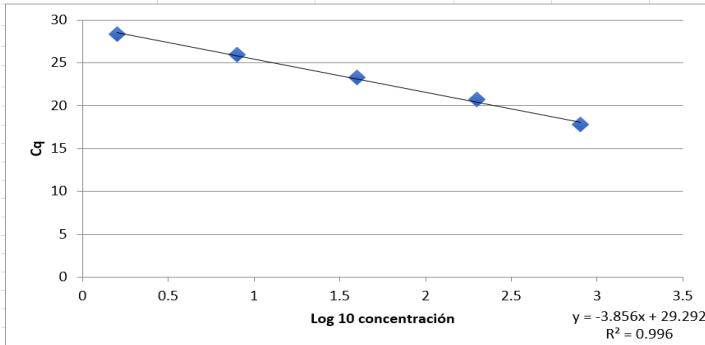


Ilustración 14. Espectro de Absorción de DNA complementario de muestra de corazón, de 2 días posteriores a la administración de isoproterenol.

## 7.5 Cálculos de eficiencia de primers

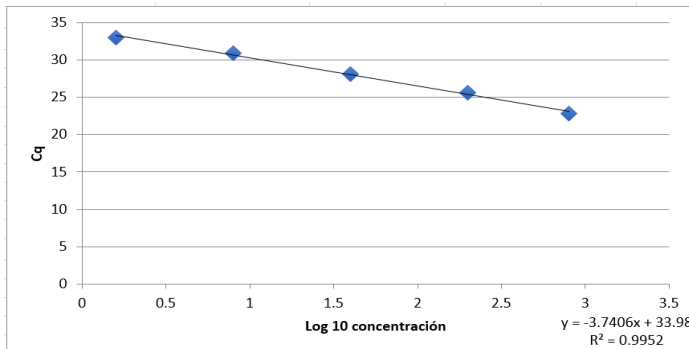
A continuación, se presentan algunas de las curvas de calibración utilizadas para los cálculos de eficiencia de primers.



Gráfica 3. Eficiencia de primers para el gen GAPDH.

Tabla 5. Eficiencia de primers para el gen GAPDH.

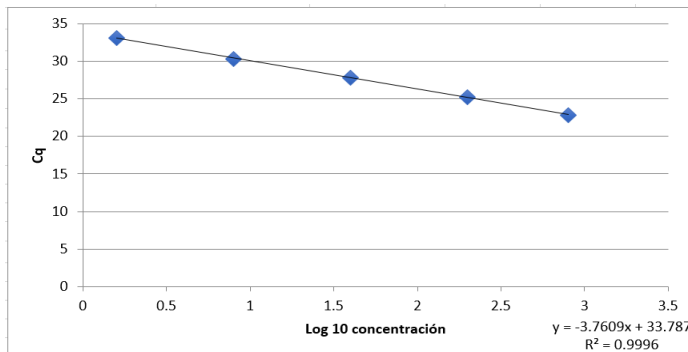
GAPDH	
<b>Pendiente</b>	-3.856
<b>-1/Pendiente</b>	0.259336099
<b>Eficiencia</b>	1.81692123



Gráfica 4. Eficiencia de primers para el gen KLF-6.

Tabla 6. Eficiencia de primers para el gen KLF-6.

KLF-6	
<b>Pendiente</b>	-3.7406
<b>-1/Pendiente</b>	0.267336791
<b>Eficiencia</b>	1.850703264



Gráfica 5. Eficiencia de primers para el gen KLF-12.

Tabla 7. Eficiencia de primers para el gen KLF-12.

KLF-12	
<b>Pendiente</b>	-3.7609
<b>-1/Pendiente</b>	0.265893802
<b>Eficiencia</b>	1.844564313



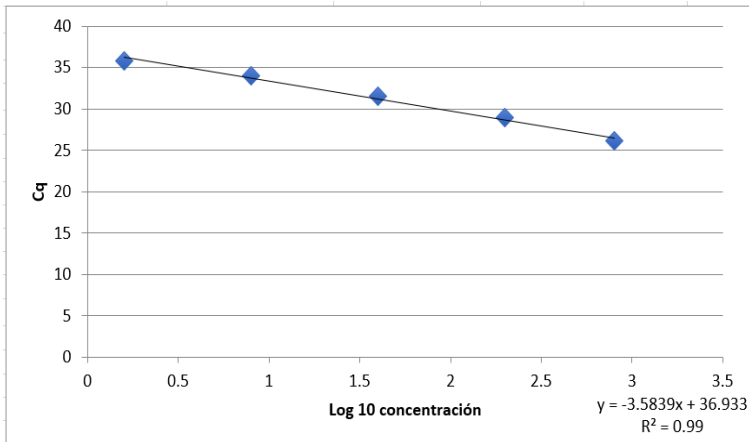


Tabla 8. Eficiencias de primers para el gen KLF-15.

<b>KLF-15</b>	
<b>Pendiente</b>	-3.5839
<b>-1/Pendiente</b>	0.279025642
<b>Eficiencia</b>	1.90119053

Gráfica 6. Eficiencia de primers para el gen KLF-15.

Los resultados de las curvas de calibración restantes se resumen en la **tabla 9**.

Tabla 9. Resultados del cálculo de eficiencia de primers.

<b>GEN</b>	<b>Pendiente</b>	<b>E</b>	<b>E%</b>
<b>GAPDH</b>	-3.856	1.82	81.69%
<b>GATA4</b>	-3.3788	1.97	97.68%
<b>MEF2C</b>	-3.7626	1.84	84.41%
<b>TBX5</b>	-4.205	1.73	72.91%
<b>NPA</b>	-3.7181	1.86	85.76%
<b>a-MHC</b>	-3.8936	1.81	80.65%
<b>KLF-3</b>	-3.8036	1.83	83.12%
<b>KLF-4</b>	-3.8884	1.811	81.10%
<b>KLF-6</b>	-3.7406	1.85	85.07%
<b>KLF-11</b>	-3.6674	1.87	87.36%
<b>KLF-12</b>	-3.7805	1.845	84.46%
<b>KLF-13</b>	-3.7994	1.83	83%
<b>KLF-15</b>	-3.5714	1.901	90.12%

## 7.6 PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo real utilizando el kit de mezcla maestra Fast SYBR™ Green. La corrida de la placa de reacción fue realizada en el equipo 7500 Fast Real time PCR (Applied Biosystems) siguiendo las condiciones de reacción universales sugeridas por el fabricante (Apéndice 3).

A continuación, se presentan algunas de las curvas de disociación obtenidas tras la amplificación de los fragmentos de los genes de los factores de transcripción Kruppel-like, factores de reprogramación embrionaria y GAPDH:

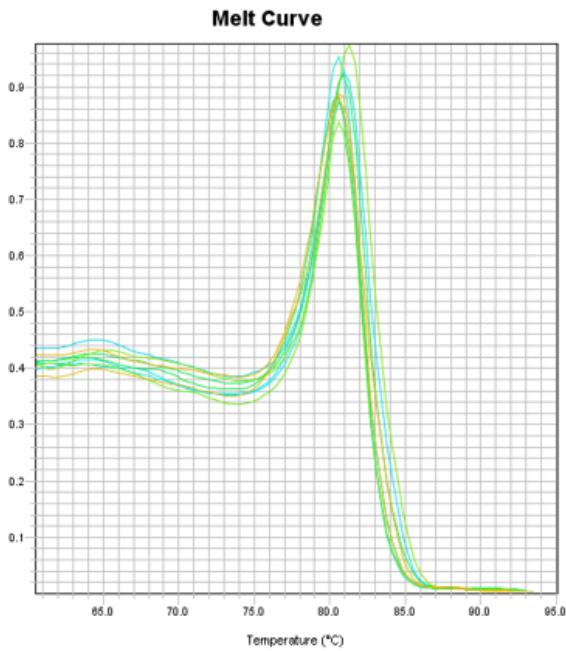


Ilustración 15. Curva de disociación de KLF-2.

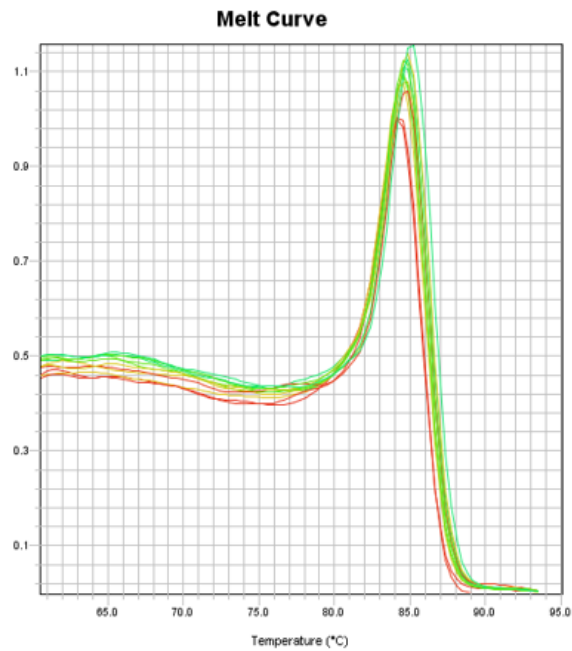


Ilustración 16. Curva de disociación de KLF-3.

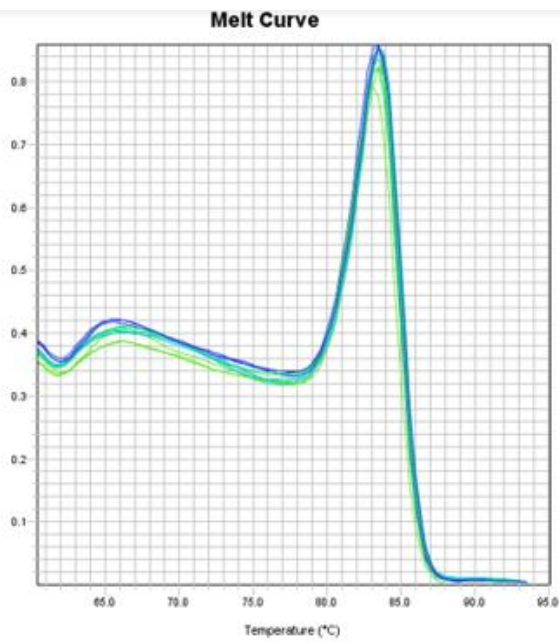


Ilustración 17. Curva de disociación de KLF-4.

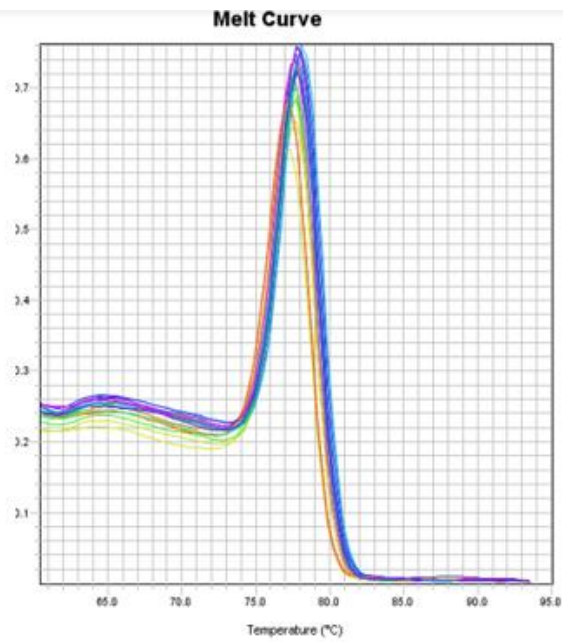


Ilustración 18. Curva de disociación de KLF-6.

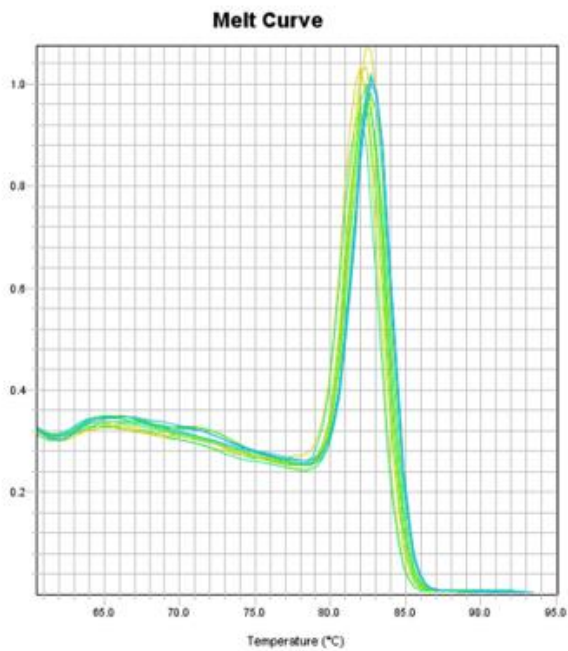


Ilustración 19. Curva de disociación de KLF-7

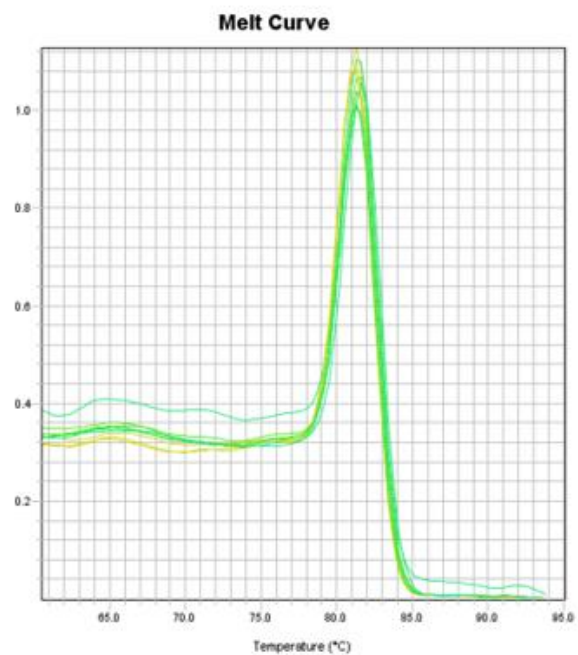


Ilustración 20. Curva de disociación de KLF-11

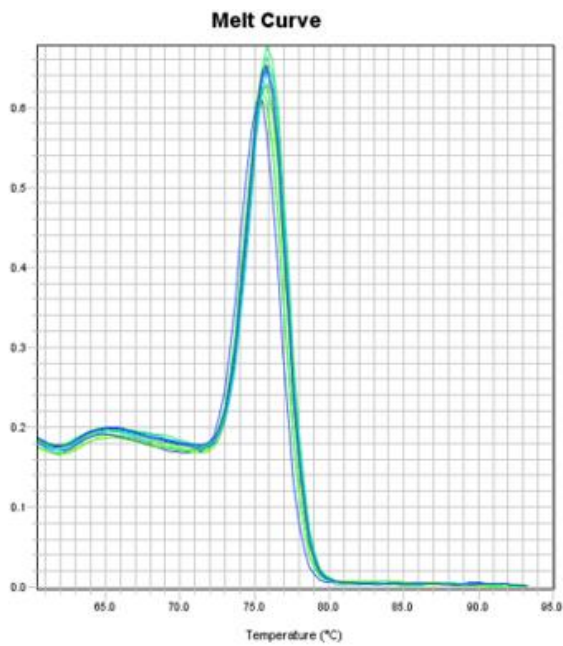


Ilustración 21. Curva de disociación de KLF-12

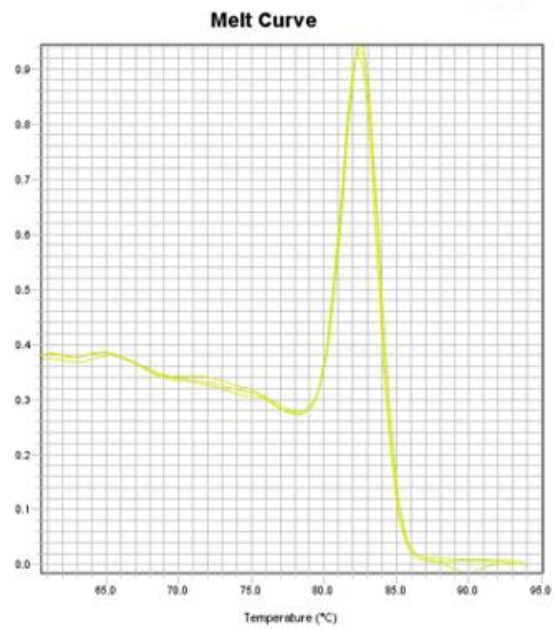


Ilustración 22. Curva de disociación de KLF-13

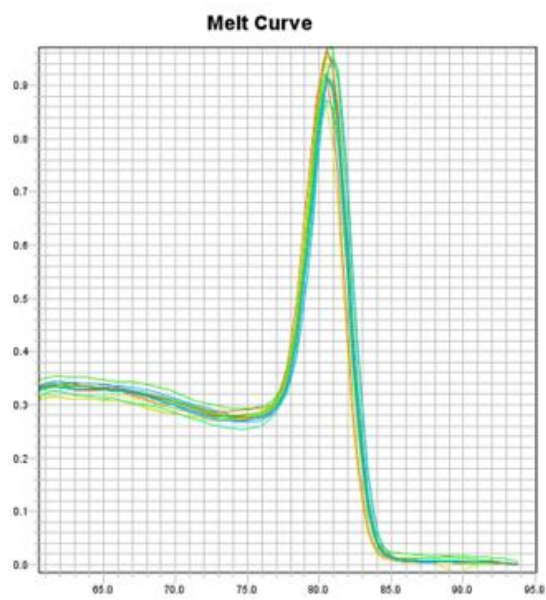


Ilustración 23. Curva de disociación de KLF-15

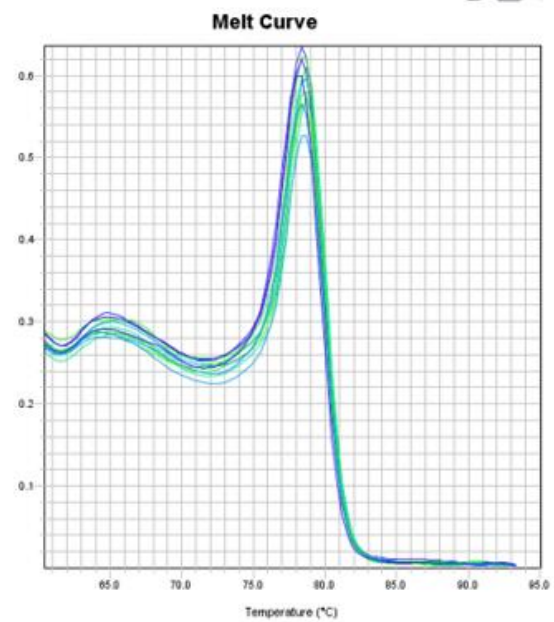


Ilustración 24. Curva de disociación de KLF-17

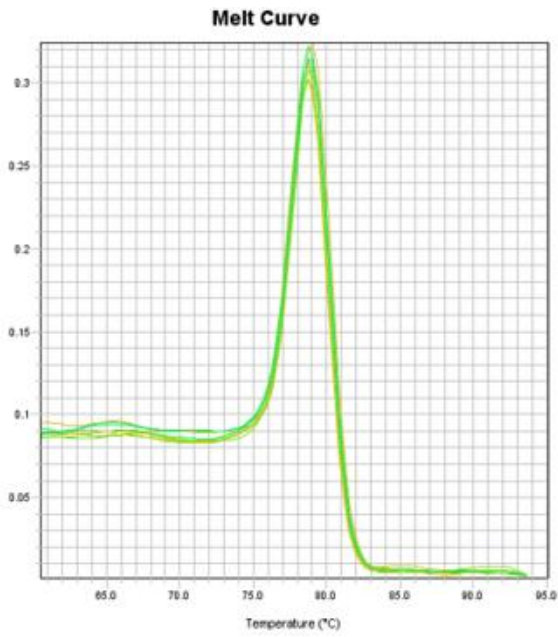


Ilustración 25. Curva de disociación de GAPDH

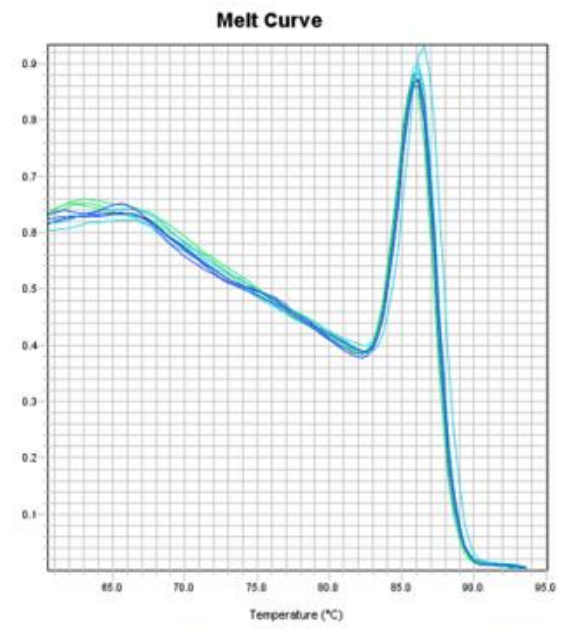


Ilustración 26. Curva de disociación de GATA4

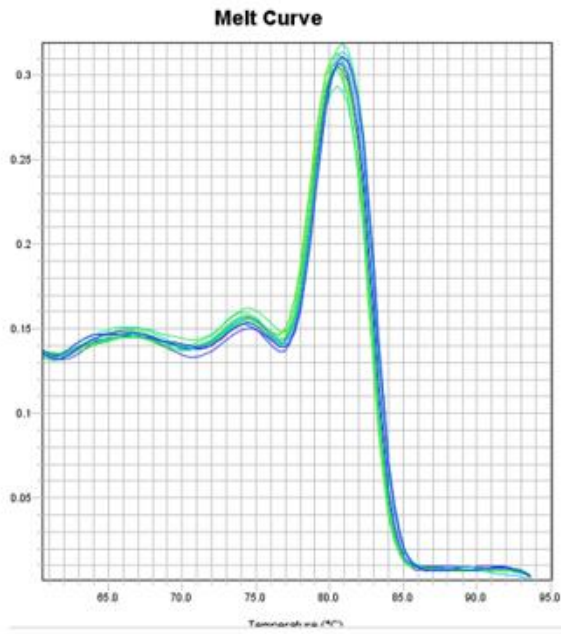


Ilustración 27. Curva de disociación de MEF2c

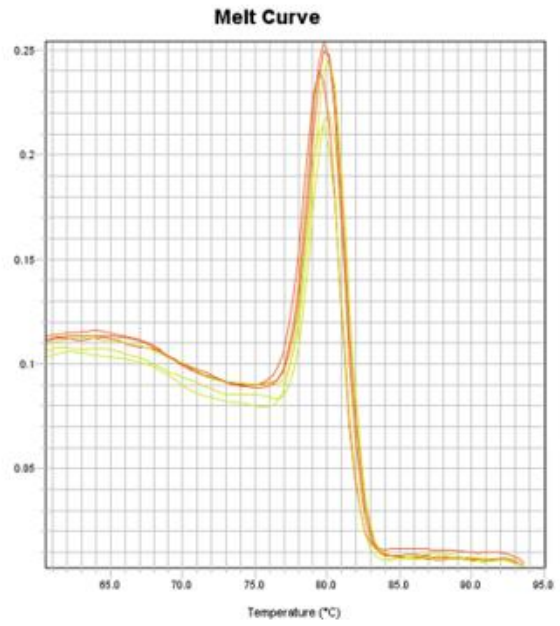
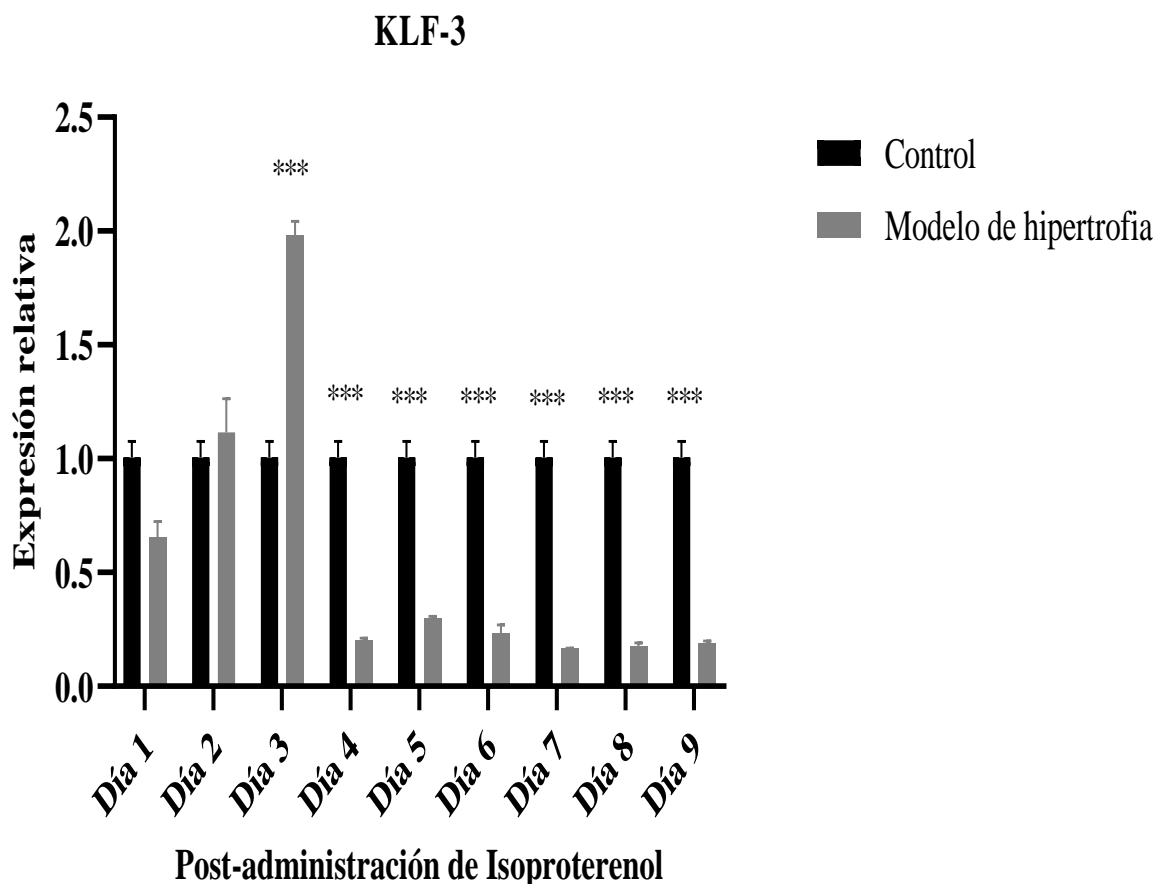


Ilustración 28. Curva de disociación de TBX5

## 7.7 Resultados de Expresión Génica Relativa

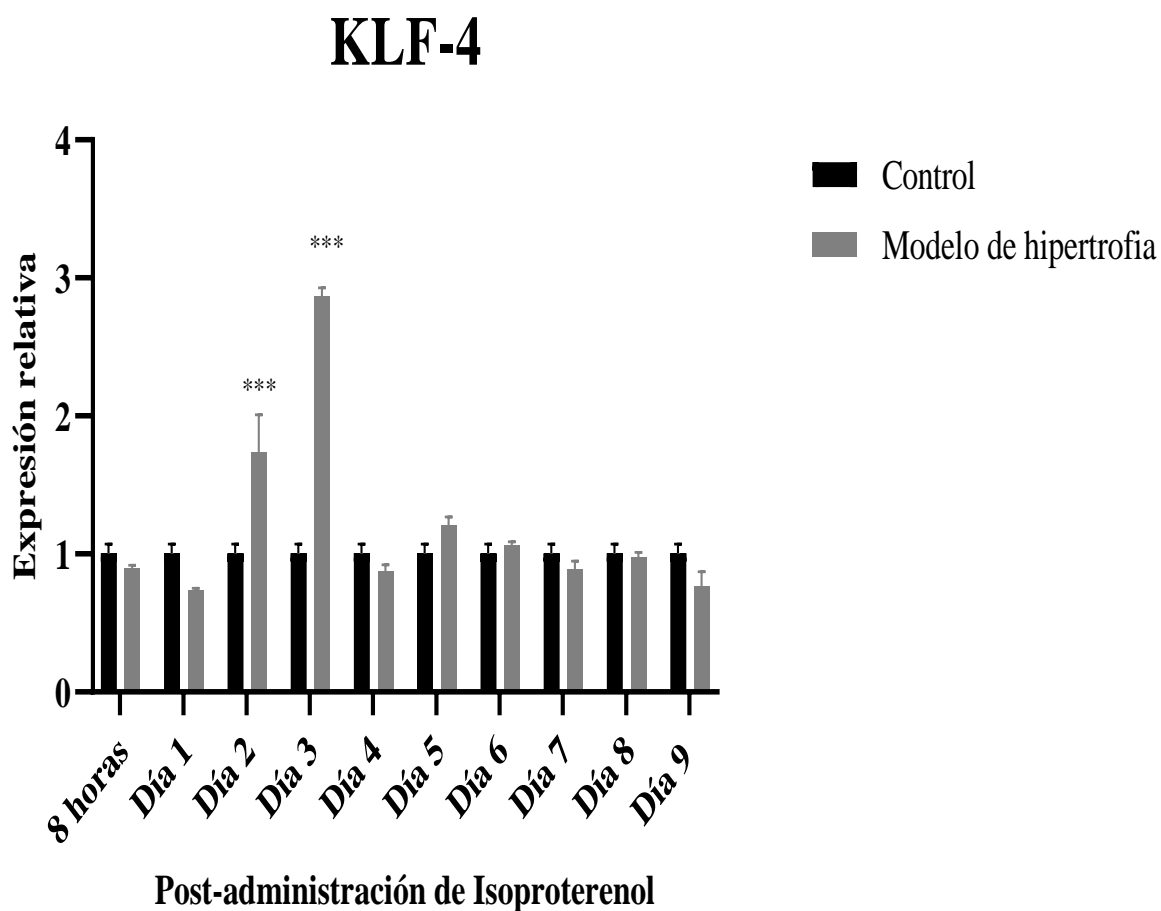
Utilizando el método de Pfaffl fue posible realizar el análisis de la expresión génica relativa con corrección de eficiencia de primers. Como se mencionó previamente, el análisis se centró en la fase inicial del desarrollo de la hipertrofia patológica, yendo desde el día uno hasta el día nueve tras la administración de isoproterenol. Los resultados obtenidos fueron graficados comparándose contra el animal de experimentación control, al cual se le administró únicamente solución salina, utilizando como prueba estadística una comparación de medias, ANOVA de un Factor (Post hoc: Dunnet bilateral). Cada grupo consistió en un animal de experimentación y cada experimento fue realizado por triplicado.



Gráfica 7. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

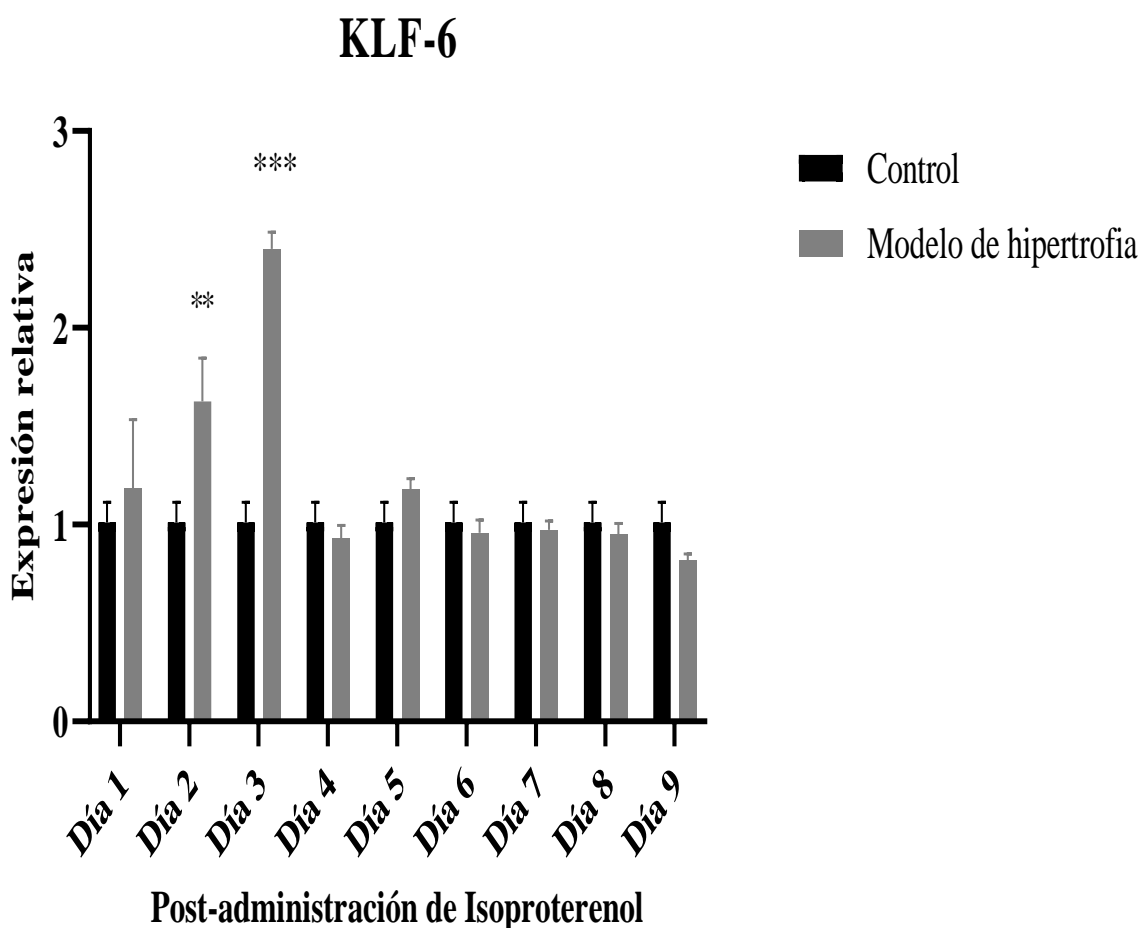
Estos resultados se presentan en las **Gráficas 7 - 16** y serán discutidos en segmentos posteriores de este escrito.

Durante los primeros días después del daño cardíaco, se detectó un aumento significativo en la actividad génica del gen KLF-3, alcanzando niveles casi dos veces superiores al tercer día en comparación con el grupo de control. Sin embargo, a partir del cuarto día y hasta el noveno día, se observó una disminución en la expresión de este gen, que se mantuvo suprimida (**Gráfica 7**).



Gráfica 8. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  frente al control.

En el contexto del gen KLF4, se pudo apreciar una marcada elevación en su nivel de expresión relativa normalizada a GAPDH durante los días 2 y 3 del estudio. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión relativa de KLF-4, logrando un incremento de 1.7 veces en el día 2 y de 2.8 veces en el día 3, en comparación con el grupo de control, luego de la administración de isoproterenol (**Gráfica 8**).

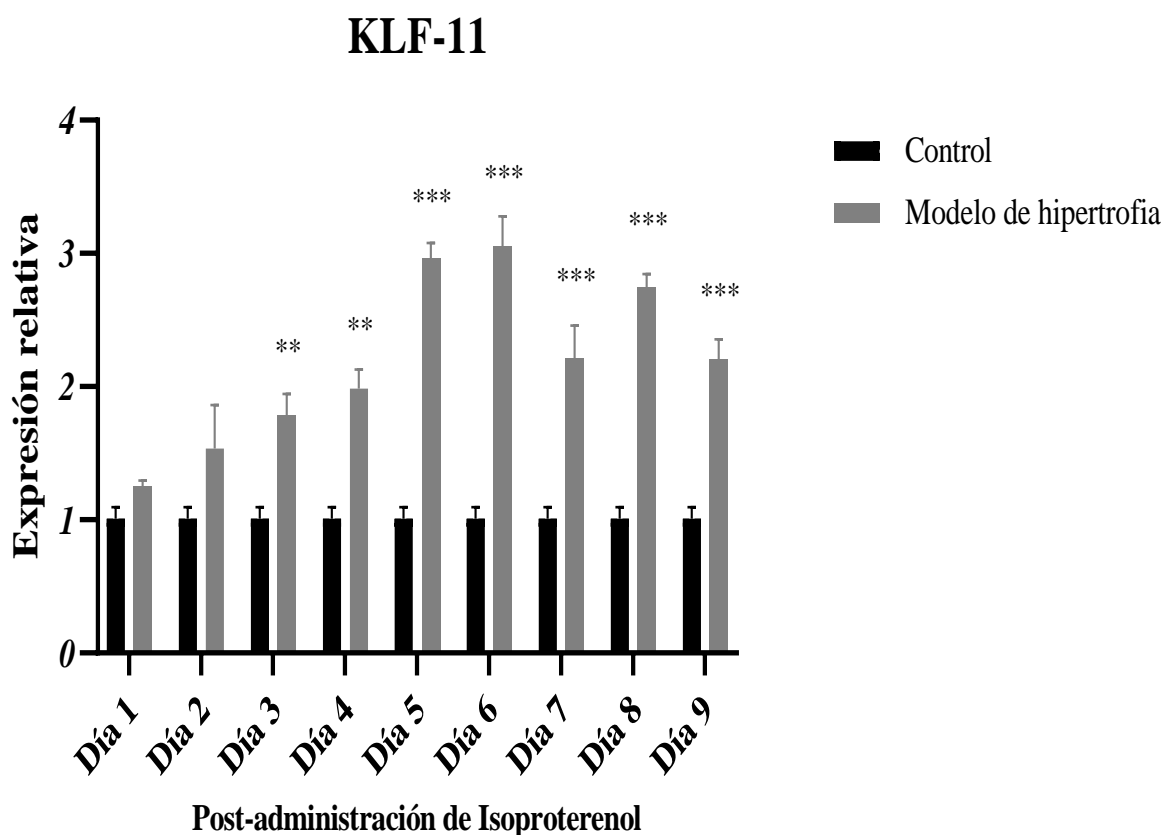


Gráfica 9. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

En relación con el gen KLF-6, se evidenció un incremento significativo en su expresión relativa durante el segundo día, y de forma aún más pronunciada en el tercer día, donde se



observó un aumento de hasta 2.4 veces en comparación con el grupo de control. Posteriormente, se observó que los niveles de expresión se mantuvieron estables, sin diferencias significativas con respecto al grupo de control (**Gráfica 9**).

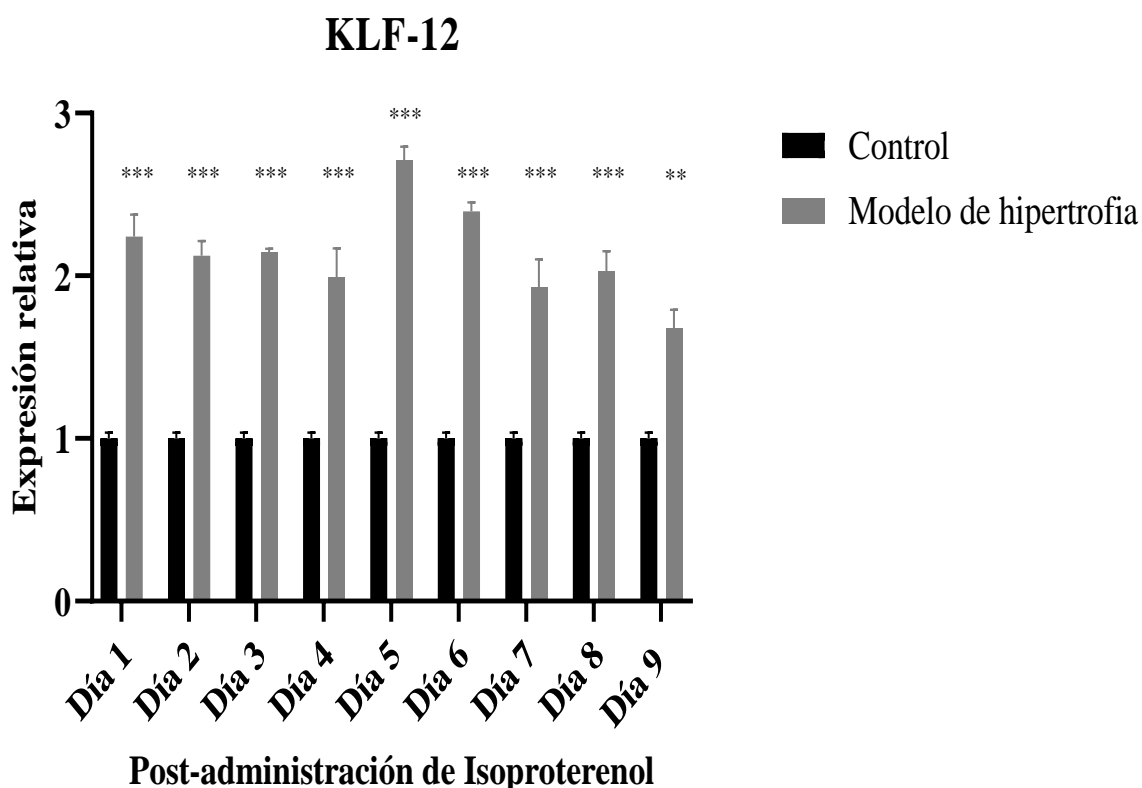


Gráfica 10. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

En el contexto del gen KLF-11, se registró un comportamiento fluctuante en términos de su expresión durante el transcurso del estudio. Específicamente, se ha observado un aumento estadísticamente significativo en la expresión de KLF-11 a partir del tercer día, el cual muestra una tendencia ascendente gradual hasta alcanzar puntos máximos en los días 5 y 6.

Durante el quinto día, se ha registrado un aumento significativo de 2.96 veces en la expresión de KLF-11 en comparación con el grupo de control. Posteriormente, en el sexto día, se ha

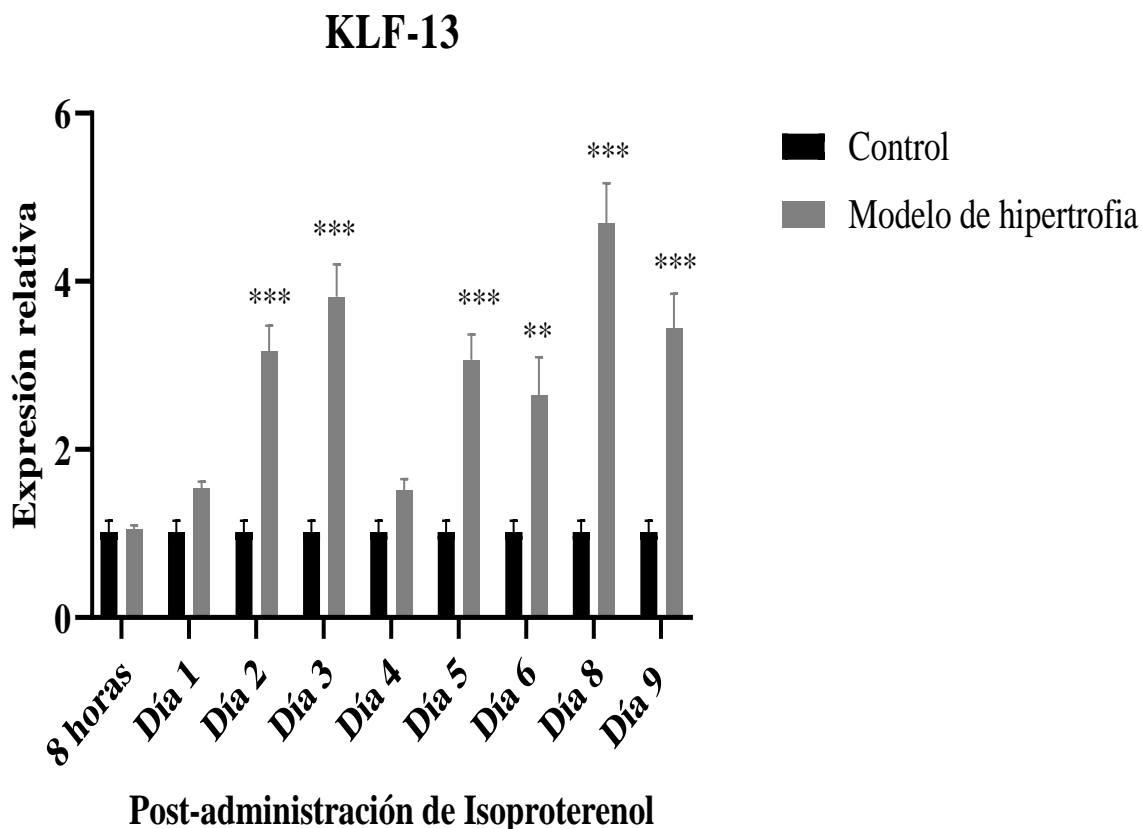
observado un aumento aún mayor en la expresión de KLF-11, alcanzando un valor de 3.05 veces superior al grupo de control. No obstante, se destaca que, al alcanzar este pico de máxima expresión, se ha observado una tendencia descendente en la expresión relativa de KLF-11, en comparación con el control (**Gráfica 10**).



Gráfica 11. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

Con relación al gen KLF-12, se ha evidenciado un patrón notable en términos de su expresión a lo largo de todo el período estudiado. Específicamente, se ha encontrado un aumento estadísticamente significativo en la expresión de KLF-12, alcanzando niveles que

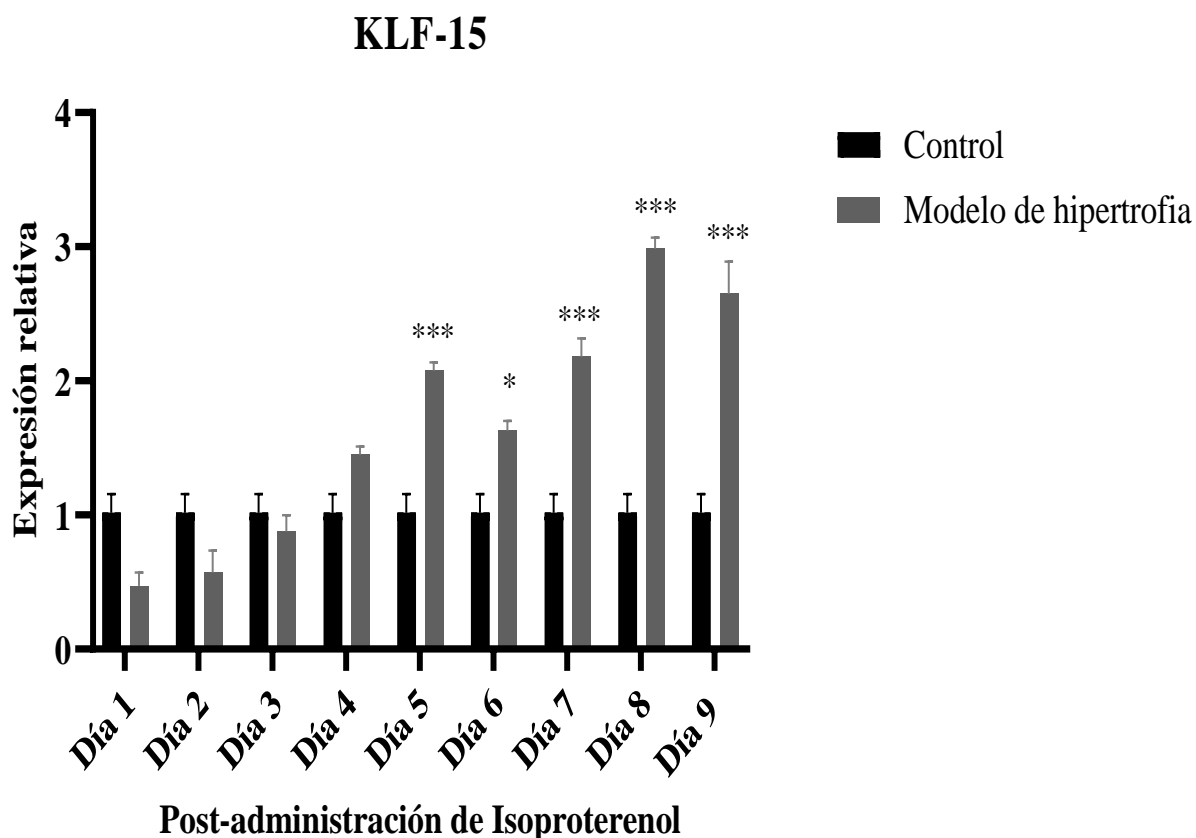
prácticamente se duplican en cada uno de los días analizados, en comparación con su expresión en el animal de experimentación control (**Gráfica 11**).



Gráfica 12. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

Respecto al gen de KLF-13, se han observado cambios significativos en su expresión a lo largo del período de estudio, destacando incrementos notables en puntos específicos. En particular, se han identificado aumentos más pronunciados en los días 3 y 8 después del insulto cardíaco, en comparación con el grupo de control. Durante el día 3, se ha evidenciado un aumento estadísticamente significativo en la expresión de KLF-13, llegando a alcanzar un incremento de aproximadamente 3.8 veces en comparación con el grupo de control.

Asimismo, en el día 8, se ha observado otro incremento significativo en la expresión de KLF-13, con un aumento de aproximadamente 4.7 veces en comparación con el grupo de control (Gráfica 12).

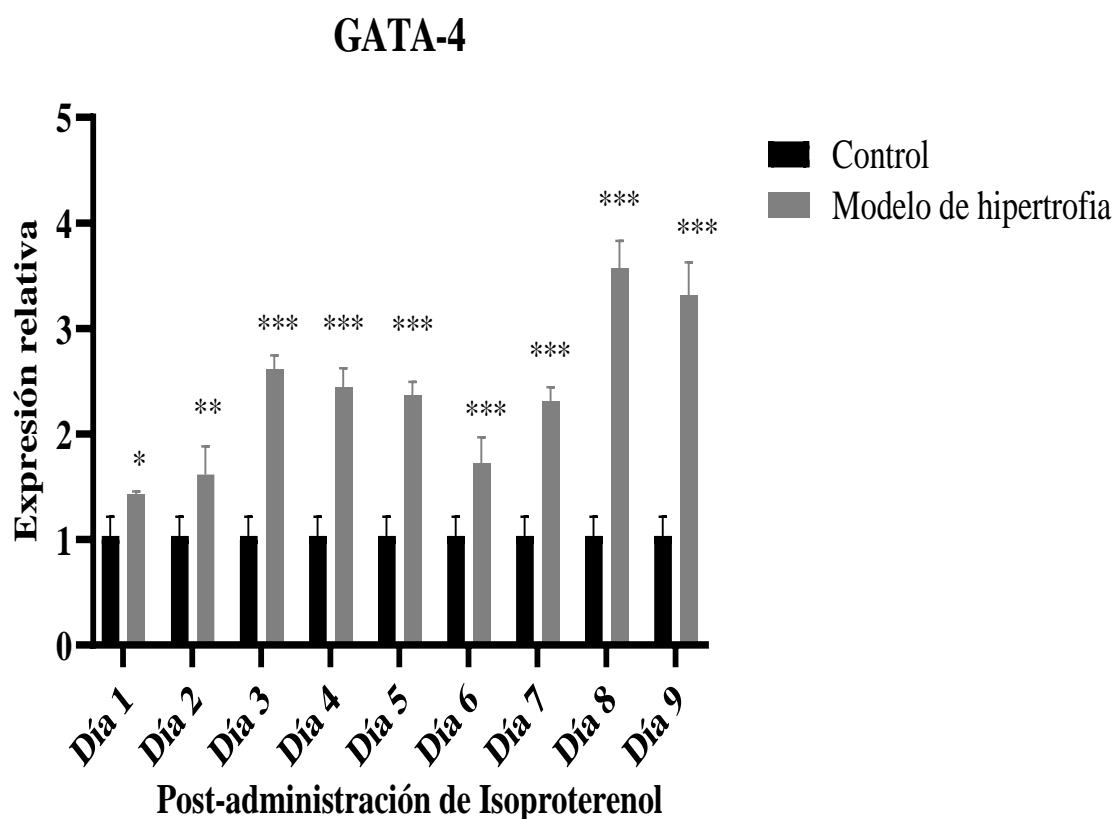


Gráfica 13. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

En el contexto del gen KLF-15, se ha identificado un incremento significativo y prácticamente progresivo en su expresión a lo largo del período de estudio. Específicamente, se ha observado un aumento constante en la expresión de KLF-15 a partir del día cinco, alcanzando su punto máximo en el día ocho, donde llega a expresarse casi tres veces más con respecto al control (Gráfica 13).

En el contexto del gen Gata4, se ha observado un incremento significativo en la expresión de Gata4 a partir de las 8 y 24 horas posteriores a la inducción del daño, según se muestra en la **Gráfica 14**.

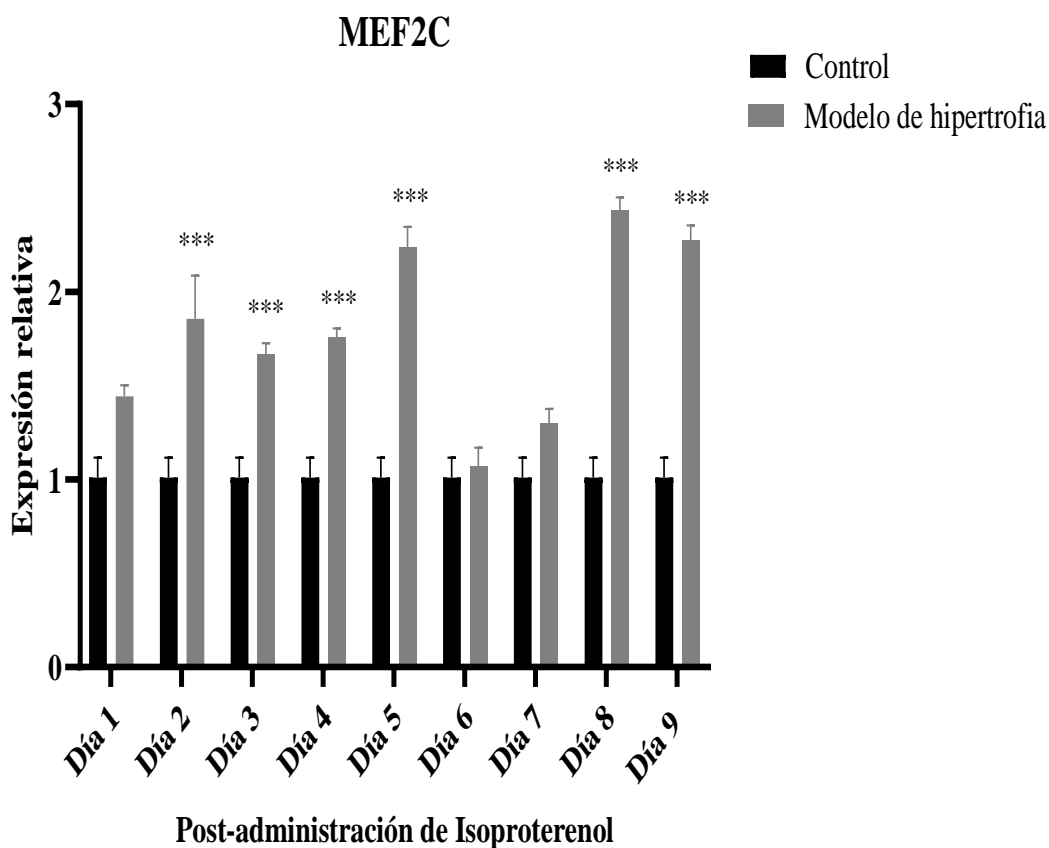
Este aumento en la expresión génica de Gata4 fue casi progresivo en la mayoría de los puntos analizados a lo largo del período de estudio. Específicamente, se ha observado un incremento gradual en la expresión de Gata4, alcanzando niveles casi cuatro veces más elevados en los días ocho y nueve, en comparación con los niveles de expresión en el grupo de control.



Gráfica 14. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

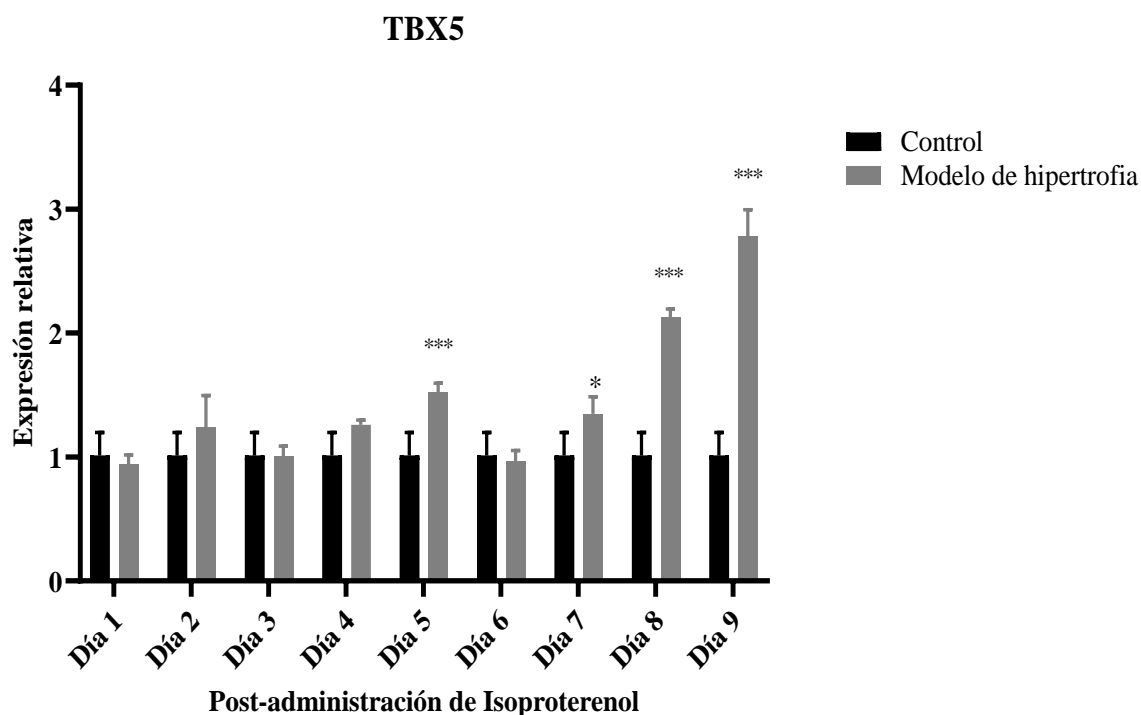
Durante el transcurso del estudio, se pudo determinar que el gen Mef2c experimentó un patrón de expresión a lo largo de los días de análisis.

Llama la atención que, al igual que en el gen Gata4, el gen Mef2c alcanzó su punto máximo de expresión en el noveno día de seguimiento. En este punto, los niveles de expresión de Mef2c se elevaron aproximadamente 2.5 veces en comparación con el grupo de control (Gráfica 15).



Gráfica 15. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

En el contexto del gen Tbx5, se realizaron interesantes observaciones en cuanto a su perfil de expresión a lo largo del tiempo. Durante los primeros cinco días posteriores a la administración de isoproterenol, se mantuvo una expresión relativamente estable de Tbx5, sin grandes variaciones en comparación con el grupo de control. Sin embargo, a partir del quinto día, se observó un incremento casi progresivo en su expresión, que continuó de manera ascendente hasta alcanzar su punto máximo alrededor del noveno día. Al llegar al noveno día, la expresión relativa de Tbx5 experimentó un notable incremento, aproximadamente triplicando su nivel en comparación con el grupo de control (**Gráfica 16**).



Gráfica 16. Datos de expresión génica normalizada a GAPDH y expresada como media  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0,001$  frente al control.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Expresión génica relativa de KLF-3

En relación con los resultados obtenidos, se observó un incremento significativo en la expresión del gen KLF-3 durante los primeros días posteriores al daño cardíaco, alcanzando casi el doble en el tercer día en comparación con el grupo de control. Sin embargo, dicha expresión disminuyó y se mantuvo suprimida del cuarto al noveno día (**Gráfica 6**). En estudios previos se ha identificado que KLF-3 se expresa principalmente en células eritroides, donde desempeña la función de reprimir genes innecesarios para la eritropoyesis (Funnell *et al.*, 2012). En el contexto cardíaco, existe un único estudio que ha demostrado una relación entre KLF-3 y el tejido cardíaco, el cual data del año 2013. En este estudio, se encontró que una variante con pérdida de función de KLF-3 se asoció con alteraciones en el desarrollo del corazón, tales como el engrosamiento de las valvas aórticas y, de forma relevante para este proyecto, un marcado crecimiento biventricular (Kelsey *et al.*, 2013). Estos hallazgos sugieren que, en nuestro modelo, una menor expresión de KLF-3 podría contribuir al desarrollo de hipertrofia cardíaca, de manera similar a lo observado en la variante con pérdida de función.

En cuanto al incremento en la expresión de KLF-3 en el tercer día después de la inducción del daño cardíaco, si esto se correlaciona con la historia natural de la reparación postinfarto (**Ilustración 1**), podemos observar que el pico de máxima expresión de este factor se encuentra dentro de lo que se conoce como la fase inflamatoria de reparación, donde se produce la secreción de mediadores proinflamatorios (Ferrini *et al.*, 2019). En este punto, se presume que KLF-3 podría regular este proceso inflamatorio, puesto que en estudios previos se ha demostrado que KLF-3 es capaz de reprimir al factor de transcripción p65 (RELA), una subunidad del complejo proteico factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B), y de esta forma, suprimir la expresión de genes proinflamatorios inducidos por esta vía, entre los que destacan el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e Interleucinas 6, 1B, 1A, entre otros (Knights *et al.*, 2020).



## ***8.2 Expresión génica relativa de KLF-4***

En el caso específico de KLF4, se pudo observar un incremento significativo en la expresión relativa normalizada a GAPDH durante los días 2 y 3 del estudio (**Gráfica 7**). KLF4 es ampliamente reconocido como uno de los factores de transcripción Krüppel-like más estudiados y relevantes, ya que forma parte de los 4 factores de Yamanaka utilizados para la inducción de pluripotencialidad en células somáticas (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Hasta la fecha, se ha avanzado considerablemente en la comprensión de las diversas vías de señalización y genes que son regulados por KLF4, siendo uno de ellos el importante factor de transcripción p53. Estudios previos han revelado que KLF4 es capaz de ejercer una influencia inhibitoria sobre las proteínas p53 y BAX en el contexto de daño al ADN causado por radiación ultravioleta, lo que resulta en la detención del proceso apoptótico (Ghaleb *et al.*, 2017).

Si relacionamos estos resultados con la historia natural de la reparación postinfarto, podemos destacar una característica esencial de la fase inflamatoria, la cual implica la muerte de cardiomiocitos (Ferrini *et al.*, 2019) (**Ilustración 1**). Es en este contexto que el aumento en la expresión de KLF4 en el tercer día adquiere relevancia, sugiriendo que KLF4 podría actuar como un mecanismo compensatorio contra la muerte de cardiomiocitos. Este hallazgo plantea la posibilidad de que KLF4 desempeñe un papel protector en la respuesta inflamatoria y en la preservación de la integridad cardíaca durante la fase inicial de la reparación postinfarto.

## ***8.3 Expresión génica relativa de KLF-6***

En cuanto al gen KLF-6, se encontró un aumento en la expresión relativa en el segundo día y de manera más marcada en el tercer día, para luego mantenerse en niveles similares al grupo de control (**Gráfica 8**).

KLF-6 se ha descrito típicamente como un gen supresor tumoral, que se ha encontrado inactivo en cánceres como el colorrectal y de próstata (Huang *et al.*, 2008). Sin embargo, en el hígado, se ha observado que KLF-6 se regula al alza de manera importante en las células estrelladas hepáticas, lo que sugiere un papel como regulador de la fibrosis en este órgano, posiblemente por su capacidad de transactivar el promotor de colágena 1 alfa 1 (COL1 $\alpha$ 1) (Ratziu *et al.*, 1998).

En relación con el tejido cardíaco, existe un único reporte que demuestra que la delección heterocigota de KLF-6 resulta en una reducción del tejido fibrótico en un modelo de fibrosis cardíaca inducida por la infusión de Angiotensina durante 14 días. En dicho estudio, se demostró que KLF-6 tiene como objetivo directo a la Trombospondina 4 (TSP4), y que la delección heterocigota de KLF-6 se asoció con una sobreexpresión de TSP4 y una reducción en los marcadores de activación de los fibroblastos en dicho modelo (MMP9, TGFB1, CTGF, COL1A, entre otros) (Sawaki *et al.*, 2015). Por lo tanto, en dicho estudio se sugiere que KLF-6 desempeña un papel como regulador de la fibrosis cardíaca, no obstante, en nuestro modelo de hipertrofia, solo se encontró una sobreexpresión de KLF-6 en los días 2 y 3, durante la fase inicial de la reparación cardíaca.

#### ***8.4 Expresión génica relativa de KLF-11***

En relación con KLF-11, se ha observado un incremento estadísticamente significativo en su expresión a partir del tercer día del estudio, el cual se incrementa de manera gradual hasta el sexto día, para luego disminuir (**Gráfica 9**). Estos resultados contrastan con el único estudio realizado hasta la fecha sobre el papel de KLF-11 en el miocardio dañado, donde se demostró que la inducción de insuficiencia cardíaca mediante métodos farmacológicos (Infusión con Angiotensina II o con Isoproterenol) y quirúrgicos (Constricción de la aorta transversa) se asoció con la subexpresión de este factor (Zheng *et al.*, 2014).

Sin embargo, es importante destacar que, en el estudio anteriormente mencionado, los niveles de ARNm y proteína de KLF-11 solo fueron cuantificados en el día 28, en el contexto de una insuficiencia cardíaca ya establecida. Este hecho puede explicar las diferencias encontradas

en nuestro modelo de estudio, ya que se están analizando los cambios en la expresión de KLF-11 únicamente durante la fase temprana de la reparación. Es posible que la variación en los resultados se deba a las diferencias en los momentos de muestreo y en los estados fisiopatológicos evaluados.

### ***8.5 Expresión génica relativa de KLF-12***

En el caso de KLF-12, se ha encontrado un incremento estadísticamente significativo en su expresión a lo largo de todos los días del estudio, llegando a duplicarse prácticamente en cada uno de ellos (**Gráfica 10**). A pesar de estos hallazgos, hay que destacar que, hasta el momento, no se le ha atribuido una función fisiológica específica a KLF-12 ni tampoco a otros miembros de la familia KLF, como KLF-17 y KLF-18 (Pollak *et al.*, 2018).

La falta de conocimiento sobre la función precisa de KLF-12 ha generado un interés científico para comprender mejor su papel en diversos procesos biológicos. Aunque la información disponible es limitada, se han realizado investigaciones en contextos patológicos como el cáncer de ovario, donde se ha observado que el microARN-141 promueve la resistencia a la anoikis (muerte celular desencadenada por la pérdida de contacto con la matriz extracelular) y la progresión metastásica al reprimir la expresión de KLF-12. Esta represión a su vez permite la transcripción de la Survivina, un inhibidor de la apoptosis (Mak *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que, en este estudio específico, se atribuye un efecto proapoptótico a KLF-12, lo que implica un posible papel en el control de la muerte celular programada. Sin embargo, en el contexto de las enfermedades cardiovasculares, el papel exacto de KLF-12 aún sigue siendo desconocido y requiere de investigaciones adicionales.

## ***8.6 Expresión génica relativa de KLF-13***

En cuanto a KLF-13, se encontró un aumento estadísticamente significativo en su expresión en varios puntos analizados, con incrementos más pronunciados en el día 3 y día 8 después del insulto cardíaco (**Gráfica 11**).

A diferencia de KLF-4, KLF-13 fue descrito inicialmente como una proteína pro-apoptótica que inhibe BCL-XL, proteína que retrasa o detiene la muerte celular. Esto se observó en un modelo murino knock-out para KLF-13, donde se encontró un aumento en el tamaño del bazo debido a una mayor sobrevida de los esplenocitos (Zhou, 2007). Resultados similares se han observado en tejido cardíaco infartado mediante ligadura de la arteria coronaria izquierda, donde se observó un aumento en la muerte celular en ensayos de túnel y un mayor porcentaje de tejido fibrosado al inhibir la degradación de KLF-13 en el día 3 (Bayoumi *et al.*, 2018). Comparando con nuestros resultados, podemos inferir que el aumento de KLF-13 en el día 3, a diferencia de KLF-4, promueve la muerte de cardiomiocitos.

Adicionalmente, KLF-13 colabora con GATA-4 para activar los péptidos natriuréticos A y B, los cuales son marcadores de estrés patológico que promueven la secreción de TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e IL-1 $\beta$  (Lavallée *et al.*, 2006). Considerando la historia natural de la enfermedad, el día de máxima expresión de KLF-13, que fue el día 8, coincide con la fase proliferativa de la reparación postinfarto, la cual se caracteriza por la secreción de mediadores proinflamatorios (Ferrini *et al.*, 2019). Por lo tanto, se sugiere que KLF-13 podría tener un efecto proinflamatorio indirecto, a través de la regulación del Péptido Auricular Natriurético.

## ***8.7 Expresión génica relativa de KLF-15***

En relación con KLF-15, se ha observado un incremento casi progresivo en su expresión a partir del día cinco, alcanzando su punto máximo en el día ocho (**Gráfica 12**).

KLF-15 desempeña un papel crucial como factor regulador durante el desarrollo natural del corazón. Durante el período embrionario, se encuentra inactivo, pero experimenta un aumento drástico en su expresión en los primeros días después del nacimiento, donde funciona como un antagonista de la hipertrofia patológica (Prodosimo *et al.*, 2014). Uno de los mecanismos clave mediante los cuales KLF-15 ejerce su función es a través de la represión directa de los factores de transcripción MEF2 y GATA4. KLF-15 bloquea las regiones de unión al ADN de estos factores, impidiendo así su actividad transcripcional y su implicación en la hipertrofia cardíaca patológica. Además, KLF-15 inhibe la interacción del factor de respuesta al suero con su coactivador, la miocardina. Esta inhibición conduce a una disminución en la expresión de genes relacionados con el crecimiento cardíaco y la fibrosis (Prodosimo *et al.*, 2014).

El aumento observado en la expresión de KLF-15 en nuestro estudio podría ser interpretado como un intento del organismo de limitar la remodelación patológica del miocardio dañado. Es posible que este incremento en KLF-15 sea una respuesta adaptativa destinada a contrarrestar los efectos perjudiciales de la hipertrofia cardíaca y la fibrosis excesiva. Estos hallazgos respaldan la importancia de KLF-15 como un regulador crítico en la homeostasis cardíaca y la respuesta al daño cardíaco.

### ***8.8 Expresión génica relativa de GATA-4***

En relación con el gen *Gata4*, se observó un incremento significativo en la expresión génica a partir de las 8 y 24 horas posteriores a la inducción del daño (**Gráfica 13**). Este aumento fue progresivo en la mayoría de los puntos analizados, alcanzando casi cuatro veces más expresión en los días ocho y nueve. Después de experimentar un estímulo hipertrófico inducido por el infarto, el corazón responde activando la cascada de señalización de la quinasa MAPK. Como resultado, se produce una fosforilación significativa de *Gata4*, lo cual favorece la transcripción de genes pro-hipertróficos (Tenhunen *et al.*, 2004). *Gata4* es un factor de transcripción que regula directamente la expresión de varios genes específicos del corazón, como el gen de la cadena pesada de miosina alfa (*Myh6*), la troponina C (*Tnnc1*),

la troponina I (Tnni3), los péptidos natriuréticos A y B (Nppa y Nppb, respectivamente), así como genes relacionados con el transporte de iones, como el intercambiador de sodio-calcio cardíaco (Slc8a1) (Dirkx *et al.*, 2013). Estudios anteriores en modelos murinos han demostrado que la sobreexpresión específica de Gata4 puede inducir hipertrofia cardíaca, como lo evidenció Liang *et al.* (2001), quienes utilizaron animales transgénicos capaces de expresar Gata4 2.5 veces más que los individuos salvajes y observaron un aumento del área superficial de los cardiomiocitos de más del doble en comparación con el grupo de control.

### **8.9 Expresión génica relativa de MEF2C**

El gen *Mef2c* alcanzó su punto máximo de expresión en el noveno día, con niveles aproximadamente 2.5 veces más altos que el grupo de control (**Gráfica 14**).

*Mef2c* desempeña un papel crucial en la regulación de procesos similares a Gata4 en el corazón. Es responsable de la regulación de genes cardíacos implicados en la contracción y el crecimiento del corazón. Algunos de estos genes incluyen el gen de la creatinina cinasa muscular (*Ckm*), la cadena pesada de miosina isoforma alfa (*Myh6*), la cadena ligera de miosina 1 y 2 (*My11* y *My12*, respectivamente), la actina alfa esquelética (*Acta1*), la troponina T (*Tnnt2*) y la ATPasa 1 de calcio del retículo sarcoplásmico (*Atp2a2*), entre otros (Dirkx *et al.*, 2013).

Estudios previos realizados en modelos murinos de hipertrofia inducida por sobrecarga de presión han demostrado que el silenciamiento de *Mef2c* mediante ARN de interferencia puede atenuar significativamente el crecimiento cardíaco hipertrófico. Esto se refleja en una disminución en el diámetro de los miocitos y en una reducción de la cantidad de fibras de colágeno secretadas en la matriz extracelular (Pereira *et al.*, 2009). Estos hallazgos confirman el papel importante de *Mef2c* en la hipertrofia cardíaca y su implicación en la respuesta adaptativa del corazón ante el estrés.

### **8.10 Expresión génica relativa de TBX5**

En relación con el gen *Tbx5*, se observó una expresión estable hasta el quinto día, a partir del cual comenzó a aumentar de forma progresiva, alcanzando su punto máximo alrededor del noveno día después de la administración de isoproterenol. En comparación con el grupo de control, la expresión relativa de *Tbx5* casi se triplicó en este punto (**Gráfica 15**).

Al igual que los genes *Gata4* y *Mef2c*, *Tbx5* desempeña un papel crucial en la regulación de genes importantes para el desarrollo y la conductividad cardíaca. Algunos de los genes que se sabe que son regulados por *Tbx5* incluyen *Nppa*, el factor de respuesta al suero (*Srf*) y la conexina 40 (*Cx40*), entre otros (Ng *et al.*, 2002).

Estudios anteriores realizados en modelos de hipertrofia inducida por angiotensina II han demostrado que el silenciamiento de *Tbx5* conduce a una considerable disminución en el tamaño de los cardiomiocitos. Además, se observó una reducción en la expresión génica de factores relacionados con el estrés y la hipertrofia cardíaca, como *Nppa* y la isoforma beta de la cadena pesada de miosina (*Myh7*), respectivamente (Wang *et al.*, 2017).

Estos hallazgos sugieren que el incremento observado en la expresión de *Tbx5* en nuestro estudio puede estar relacionado con la respuesta compensatoria del corazón frente al daño y el estrés cardíaco. *Tbx5* desempeña un papel crucial en la regulación de genes involucrados en el crecimiento y la función del corazón, y su aumento de expresión podría ser un mecanismo adaptativo para promover la función cardíaca normal.

## 9. CONCLUSIONES

- En este estudio se encontró que las dosis de Clorhidrato de Isoproterenol mayores de 65 mg/kg fueron letales en nuestro modelo animal, sin embargo, esta cantidad fue suficiente para inducir crecimiento cardíaco. Adicionalmente, la administración de isoproterenol indujo la elevación de marcadores tanto de hipertrofia, como de estrés cardíaco.
- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los patrones de expresión génica de los diferentes KLFs en el modelo murino de hipertrofia patológica en comparación con el control.
- La inducción de insulto cardíaco con isoproterenol permitió la reactivación de un programa de genes fetales cardíacos (*Gata4*, *Mef2c*, *Tbx5*), los cuales son capaces de activar la transcripción de genes pro-hipertróficos.

A continuación, se presenta un resumen gráfico de los posibles efectos atribuidos a los diferentes KLFs, a lo largo de la historia natural de la reparación cardíaca (**Ilustración 29**).



## 10. RESUMEN GRÁFICO

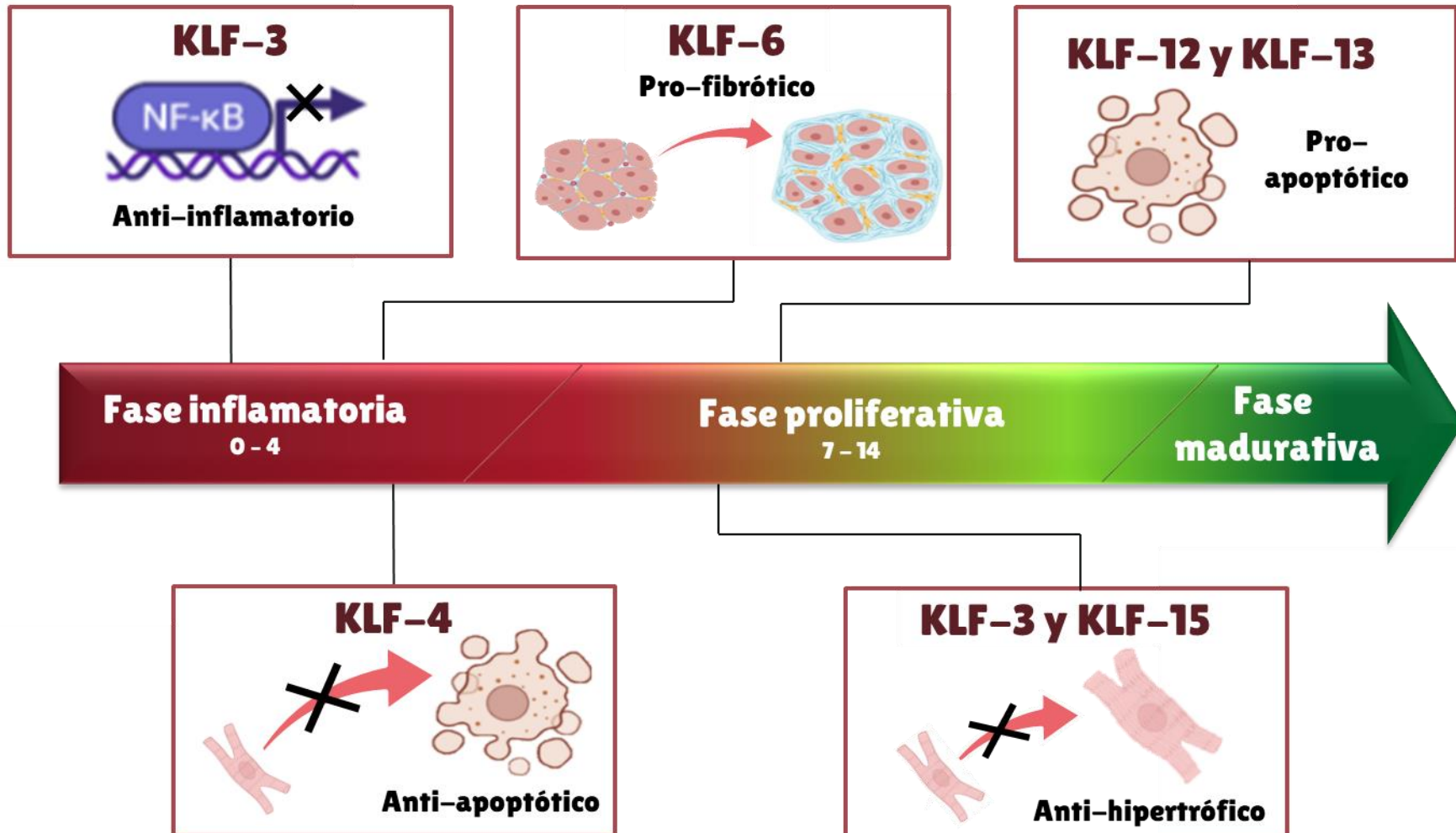
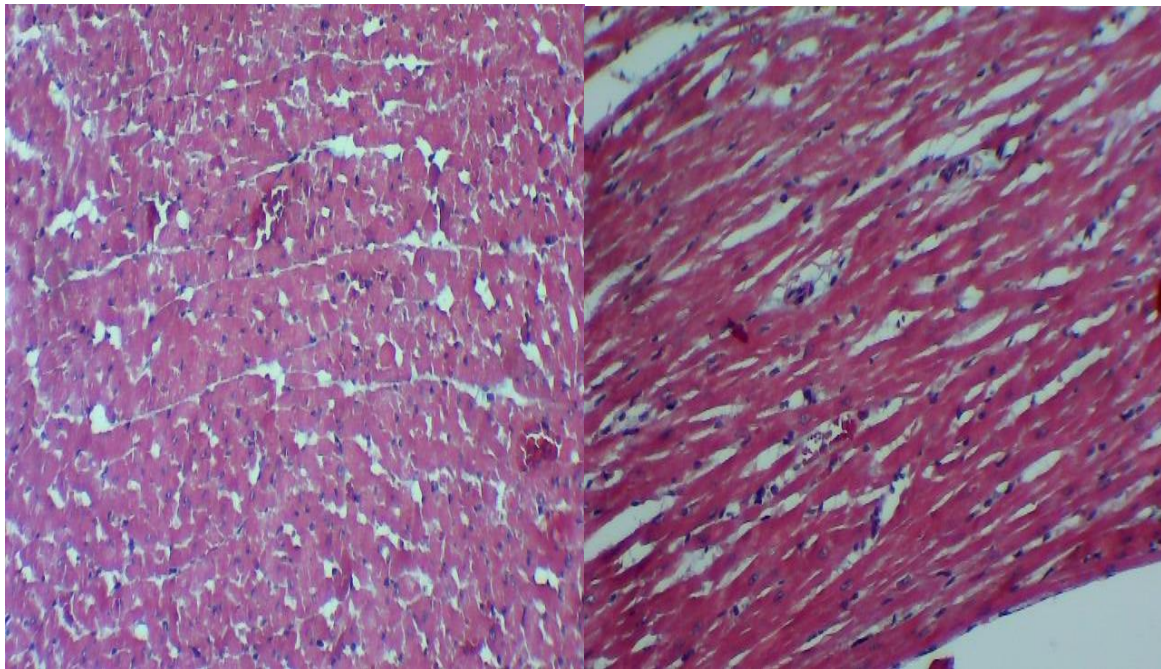


Ilustración 29. Resumen gráfico. Posibles funciones atribuidas a los KLFs analizados.

## 11. PERSPECTIVAS

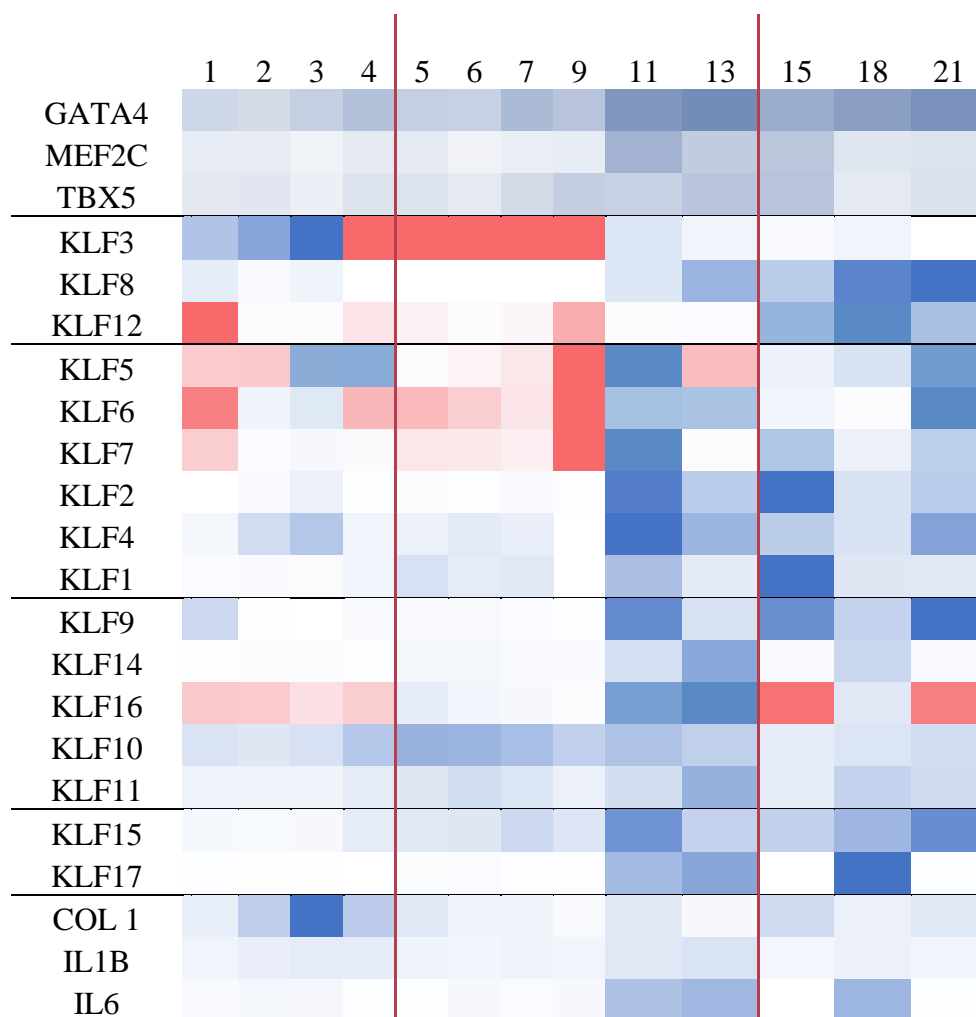
En el futuro, con el fin de complementar este trabajo de investigación, se sugiere la realización de cortes histológicos del tejido cardíaco, así como también, evaluar fases posteriores de la enfermedad. De igual forma, sería interesante cuantificar marcadores moleculares de fibrosis e inflamación, y realizar inmunohistoquímica de los productos proteicos de los genes diana de los distintos KLFs.

Ya se ha iniciado el trabajo referente al análisis morfológico del tejido cardíaco, en conjunto con el Maestro en Ciencias Víktor Javier Romero Díaz, perteneciente al Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con quien se colabora para la realización de tinciones de Hematoxilina y Eosina y Tricrómico de Masson (Figura 30).

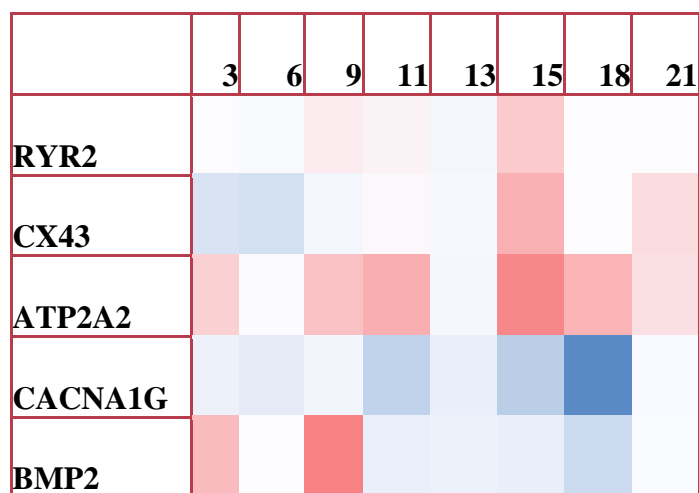


*Ilustración 30. Corte histológico de corazón control en tinción de Tricrómico de Masson 300x.*

De igual forma, hemos iniciado el estudio de fases posteriores al noveno día después de la administración de isoproterenol, incluyendo una gama más amplia de KLFs, marcadores de inflamación y fibrosis, así como también, genes relacionados a canales iónicos cardíacos, involucrados en el proceso de contracción (**Gráfica 17 y 18**).



*Gráfica 17. Expresión génica relativa cardíaca de factores de diferenciación, KLFs, Colágena 1 y citocinas proinflamatorias tras la administración de isoproterenol.*



Gráfica 18. Expresión génica relativa cardíaca de diferentes canales iónicos cardíacos y de la Proteína Morfogénica de Hueso 2 (BMP2).

Los resultados obtenidos en este estudio serán analizados y detallados en el manuscrito original en proceso de preparación, el cual se centrará en los hallazgos y conclusiones derivados de este proyecto de investigación.

## 12. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1. **Santoyo-Suarez, M. G.**, Mares-Montemayor, J. D., Padilla-Rivas, G. R., Delgado-Gallegos, J. L., Quiroz-Reyes, A. G., Roacho-Perez, J. A., ... & Islas, J. F. (2023). The Involvement of Krüppel-like Factors in Cardiovascular Diseases. *Life*, 13(2), 420.
2. Padilla-Rivas, G. R., Delgado-Gallegos, J. L., Garza-Treviño, G., Galan-Huerta, K. A., Zuca, G., Roacho-Pérez, J. A., **Santoyo-Suárez, M.G.** ... & Islas, J. F. (2022). Association between mortality and cardiovascular diseases in the vulnerable Mexican population: A cross-sectional retrospective study of the COVID-19 pandemic. *Frontiers in Public Health*, 10.
3. Padilla Rivas, G., **Santoyo-Suarez, M. G.**, Benitez-Chao, D. F., Galan-Huera, K., Franco-Villareal, H., Garza-Treviño, E. N., & Islas, J. F. A Panoramic View of Hospitalized Young Children in the Metropolitan Area of the Valley of Mexico during COVID-19. Available at SSRN 4425299.
4. **Santoyo Suárez, M. G.**, Mares Montemayor, J. D., García Loredo, J. A., Treviño Garza, E. N., Arevalos Martínez, G., Garza Ocañas, L., Padilla Rivas, G. R., Ascacio Martínez, J. Á., & Islas Cisneros, J. F. (2023). Evaluación de la Expresión de Factores de Desarrollo Cardíaco en un Modelo Murino de Infarto Agudo al Miocardio. En Congreso Internacional de Investigación Academia Journals, Monterrey, México. Recuperado de: <https://static1.squarespace.com/static/55564587e4b0d1d3fb1eda6b/t/64176a7248e6e97cd3ebfa14/1679256181858/Tomo+02+-+Ciencias+de+la+Salud+-+Art%C3%ADculos+AJ+Monterrey+2023.pdf>

### 13. REFERENCIAS

- Abel, P., & Rorabaugh, B. (2007). Isoproterenol. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1-7). Elsevier Inc..
- Abhinav, P., Zhang, G.-F., Zhao, C.-M., Xu, Y.-J., Wang, J., & Yang, Y.-Q. (2022). A novel KLF13 mutation underlying congenital patent ductus arteriosus and ventricular septal defect, as well as bicuspid aortic valve. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(4). <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11240>
- Adam, P. J., Regan, C. P., Hautmann, M. B., & Owens, G. K. (2000). Positive-and negative-acting Krüppel-like transcription factors bind a transforming growth factor  $\beta$  control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22 $\alpha$  in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37798-37806.
- Ali, A., Redfors, B., Lundgren, J., Alkhoury, J., Oras, J., Gan, L. M., & Omerovic, E. (2020). The importance of heart rate in isoprenaline-induced takotsubo-like cardiac dysfunction in rats. *ESC Heart Failure*, 7(5), 2690-2699.
- Baeyens, N., Bandyopadhyay, C., Coon, B. G., Yun, S., & Schwartz, M. A. (2016). Endothelial fluid shear stress sensing in vascular health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 126(3), 821-828.
- Baynes, J. W., & Dominiczak, M. H. (2019). *Bioquímica médica*. Elsevier.
- Bayoumi, A. S., Park, K. M., Wang, Y., Teoh, J. P., Aonuma, T., Tang, Y., ... & Kim, I. M. (2018). A carvedilol-responsive microRNA, miR-125b-5p protects the heart from acute myocardial infarction by repressing pro-apoptotic bak1 and klf13 in cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 114, 72-82.
- Blanco, F. (2018). Macro-and microvascular complications of diabetes: Studies on NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) as a novel target for the treatment of atherosclerosis and vascular dysfunction in diabetes.
- Boarescu, P. M., Chirilă, I., Bulboacă, A. E., Bocșan, I. C., Pop, R. M., Gheban, D., & Bolboacă, S. D. (2019). Effects of curcumin nanoparticles in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
- Brayer, K. J., & Segal, D. J. (2008). Keep your fingers off my DNA: protein–protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell biochemistry and biophysics*, 50(3), 111-131.

- Brennan, E., Kantharidis, P., Cooper, M. E., & Godson, C. (2021). Pro-resolving lipid mediators: regulators of inflammation, metabolism and kidney function. *Nature Reviews Nephrology*, 17(11), 725-739.
- Brown, O. R., Demots, H., Kloster, F. E., Roberts, A., Menashe, V. D., & Beals, R. K. (n.d.). Aortic Root Dilatation and Mitral Valve Prolapse in Marfan's Syndrome An Echocardiographic Study. <http://ahajournals.org>
- BurrIDGE, P. W., Keller, G., Gold, J. D., & Wu, J. C. (2012). Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell stem cell*, 10(1), 16-28.
- Castillo, J. S. P., & Sánchez, F. L. (2017). Insuficiencia cardíaca. Generalidades. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(35), 2085-2091.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Data and statistics on congenital heart defects.
- Centro Nacional de Transplantes [CENATRA]. (2021). Reporte Anual 2021: Receptores, Donación y Trasplantes en México. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/692109/Anual2021.pdf>
- Chang, E., Nayak, L., & Jain, M. K. (2017). Krüppel-like factors in endothelial cell biology. *Current opinion in hematology*, 24(3), 224-229.
- Chinnadurai, G. (2002). CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Molecular cell*, 9(2), 213-224.
- Chinnadurai, G. (2007). CtBP family proteins. In *GtBP Family Proteins* (pp. 1-17). Springer, New York, NY.
- Chinnadurai, G. (2007). Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(9), 1593-1607.
- Cordes, K. R., Sheehy, N. T., White, M. P., Berry, E. C., Morton, S. U., Muth, A. N., ... & Srivastava, D. (2009). miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, 460(7256), 705-710.
- Dahiya, Nisha Rani *et al.* "The Sin3A/MAD1 Complex, through Its PAH2 Domain, Acts as a Second Repressor of Retinoic Acid Receptor Beta Expression in Breast Cancer Cells." *Cells* vol. 11,7 1179. 31 Mar. 2022, doi:10.3390/cells11071179

- Darwich, R., Li, W., Yamak, A., Komati, H., Andelfinger, G., Sun, K., & Nemer, M. (2017). KLF13 is a genetic modifier of the Holt-Oram syndrome gene TBX5. *Human Molecular Genetics*, 26(5), 942–954. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx009>
- Di, R. M., Yang, C. X., Zhao, C. M., Yuan, F., Qiao, Q., Gu, J. N., ... & Yang, Y. Q. (2020). Identification and functional characterization of KLF5 as a novel disease gene responsible for familial dilated cardiomyopathy. *European journal of medical genetics*, 63(4), 103827.
- Dirx, E., da Costa Martins, P. A., & De Windt, L. J. (2013). Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1832(12), 2414-2424.
- Dobaczewski, M., Bujak, M., Zymek, P., Ren, G., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2006). Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell and tissue research*, 324(3), 475-488.
- Drosatos, K., Pollak, N. M., Pol, C. J., Ntziachristos, P., Willecke, F., Valenti, M. C., ... & Goldberg, I. J. (2016). Cardiac myocyte KLF5 regulates Ppara expression and cardiac function. *Circulation research*, 118(2), 241-253.
- Duell, P. B., Welty, F. K., Miller, M., Chait, A., Hammond, G., Ahmad, Z., ... & American Heart Association Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Hypertension; Council on the Kidney in Cardiovascular Disease; Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; and Council on Peripheral Vascular Disease. (2022). Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Cardiovascular Risk: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 10-1161.
- Ferrini, A., Stevens, M. M., Sattler, S., & Rosenthal, N. (2019). Toward regeneration of the heart: bioengineering strategies for immunomodulation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 26.
- Fisch, S., Gray, S., Heymans, S., Haldar, S. M., Wang, B., Pfister, O., ... & Jain, M. K. (2007). Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7074-7079.
- Francula-Zaninovic, S., & Nola, I. A. (2018). Management of measurable variable cardiovascular disease'risk factors. *Current cardiology reviews*, 14(3), 153-163.



- Funnell, Alister PW, *et al.* "The CACCC-binding protein KLF3/BKLF represses a subset of KLF1/EKLF target genes and is required for proper erythroid maturation in vivo." *Molecular and cellular biology* 32.16 (2012): 3281-3292.
- Galkina, E., & Ley, K. (2007). Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(11), 2292-2301.
- Garcia-Pavia, P., Syrris, P., Salas, C., Evans, A., Mirelis, J. G., Cobo-Marcos, M., ... & Elliott, P. M. (2011). Desmosomal protein gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation: a clinicopathological study. *Heart*, 97(21), 1744-1752.
- Garvey, S. M., Sinden, D. S., Schoppee Bortz, P. D., & Wamhoff, B. R. (2010). Cyclosporine up-regulates Krüppel-like factor-4 (KLF4) in vascular smooth muscle cells and drives phenotypic modulation in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 333(1), 34–42. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.163949>
- Gaziano, T., Reddy, K. S., Paccaud, F., Horton, S., & Chaturvedi, V. (2006). Cardiovascular disease. *Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd edition.*
- Ghaleb, A. M., & Yang, V. W. (2017). Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*, 611, 27-37.
- Gomez, D., & Owens, G. K. (2012). Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, 95(2), 156-164.
- Gray, S., Feinberg, M. W., Hull, S., Kuo, C. T., Watanabe, M., Banerjee, S. S., ... & Jain, M. K. (2002). The Krüppel-like Factor KLF15 Regulates the Insulin-sensitive Glucose Transporter GLUT4. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34322-34328.
- Grimm, D., Elsner, D., Schunkert, H., Pfeifer, M., Griese, D., Bruckschlegel, G., ... & Kromer, E. P. (1998). Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin–angiotensin system. *Cardiovascular research*, 37(1), 91-100.
- Hoffman, M., Palioura, D., Kyriazis, I. D., Cimini, M., Badolia, R., Rajan, S., ... & Drosatos, K. (2021). Cardiomyocyte Krüppel-like factor 5 promotes de novo ceramide biosynthesis and contributes to eccentric remodeling in ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 143(11), 1139-1156.

- Horie, T., Ono, K., Nishi, H., Iwanaga, Y., Nagao, K., Kinoshita, M., ... & Kimura, T. (2009). MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 389(2), 315-320.
- Huang, X., Li, X., & Guo, B. (2008). KLF6 induces apoptosis in prostate cancer cells through up-regulation of ATF3. *Journal of biological chemistry*, 283(44), 29795-29801.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. (2021). *ESTADÍSTICA DE DEFUNCIONES REGISTRADAS DE ENERO A JUNIO DE 2021 (PRELIMINAR)*.
- Jenča, D., Melenovský, V., Stehlik, J., Staněk, V., Kettner, J., Kautzner, J., ... & Wohlfahrt, P. (2021). Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC heart failure*, 8(1), 222-237.
- Kaczynski, J., Cook, T., & Urrutia, R. (2003). Sp1-and Krüppel-like transcription factors. *Genome biology*, 4(2), 1-8.
- Kawata, M., Teramura, T., Ordoukhanian, P., Head, S. R., Natarajan, P., Sundaresan, A., ... & Lotz, M. K. (2022). Krüppel-like factor-4 and Krüppel-like factor-2 are important regulators of joint tissue cells and protect against tissue destruction and inflammation in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*.
- KLF13 loss-of-function variation contributes to familial congenital heart defects. (n.d.). <https://gnomad.broadinstitute.org>
- Kyriazis, I. D., Hoffman, M., Gaignebet, L., Lucchese, A. M., Markopoulou, E., Palioura, D., ... & Drosatos, K. (2021). KLF5 is induced by FOXO1 and causes oxidative stress and diabetic cardiomyopathy. *Circulation research*, 128(3), 335-357.
- Lavallée, G., Andelfinger, G., Nadeau, M., Lefebvre, C., Nemer, G., Horb, M. E., & Nemer, M. (2006). The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *The EMBO journal*, 25(21), 5201-5213.
- Lavallée, G., Andelfinger, G., Nadeau, M., Lefebvre, C., Nemer, G., Horb, M. E., & Nemer, M. (2006). The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *EMBO Journal*, 25(21), 5201-5213. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601379>

- Leenders, J. J., Wijnen, W. J., Hiller, M., van der Made, I., Lentink, V., van Leeuwen, R. E., ... & Creemers, E. E. (2010). Regulation of cardiac gene expression by KLF15, a repressor of myocardin activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27449-27456.
- Li, W., Li, B., Li, T., Zhang, E., Wang, Q., Chen, S., & Sun, K. (2020). Identification and analysis of KLF13 variants in patients with congenital heart disease. *BMC Medical Genetics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12881-020-01009-x>
- Liang, Q., De Windt, L. J., Witt, S. A., Kimball, T. R., Markham, B. E., & Molkenin, J. D. (2001). The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32), 30245-30253.
- Liu, H., Li, G., Zhao, W., & Hu, Y. (2016). Inhibition of MiR-92a may protect endothelial cells after acute myocardial infarction in rats: role of KLF2/4. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 22, 2451.
- Liu, R., Zhang, H. B., Yang, J., Wang, J. R., Liu, J. X., & Li, C. L. (2018). Curcumin alleviates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis through inhibition of autophagy and activation of mTOR. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(21), 7500-7508.
- López, J. A., Bellido, C. M., Simón, P. H., & Padial, L. R. (2017). Cardiopatía isquémica: concepto, clasificación, epidemiología, factores de riesgo, pronóstico y prevención. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(36), 2145-2152.
- Loyer, X., Potteaux, S., Vion, A. C., Guérin, C. L., Boulkroun, S., Rautou, P. E., ... & Tedgui, A. (2014). Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circulation research*, 114(3), 434-443.
- Mak, C. S., Yung, M. M., Hui, L., Leung, L. L., Liang, R., Chen, K., ... & Chan, D. W. (2017). MicroRNA-141 enhances anoikis resistance in metastatic progression of ovarian cancer through targeting KLF12/Sp1/survivin axis. *Molecular cancer*, 16(1), 1-17.
- McConnell, B. B., & Yang, V. W. (2010). Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiological reviews*, 90(4), 1337-1381.
- McDermott, D. A., Fong, J. C., & Basson, C. T. (1993). Holt-Oram Syndrome. University of Washington, Seattle, Seattle (WA). <http://europepmc.org/books/NBK1111>
- Memon, A., & Lee, W. K. (2018). KLF10 as a tumor suppressor gene and its TGF- $\beta$  signaling. *Cancers*, 10(6), 161.

- Miano, J. M. (2010). Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Laboratory investigation*, 90(9), 1274-1284.
- Mohl, W., Spitzer, E., Mader, R. M., Wagh, V., Nguemo, F., Milasinovic, D., ... & Serruys, P. W. (2018). Acute molecular effects of pressure-controlled intermittent coronary sinus occlusion in patients with advanced heart failure. *ESC heart failure*, 5(6), 1176-1183.
- Nemer, G., Fadlalah, F., Usta, J., Nemer, M., Dbaibo, G., Obeid, M., & Bitar, F. (2006). A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot. *Human Mutation*, 27(3), 293–294. <https://doi.org/10.1002/humu.9410>
- Ng, J. K., Kawakami, Y., Büscher, D., Raya, Á., Itoh, T., Koth, C. M., ... & Belmonte, J. C. I. (2002). The limb identity gene Tbx5 promotes limb initiation by interacting with Wnt2b and Fgf10.
- Noack, C., Zafiriou, M. P., Schaeffer, H. J., Renger, A., Pavlova, E., Dietz, R., ... & Zelarayán, L. C. (2012). Krueppel-like factor 15 regulates Wnt/ $\beta$ -catenin transcription and controls cardiac progenitor cell fate in the postnatal heart. *EMBO molecular medicine*, 4(9), 992-1007.
- Oishi, Y., & Manabe, I. (2018). Krüppel-like factors in metabolic homeostasis and cardiometabolic disease. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5, 69.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Las 10 principales causas de defunción*.
- Osborn, D. A. (2008). Evidence-based Evaluation of the Management of Neonatal Shock. *Hemodynamics and Cardiology: Neonatology Questions and Controversies*, 229.
- Paige, S. L., Plonowska, K., Xu, A., & Wu, S. M. (2015). Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation. *Circulation research*, 116(2), 341-353.
- Palioura, D., Lazou, A., & Drosatos, K. (2022). Krüppel-like factor (KLF) 5: An emerging foe of cardiovascular health. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 163, 56-66.
- Park, T. S., Hu, Y., Noh, H. L., Drosatos, K., Okajima, K., Buchanan, J., ... & Goldberg, I. J. (2008). Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of lipid research*, 49(10), 2101-2112.
- Patel, S. K., Wai, B., Lang, C. C., Levin, D., Palmer, C. N., Parry, H. M., ... & Burrell, L. M. (2017). Genetic variation in Kruppel like factor 15 is associated with left ventricular

hypertrophy in patients with type 2 diabetes: discovery and replication cohorts. *EBioMedicine*, 18, 171-178.

- Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M., & Bao, S. (2008). Krüppel-like transcription factors: a functional family. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(10), 1996-2001.
- Pedro-Botet, J., Climent, E., & Benaiges, D. (2020). Atherosclerosis and inflammation. New therapeutic approaches. *Medicina Clínica (English Edition)*, 155(6), 256-262.
- Pedroza, A. J., Tashima, Y., Shad, R., Cheng, P., Wirka, R., Churovich, S., Nakamura, K., Yokoyama, N., Cui, J. Z., Iosef, C., Hiesinger, W., Quertermous, T., & Fischbein, M. P. (2020). Single-Cell Transcriptomic Profiling of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Modulation in Marfan Syndrome Aortic Aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2195–2211. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314670>
- Pei, J., & Grishin, N. V. (2013). A new family of predicted Krüppel-like factor genes and pseudogenes in placental mammals. *PloS one*, 8(11), e81109.
- Pereira, A. H. M., Clemente, C. F., Cardoso, A. C., Theizen, T. H., Rocco, S. A., Judice, C. C., ... & Franchini, K. G. (2009). MEF2C silencing attenuates load-induced left ventricular hypertrophy by modulating mTOR/S6K pathway in mice. *PLoS One*, 4(12), e8472.
- Pol, C. J., Valenti, M. C., Schumacher, S. M., Yuan, A., Gao, E., Goldberg, I. J., ... & Drosatos, K. (2015). Klf5 and ppara expression is increased at the early stage and reduced at the late stage of myocardial ischemia/reperfusion in mice. *Circulation Research*, 117(suppl\_1), A113-A113.
- Pollak, N. M., Hoffman, M., Goldberg, I. J., & Drosatos, K. (2018). Krüppel-like factors: crippling and uncrippling metabolic pathways. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(1), 132-156.
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. *Circulation research*, 119(1), 91-112.
- PRODUCCION, C. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

- Prosdocimo, D. A., Anand, P., Liao, X., Zhu, H., Shelkay, S., Artero-Calderon, P., ... & Haldar, S. M. (2014). Kruppel-like factor 15 is a critical regulator of cardiac lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 5914-5924.
- Rane, M. J., Zhao, Y., & Cai, L. (2019). Krüppel-like factors (KLFs) in renal physiology and disease. *EBioMedicine*, 40, 743-750.
- Ratziu, V., Lalazar, A., Wong, L., Dang, Q., Collins, C., Shaulian, E., ... & Friedman, S. L. (1998). Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(16), 9500-9505.
- Rossano, J. W. (2020). Congenital heart disease: a global public health concern. *The Lancet Child & Adolescent Health*, 4(3), 168-169.
- Sarre-Álvarez, D., Cabrera-Jardines, R., Rodríguez-Weber, F., & Díaz-Greene, E. (2018). Enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Revisión de las escalas de riesgo y edad cardiovascular. *Medicina interna de México*, 34(6), 910-923.
- Sawaki, D., Hou, L., Tomida, S., Sun, J., Zhan, H., Aizawa, K., ... & Suzuki, T. (2015). Modulation of cardiac fibrosis by Krüppel-like factor 6 through transcriptional control of thrombospondin 4 in cardiomyocytes. *Cardiovascular research*, 107(4), 420-430.
- Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Côte, S., Preiss, A., Maier, D., ... & Jäckle, H. (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a *Drosophila* segmentation gene. *Cell*, 47(6), 1025-1032.
- Shapira-Schweitzer, K., Habib, M., Gepstein, L., & Seliktar, D. (2009). A photopolymerizable hydrogel for 3-D culture of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and rat neonatal cardiac cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(2), 213-224.
- Shindo, T., Manabe, I., Fukushima, Y., Tobe, K., Aizawa, K., Miyamoto, S., ... & Nagai, R. (2002). Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nature medicine*, 8(8), 856-863.
- Shyu, K. G., Cheng, W. P., & Wang, B. W. (2015). Angiotensin II downregulates MicroRNA-145 to regulate kruppel-like factor 4 and myocardin expression in human coronary arterial smooth muscle cells under high glucose conditions. *Molecular Medicine*, 21(1), 616-625.

- Sponseller, P. D., Hobbs, W., Riley, L. H., & Pyeritz, R. E. (1995). The thoracolumbar spine in Marfan syndrome. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 77(6), 867-876. <https://doi.org/10.2106/00004623-199506000-00007>
- Stanley, W. C., Recchia, F. A., & Lopaschuk, G. D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews*, 85(3), 1093-1129.
- Swamynathan, S. K. (2010). Krüppel-like factors: three fingers in control. *Human genomics*, 4(4), 1-8.
- Tabish, A. M., Azzimato, V., Alexiadis, A., Buyandelger, B., & Knöll, R. (2017). Genetic epidemiology of titin-truncating variants in the etiology of dilated cardiomyopathy. *Biophysical Reviews*, 9(3), 207-223.
- Taegtmeyer, H., Sen, S., & Vela, D. (2010). Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188(1), 191-198.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.
- Talman, V., & Ruskoaho, H. (2016). Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. *Cell and tissue research*, 365(3), 563–581. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2431-9>
- Taylor, D. A., & Robertson, M. J. (2009). Fundamentos de la terapia celular para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares: no hay una célula adecuada para todo. *Revista española de cardiología*, 62(9), 1032-1044.
- Tenhunen, O., Sárman, B., Kerkelä, R., Szokodi, I., Papp, L., Tóth, M., & Ruskoaho, H. (2004). Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24852-24860.
- Tetreault, M. P., Yang, Y., & Katz, J. P. (2013). Krüppel-like factors in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 701-713.
- Turner, J., & Crossley, M. (1998). Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Krüppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *The EMBO journal*, 17(17), 5129-5140.
- Vallée, A., & Lecarpentier, Y. (2019). TGF- $\beta$  in fibrosis by acting as a conductor for

contractile properties of myofibroblasts. *Cell & bioscience*, 9(1), 1-15.

- Van Der Bom, Teun, *et al.* "The changing epidemiology of congenital heart disease." *Nature Reviews Cardiology* 8.1 (2011): 50-60.
- Vanlerberghe, C., Jourdain, A. S., Ghoumid, J., Frenois, F., Mezel, A., Vaksman, G., ... & Petit, F. (2019). Holt-Oram syndrome: clinical and molecular description of 78 patients with TBX5 variants. *European Journal of Human Genetics*, 27(3), 360-368.
- Vinjamur, D. S., Wade, K. J., Mohamad, S. F., Haar, J. L., Sawyer, S. T., & Lloyd, J. A. (2014). Krüppel-like transcription factors KLF1 and KLF2 have unique and coordinate roles in regulating embryonic erythroid precursor maturation. *Haematologica*, 99(10), 1565.
- Wang, D. Z., Chang, P. S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J. A., Small, E., ... & Olson, E. N. (2001). Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell*, 105(7), 851-862.
- Wang, D., Zhai, G., Ji, Y., & Jing, H. (2017). microRNA-10a targets T-box 5 to inhibit the development of cardiac hypertrophy. *International Heart Journal*, 58(1), 100-106.
- Williams, K., Carson, J., & Lo, C. (2019). Genetics of congenital heart disease. *Biomolecules*, 9(12), 879.
- Wolfe, S. A., Nekludova, L., & Pabo, C. O. (2000). DNA recognition by (Cys<sup>2</sup>His<sup>2</sup>) zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29, 183.
- Writing Group Members, Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., Das, S. R., de Ferranti, S., Després, J. P., Fullerton, H. J., Howard, V. J., Huffman, M. D., Isasi, C. R., Jiménez, M. C., Judd, S. E., Kissela, B. M., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Liu, S., ... Stroke Statistics Subcommittee (2016). Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 133(4), e38–e360. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000350>
- Wu, D., Zhang, K., & Hu, P. (2019). The role of autophagy in acute myocardial infarction. *Frontiers in pharmacology*, 10, 551.
- Xu, Y., Xu, S., Liu, P., Koroleva, M., Zhang, S., Si, S., & Jin, Z. G. (2017). Suberanilohydroxamic acid as a pharmacological Kruppel-Like Factor 2 activator that



represses vascular inflammation and atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*, 6(12), e007134.

- Yilbas, Ayse E., *et al.* "Activation of GATA4 gene expression at the early stage of cardiac specification." *Frontiers in chemistry* 2 (2014): 12.
- Yoshida, T., Kaestner, K. H., & Owens, G. K. (2008). Conditional deletion of Kruppel-like factor 4 delays downregulation of smooth muscle cell differentiation markers but accelerates neointimal formation following vascular injury. *Circulation research*, 102(12), 1548-1557.
- Zakeri, S., Aminian, H., Sadeghi, S., Esmaeilzadeh-Gharehdaghi, E., & Razmara, E. (2022). Krüppel-like factors in bone biology. *Cellular Signalling*, 110308.
- Zhang, Y. N., Xie, B. D., Sun, L., Chen, W., Jiang, S. L., Liu, W., ... & Li, R. K. (2016). Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the 'normal region' of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(6), 1049-1061.
- Zhang, Y., Wang, Y., Liu, Y., Wang, N., Qi, Y., & Du, J. (2013). Krüppel-like factor 4 transcriptionally regulates TGF- $\beta$ 1 and contributes to cardiac myofibroblast differentiation. *PloS one*, 8(4), e63424.
- Zheng, Y., Kong, Y., & Li, F. (2014). Krüppel-like transcription factor 11 (KLF11) overexpression inhibits cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 683-688.
- Zhou, J., & Herring, B. P. (2005). Mechanisms responsible for the promoter-specific effects of myocardin. *Journal of Biological Chemistry*, 280(11), 10861-10869.
- Zhou, M., McPherson, L., Feng, D., Song, A., Dong, C., Lyu, S. C., ... & Krensky, A. M. (2007). Kruppel-like transcription factor 13 regulates T lymphocyte survival in vivo. *The Journal of Immunology*, 178(9), 5496-5504.
- Zou, J., Fei, Q., Xiao, H., Wang, H., Liu, K., Liu, M., ... & Wang, N. (2019). VEGF-A promotes angiogenesis after acute myocardial infarction through increasing ROS production and enhancing ER stress-mediated autophagy. *Journal of cellular physiology*, 234(10), 17690-1

## 14. APÉNDICES

### 13.1 Extracción de ARN con método de Trizol-Cloroformo

1. Homogenizar tejido con taladro y brocas estériles.
2. Añadir 150 uL de trizol, posteriormente congelar por 2hrs a -80 °C.

**EN ESTE PUNTO LAS MUESTRAS PUEDEN SER ALMACENADAS A 4°C  
TODA LA NOCHE O A -20°C HASTA POR 1 AÑO.**

3. En muestras con alto contenido de grasa centrifugar el lisado por 5 minutos a 12,000 x G a 4°C, trasferir el supernadante a un nuevo tubo. Incubar por 5 minutos.
4. Añadir 200uL de cloroformo, mezclar por agitación e incubar 2 minutos.
5. Centrifugar la muestra por 15 minutos a 12,000 G a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.
7. Añadir 500 uL de isopropanol a la fase acuosa e incubar 10 minutos a 4°C.
8. Centrifugar por 10 minutos a 12,000 G a 4°C. Se formará un precipitado blanco en el fondo del tubo.
9. Descartar el supernadante con una micropipeta.
10. Resuspender el sedimento en 1 mL de etanol al 75%.

**EN ESTE PUNTO EL ARN PUEDE SER ALMACENADO POR LO MENOS  
1 AÑO A -20°C O 1 SEMANA A 4°C.**

11. Utilizar el vortex para mezclar brevemente la muestra. Centrifugar por 5 minutos a 7,500 G por 4°C.
12. Descartar el supernadante con una micropipeta.
13. Dejar secar la pastilla de ARN durante 5-10 minutos.
14. Resuspender la pastilla en 20-50 uL de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas y homogenizar con micropipeta subiendo y bajando la solución.
15. Incubar en un baño de agua o en termoplaca de 55-60 °C durante 10-15 minutos.
16. Congelar a -80 °C hasta su procesamiento.

## 13.2 Síntesis de ADNc

La síntesis de la cadena sencilla de ADN complementario se realizó utilizando el kit comercial SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen). Fueron utilizados 2.5 µg de muestra de ARN con parámetros de calidad A260/280 =1.8-2.0 como templado.

1. Mezclar en frío 4 µL de 5X VILO™ Reaction Mix, 2 µL 10X SuperScript™ Enzyme Mix, ARN y agua libre de nucleasas para una reacción de 20 µL.
2. Mezclar gentilmente.
3. Incube a 25 °C durante 10 minutos.
3. Incubar el tubo a 42 °C durante 60 minutos.
4. Terminar la reacción a 85°C en 5 minutos.
5. Almacenar a -20°C hasta su uso.

### 13.3 RT-qPCR.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando el kit comercial FAST SYBR® Green Master Mix. Se realizó la optimización de los componentes para una reacción de 20 µL en placas ópticas de 96 pozos, de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. En un tubo eppendorf mantenido en hielo, añadir 10 µL de Fast SYBR® Green Master Mix (2×), 1 µL FWD primer 400 µM, 1 µL REV primer 400 µM, 80 ng de templado ADNc y agua libre de nucleasas hasta completar 20 µL.
2. Tape el tubo, mezcle por inversión suave, luego centrifugue el tubo brevemente para hacer girar el contenido y eliminar burbujas de aire.
3. Transferir el volumen apropiado de cada reacción (20 µL) a cada pozo de una placa óptica.
4. Selle la placa con una cubierta de adhesivo óptico, luego centrifugue la placa brevemente para hacer girar el contenido y eliminar las burbujas de aire.

**Nota:** Procese la placa de reacción dentro de las 2 horas posteriores a la realización de la reacción. Si no puede hacerlo, guarde la placa a 4 °C.

5. El análisis fue realizado con ayuda del instrumento 7500 Fast de Applied Biosystems utilizando las siguientes condiciones universales de amplificación:

**Tabla 10.** Condiciones de reacción de amplificación.

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Activación <b>AmpliTaq</b> Fast ADN polimerasa	95°C	20 segundos	1
Desnaturalización	95°C	3 segundos	40
Alineamiento/Extensión	60°C	30 segundos	