

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA



TÍTULO:
PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN KRÜPPEL-
LIKE EN UN MODELO MURINO DE DIETA HIPERCALÓRICA
Y DAÑO CARDIACO.

PRESENTADO POR:
Q.C.B. OSCAR RODRÍGUEZ NÚÑEZ.

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

Monterrey N.L., Julio 2024

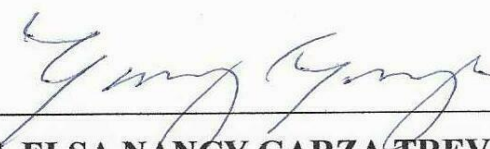
**PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN KRÜPPEL-
LIKE EN UN MODELO MURINO DE DIETA HIPERCALÓRICA
Y DAÑO CARDIACO.**

Aprobación de la tesis:



DR. C. JOSÉ FRANCISCO ISLAS CISNEROS

Director de Tesis



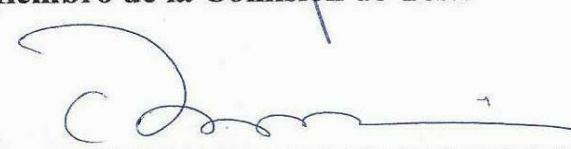
DRA. C. ELSA NANCY GARZA TREVIÑO

Codirector de Tesis



DR. C. GERARDO RAYMUNDO PADILLA RIVAS

Miembro de la Comisión de Tesis



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Sub Director de Estudios de Posgrado

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

TABLA DE CONTENIDO

1. – ANTECEDENTES	19
1.0.- La edad moderna, el sedentarismo y la obesidad	19
1.1.- El corazón y sus aspectos fisiológicos	20
1.2.- La enfermedad cardiovascular	21
1.2.1. – Infarto agudo al miocardio e isquemia cardiaca	22
1.1.2. – La aterosclerosis una enfermedad inflamatoria	23
1.2. – Síndrome metabólico.....	24
1.2.1. - Relación entre el síndrome metabólico y el IAM	25
1.3. - Programación fetal	26
1.3.1. - Dieta de cafetería en programación fetal	26
1.5. - Factores Krüppel-like	28
1.5.1 Clasificación de los KLF por grupo.....	29
1.5.2 - Papel de los KLF en el tejido cardiaco	29
1.5.3 - Papel de los KLF en las CVDs.....	30
3. - HIPÓTESIS.....	33
4. - OBJETIVOS.....	33
4.1. - Objetivo general.....	33
4.2. - Objetivos específicos	33
5. - ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
6. - METODOLOGÍA	35
6.1. - Animales de Experimentación.....	35
6.2. - Modelo de alimentación con dieta de cafetería.....	35
6.3. – Administración de isoproterenol.....	35
6.4 Eutanasia por dislocación cervical.....	36
6.5 Cardiectomía: Obtención y almacenamiento de las muestras.....	36
6.6 Tinciones histológicas.....	36
6.7 Diseño de primers	37
6.8 Extracción de ARN total, Retrotranscripción y q-PCR	37
6.9. – Análisis estadístico	38
7.- RESULTADOS	39
7.1 Establecimiento del modelo de dieta hipercalórica y daño cardiaco.....	39

7.2 Diseño y elección de primers.....	42
7.3 PCR en tiempo real	43
8.- DISCUSIÓN	59
9.- CONCLUSIÓN	77
10.- PERSPECTIVAS	78
11.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	80
12.- REFERENCIAS.....	81
13. - APÉNDICES	101
13.1 Extracción de ARN con método de Trizol-Cloroformo.....	101
13.2 Desparafinado y rehidratación de láminas con tejido cardíaco	102
13.3 Tinción de Hematoxilina y Eosina.....	103
13.4 Tinción de Tricrómico de Masson.....	104
13.5 Síntesis de DNAc	105
13.6 RT-qPCR.....	106

I. DEDICATORIA

Dedicado a mi yo de 8 años que deseaba escapar de todo. Tal vez dar la vuelta ese día no fue tan mala decisión después de todo, aunque no deshicimos esa mochila por mucho tiempo.

A mi yo de 12 años, que aun sintiéndose tan vacío seguía adelante, aunque fuera en silencio, aunque fuera solo.

Para mi yo de 15 años que ya se había convertido en más secretos que persona y por primera vez decidió dejar de tener miedo a la gente.

A mi yo de 19 años, que tras haber cargado con el peso de un mundo en los hombros, decidió que ya había sido suficiente.

Para todas las versiones de mí que ya no existen, esas versiones más jóvenes que no tuvieron la oportunidad de vivir como deseaban, que solo conocían el miedo y el enojo, pero seguían adelante esperando llegar a ver un día más soleado. Siempre intentaré llevarnos a una vida más tranquila, más brillante, y tal vez más feliz también. Esto sólo es un pequeño paso.

II. AGRADECIMIENTOS

Dr. José Francisco Islas Cisneros, gracias por hacerme sentir que no soy el único loco que encuentra a la ciencia a donde sea que voltea. Las pláticas que duraban horas y horas sobre el proyecto y al final terminaban ideando otras diez tesis siempre fueron mi parte favorita de trabajar con usted. Aunque tal vez deberíamos de limitarnos un poco, o terminaríamos teniendo más ideas que capacidad de producir sus resultados, jajaja.

Dr. Gerardo Padilla, tal vez nunca me crea, pero usted hizo que recuperara un poco mi fe en los profesores. He sido testigo de cómo puede guiar a la gente incluso sin darse cuenta. Además sus anécdotas siempre traían serenidad a los días más pesados. Su gran corazón siempre vivirá en mis recuerdos. También gracias por la comida, sus habilidades como parrillero son casi tan buenas como sus dones en la academia.

Dra. Elsa Nancy Garza, créame que usted no sabe la paz y tranquilidad que me generaba cuando nos apoyaba con el proyecto. Usted fue la razón y cordura en nuestro conjunto de científicos locos, siempre asegurándose de que no nos desviáramos de nuestro fin. Era el rayo de luz que aparecía de repente a iluminarnos cuando ya estábamos ciclados con las mismas ideas de siempre. Además si este escrito logra tener pies y cabeza va a ser completamente gracias a usted y a su gran apoyo.

Dr. Adolfo Soto, estoy seguro de que voy a tener pesadillas en las que el Dr. Islas y usted me preguntan si ya terminé mi trabajo por años después de entregar este escrito. No sabe cuanto aprecio le tengo aún con el poco tiempo de trabajar juntos. Usted, el Dr. Islas y yo somos un grupo muy divertido de personas para discutir cualquier tema que se nos atravesara, y no se apure, pronto le llegará su café a su oficina. Caramelo, verdad?

A las **Dras. Sonia Lozano y Ana María Rivas** que eran mi salvación constante en tiempo de desesperación y tragedia, y vaya que pasé por muchas tragedias en tan corto tiempo. Su apoyo me ayudaba a no perder la cabeza, aunque lo vieran como favores sencillos, cuando el mundo se cae a pedazos cualquier pequeña ayuda vale oro.

A mis compañeros de generación, **Selene, Larli, Daniel y Aldair** pese a todo lo que pasó en estos dos años, siempre guardaré muy buenos recuerdos juntos. Y definitivamente mi hígado tampoco va a olvidar esos momentos en el futuro. A mis compañeros de otros enfoques,

Sindy, Octavio, Carlos y Ruelas quisiera haber convivido más con ustedes estos dos años porque con el poco tiempo que pasábamos juntos yo era muy feliz. Espero tener la oportunidad en el futuro. A mis compañeros de QCB que seguimos el mismo sendero hasta aquí: **Luis, Cobos, Mike, Dany, Marco**, no tengo duda de que hay algo mal en nuestra cabeza por decidir seguir este camino, pero estoy feliz de haber tenido otros dos años para convivir con ustedes, porque vaya que valió la pena y espero nunca perder el contacto con ninguno.

A mis hermanas y hermano en la línea de investigación de KLFs **Michelle, Andrés e Itzel**. Somos cuatro personas muy diferentes, y vaya que lo somos, pero les agarré mucho cariño en muy poco tiempo. ¿Tal vez sea de esas situaciones donde el trauma nos une? No lo sé, es posible. Pero cada uno de ustedes vale su peso en oro, no solo son grandes personas si no que tienen grandes mentes en sus hombros, no tengo dudas de que llegarán muy lejos a futuro, pero por mientras, yo siempre estaré orgulloso de haber trabajado con ustedes.

A mis compañeros de terapia celular, **Adri, Antonio** y por un poco menos de tiempo **Juandi y Sergio**. Compartir el laboratorio con ustedes fue una joyita de experiencia, un espacio tan chico con tanta gente siempre va a crear lazos interesantes, pero aprendí mucho de cada uno de ustedes, si Sergio y Juandi, hasta de ustedes, niños. No tengo dudas de que si alguno de ustedes no hubiera estado presente en el laboratorio, no hubiera podido disfrutar mi vida de posgrado como lo hice. Mil gracias a todos. Espero que hayan podido disfrutar mi cajón de dulces, lamento decir que ya no podré seguir reabasteciéndolo.

Cabe aclarar que pasar tanto tiempo en el departamento de Bioquímica pudo haber sido mucho más pesado si no fuera por la gente que lo compone, así que le agradezco infinitamente a su personal. **Deya**, voy a extrañar mucho nuestras pláticas. Estoy seguro de que el posgrado se caería a pedazos sin tu apoyo, te deseo lo mejor y espero que tu futuro esté lleno de mucha felicidad, como la que me daba saber que tú siempre estabas al pendiente de nosotros. **Juany**, creo que yo siempre le causé problemas, y entraba a su oficina sólo para darle trabajo, pero espero que no le haya dado tanto dolor de cabeza por culpa mía. Muchas gracias por ser la heroína que es, aunque poco escuchemos de lo mucho que hace, yo fui testigo de que el departamento sobrevive gracias a su esfuerzo diario. **Laura, Macrina**, voy a extrañar darles los buenos días, era mi forma de empezar el día con el pie derecho y cuando

no tenía la oportunidad como que algo hacía falta. **Violeta**, conviví muy poco con usted, pero a pesar de que muy probablemente le cause tantos problemas como a Juany, gracias por siempre poner todo de su parte por nosotros. Los estudiantes no siempre notamos todo el trabajo que hace cada una de ustedes, pero quiero que sepan que siempre apreciaré sus esfuerzos, ustedes son el departamento de Bioquímica, sin ustedes no somos nada.

De aquí en adelante será un poco más personal. A mi **Madre, Padre y Hermano**. Mi relación con ustedes es complicada, debo admitir, pero cualquiera que pueda soportarme durante 24 años tiene mi aprecio y yo haría cualquier cosa por asegurarme de su bienestar. Lamento que no sea un agradecimiento más emocional, como dije, considero nuestra relación algo complicada, aun así, los amo, pero no piensen que lo diré en persona, es complicado.

A mi amiga de más tiempo y compañera de baile desde la infancia, **Alejandra**. Solo nosotros sabemos todo por lo que el otro ha pasado, has sido testigo de mi vida desde los 7 años. Eres de mis amistades más cercanas aunque no tengamos mucha oportunidad de vernos. Estoy seguro de que nuestra amistad perdurará toda la vida. Espero así sea.

A mis amigos **Nancy, Willy y Roberto**. Si el mundo alguna vez buscara un grupo de personas que jamás se imaginara formarían una amistad cercana, tal vez estaríamos entre los primeros cinco lugares. Aun así ustedes tres fueron mi ancla a la realidad por mucho tiempo, sin ustedes mi vida no sería la misma, ustedes han sido de mis amistades más largas y sinceras. Si soy quien soy ahora mismo, gran parte es gracias a ustedes. A mis amigos **Arely, Andrea, Brenda, Soledad, Giovanni, Adán, Santi, Majo, Lalo, Corina, Fernando, Thelma, Mariana y Victoria**, la otra parte de mi familia de preparatoria, tal vez los vea menos seguido que a los tres de arriba pero no por eso las palabras aplican menos. Por ustedes son quien soy y soy feliz siendo quien soy, gracias por darme esta felicidad.

A mi pequeña familia, **Xiomiz, Monz, Deiviz, Ale, Chuy**. En tan poco tiempo, si es que siete años son pocos, se han vuelto parte fundamental de mi mundo. Por ustedes estoy seguro de que siempre voy a pertenecer a algo, pase lo que pase. No encuentro palabras mejores para agradecerles, tal vez en persona lo haga mejor, pero si alguna vez tienen dudas de mi aprecio por alguno de ustedes o por nuestra amistad, no se apuren yo los agarro a golpes hasta que entren en razón y recuerden cuanto significan para mí.

Por último, y claramente muy importante porque me gusta dejar lo mejor para el final, a **Andrés**. Nunca fui alguien que quisiera apegarse tanto a otras personas, pese a la gran lista de agradecimientos aquí plasmada, tengo la mala maña de poner una barrera entre los demás y yo, aún lo hago. Pero tú, de alguna forma, eres la excepción. Mucha gente piensa que tu otra mitad tiene que ser una roca en la cual te puedas apoyar en momentos difíciles, pero toda mi vida he tenido que ser mi propia roca, o la de los demás, ya estoy cansado de esa rigidez. Así que cuando llegaste tú, como una brisa montañosa, o un río de agua helada, o una nube en el cielo azul, o un campo lleno de jacintos, supe que te convertirías en mi lugar favorito. Y si, estoy escribiendo esto de forma muy poética y romántica porque sé que te va a molestar cuando lo llegues a leer, es más espero que te dé pena leerlo jajaja. Aun así, las palabras jamás serán suficientes para describir lo que siento por ti. Quiero creer que caminaremos juntos muchos años en el futuro para demostrarte lo que significas para mí de todas las formas posibles, pero aún si no fuera así, quiero que quede aquí evidenciado, lo importante que has sido, eres y espero seas, para mí. Te amo.

III. FINANCIAMIENTO

El presente trabajo recibió financiamiento por parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), 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. José Francisco Islas Cisneros
Director
- Dra. C. Elsa Nancy Garza Treviño
Codirector
- Dr. C. Gerardo Raymundo Padilla Rivas
Miembro de la comisión

Con la colaboración de los siguientes Departamentos:

- **Departamento de Farmacología y Toxicología.**
- **Departamento de Histología.**

Colaboradores:

- Dra. med. Lourdes Garza Ocañas
Departamento de Farmacología y Toxicología.
- M.C. M.V.Z. Gilberto Arévalo Martínez
Departamento de Farmacología y Toxicología.
- Dr. C. Adolfo Soto Domínguez
Departamento de Histología

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 FIGURAS

Figura 1. Anatomía del corazón.....	17
Figura 2. Mecanismo de formación de la placa aterosclerótica.....	21
Figura 3. Estrategia Experimental.....	30
Figura 4. Abordaje quirúrgico utilizado: Cardiectomía.....	35
Figura 5. Cambios en el volumen cardiaco post-insulto con isoproterenol.....	36
Figura 6. Cortes histológicos de tejido cardiaco.....	37
Figura 7. Datos de expresión genética de KLF4.....	40
Figura 8. Datos de expresión genética de KLF7.....	41
Figura 9. Datos de expresión genética de KLF11.....	42
Figura 10. Datos de expresión genética de KLF12.....	43
Figura 11. Datos de expresión genética de KLF13.....	44
Figura 12. Datos de expresión genética de KLF15.....	45
Figura 13. Datos de expresión genética de IL-1 β	46
Figura 14. Datos de expresión genética de IL-6.....	47
Figura 15. Datos de expresión genética de TNF- α	48
Figura 16. Datos de expresión genética de NF- κ B.....	49
Figura 17. Datos de expresión genética de ATP2A2.....	50
Figura 18. Datos de expresión genética de RYR2.....	51
Figura 19. Datos de expresión genética de SLC8A1.....	52
Figura 20. Datos de expresión genética de KCNA2.....	53
Figura 21. Fases de la remodelación cardiaca.....	56
Figura 22. Cortes de testículo de rata marcados con anticuerpo anti-KLF15 con contraste de Hematoxilina.....	74

Figura 23. Expresión genética relativa cardiaca de diferentes genes asociados a función cardiaca e inflamación.....	75
---	----

VI. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Morfometrías grupo Caf-Caf.....	35
Tabla 2. Morfometrías grupo Ctrl-Caf.....	36
Tabla 3. Listado de primers.....	38
Tabla 4. Resumen de resultados de qPCR de genes para KLFs.....	45
Tabla 5. Resumen de resultados de qPCR de genes asociados a respuesta inmune y función cardíaca.....	54

VII. LISTA DE ABREVIATURAS

CVD: Enfermedad Cardiovascular

IAM: Infarto agudo al miocardio

SM: Síndrome metabólico

OMS: Organización Mundial de la Salud

IC: Isquemia cardiaca

LDL: Lipoproteína de baja densidad

oxLDL: Lípidos de baja densidad oxidados

TLR: Receptores tipo Toll

CRP: Proteína C reactiva

DM2: Diabetes Mellitus 2

KLF/Klf: Factor de transcripción Krüppel-like

IL-1B: Interleucina 1 beta

IL-6 : Interleucina 6

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

ATP2A2: ATPasa transportadora de calcio de retículo sarcoplásmico/endoplásmico 2

RYR2: Receptor de rianodina 2

SLC8A1: Miembro A1 de la familia de acarreadores de solutos 8

KCNA2: Miembro 2 de la subfamilia A de la familia de canales de potasio asociados al voltaje

Caf: Cafetería

VIII. RESUMEN

Q.C.B. Oscar Rodríguez Núñez

TÍTULO: “PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN KRÜPPEL-LIKE EN UN MODELO MURINO DE DIETA HIPERCALÓRICA Y DAÑO CARDIACO”

INTRODUCCIÓN: Las enfermedades cardiovasculares (CVDs) son la mayor causa de muerte a nivel mundial siendo con mayor frecuencia debido a un infarto agudo al miocardio (IAM). Se ha visto que uno de los mayores factores de riesgo para la aparición de CVDs es la presentación del síndrome metabólico (SM) el cual suele deberse a una mala alimentación; alta en grasas y carbohidratos con un nivel elevado de calorías diarias. Uno de los desenlaces más comunes del SM es la aterosclerosis, que conlleva un mayor riesgo de presentar un IAM. Hoy en día los tratamientos para CVDs, tales como trasplantes o marcapasos, son muy costosos, por lo que, se ha explorado la posibilidad de utilizar moléculas pequeñas, como factores de transcripción como blancos terapéuticos o como terapia. Los factores Krüppel-like son factores de transcripción cuya participación en el sistema cardiovascular se ha estudiado antes, en este proyecto se buscará estudiar su comportamiento en un modelo de IAM con una dieta alta en calorías. **OBJETIVO:** Evaluar los cambios en los perfiles de expresión en genes de los factores Krüppel-like, de conductividad y de contractilidad en el ventrículo izquierdo de ratas Wistar expuestas a dieta de cafetería tras etapas tempranas del insulto cardiaco inducido con isoproterenol. **METODOLOGÍA:** En un modelo murino de alimentación con dieta de cafetería heredada y *de novo*, se va a inducir un daño cardiaco similar a IAM con administración intraperitoneal de isoproterenol. Se realizará recolección de tejido cardiaco a distintos tiempos post-insulto, se extrajo ARN de las muestras por el método comercial de Trizol®. El ARN se sometió a una retrotranscripción y se utilizó el cADN producido para medir los niveles de expresión de distintos genes seleccionados por medio de qPCR. **RESULTADOS:** La dieta de cafetería logró incrementar los niveles de expresión de diversos KLFs asociados a protección y daño cardiaco. Además, se observó una elevación en la expresión de los marcadores de inflamación cuando se comparó con el modelo expuesto antes del nacimiento a dieta hipercalórica. **CONCLUSIÓN:** La dieta consumida por los animales fue capaz de inducir una mayor hipertrofia cardiaca comparado con los controles sin dieta hipercalórica. Adicionalmente aquellos que tienen una carga genética por ancestros que consumen esta dieta hipercalórica pueden llegar a presentar una mayor actividad de la respuesta inflamatoria y un patrón de expresión distinto en genes inflamatorios de KLF, comparado con aquellos con su primer contacto con la dieta con alto contenido calórico.


Dr. C. José Francisco Islas Cisneros
Director de Tesis

IX. ABSTRACT

Q.C.B. Oscar Rodríguez Núñez

TITLE: "ROLE OF KRÜPPEL-LIKE TRANSCRIPTION FACTORS IN A MURINE MODEL WITH HYPERCALORIC DIET AND CARDIAC DAMAGE"

INTRODUCTION: Cardiovascular diseases (CVDs) are the most common cause of death worldwide, the most frequent of them being the acute myocardial infarction (AMI). It has been seen that one of the factors that contributes more to the development of a CVD is the presence of metabolic syndrome (MS) which is usually caused by unhealthy diets, mostly those that have an elevated level of lipids and carbohydrates with a high daily caloric intake. As of today, treatment for CVDs such as transplants or pacemakers have become expensive and hard to acquire for the common population, which is why there has been a recent increase in the research for alternative therapies applicable in CVD. Such is the case of small molecules such as transcription factors. Krüppel-like factors are a family of transcription factors that have been previously studied in the cardiovascular system. This is why, this project will focus on the behavior of these transcription factors in the heart of an animal model fed with an hypercaloric diet and with induced heart damage. **OBJECTIVE:** Evaluate the changes in the expression profile of the genes for the Krüppel-like factors, heart conductivity and contractility in the left ventricle of Wistar rats exposed to a cafeteria diet after early phases of isoproterenol-induced cardiac damage. **METHODOLOGY:** In a murine model exposed to a cafeteria diet after early phases of isoproterenol-induced cardiac damage, animals were sacrificed in certain days and a sample of heart tissue was taken. RNA was extracted from these tissues using the commercial Trizol® method. The RNA obtained went through a retrotranscription process to obtain cDNA, which was then used to measure the expression levels of chosen genes via qPCR. **RESULTS:** Cafeteria diet was able to increase the expression levels of different KLFs in heart tissue associated to cardiac protection and damage. Additionally, there was an increase in inflammation genes. **CONCLUSION:** Hypercaloric diet is able to increase cardiac susceptibility to damage when compared to regular diet controls. The animals whose ancestry consumed hypercaloric diet showed an increase in damage as well as a different expression pattern in genes related to cardiac function and KLFs.



Dr. C. José Francisco Islas Cisneros
Director de Tesis

1. – ANTECEDENTES

1.0.- La edad moderna, el sedentarismo y la obesidad

En la época actual los avances tecnológicos han propiciado el ambiente perfecto para una vida sedentaria. Hoy en día tener acceso a alimento, entretenimiento, e incluso a una vida social o laboral, puede cómodamente realizarse desde un sillón con tan sólo mover un dedo. En los últimos años se ha visto un incremento en el tiempo que las personas pasan sentados a comparación del tiempo dedicado a la actividad física. En un estudio realizado por Medina y colaboradores se describió un aumento de 17.3 minutos en el tiempo que ciudadanos encuestados en la Ciudad de México pasaban sentados al día. Este mismo estudio también asoció el tiempo sentado con la prevalencia de obesidad y niveles elevados de glucosa (Medina et al., 2017).

Añadido al sedentarismo, la sociedad actual depende mucho de dietas basadas en comidas altamente procesadas con un alto contenido calórico, pero bajo aporte nutricional. Un estudio realizado en 2022 demostró que la calidad de la dieta de un mexicano promedio suele ser mala en su mayoría, mostrando tener un exceso de azúcares añadidos, sales y grasas saturadas (Curi-Quinto et al., 2022). Adicionalmente este mismo consumo excesivo de calorías no se ve limitado solamente a los adultos, si no que se ha visto evidencia de que los padres transmiten estos malos hábitos alimenticios a sus hijos. Un ejemplo de esto es la composición de los alimentos que los niños mexicanos consumen en las escuelas, ya sea proporcionado por la escuela o por sus padres. En un estudio realizado en niños mexicanos de entre 6 y 9 años se evidenció que el alimento que consume un alumno de educación básica mexicano en su horario escolar podía llegar a aportar hasta 657kcal (más del 30% de las kcal diarias recomendadas) y siendo muy probable que a estos niños les falten entre 2 a 3 comidas más para consumir en el día (Flores-Moreno et al., 2022).

El sedentarismo y la mala alimentación han causado un incremento en padecimientos tales como obesidad, hipertensión y enfermedades cardiovasculares en México (Barquera et al., 2016). Por lo que hoy en día el riesgo de padecer cualquier enfermedad de las antes mencionadas es mucho mayor y posiblemente se vea un incremento con el tiempo. Además, como ya se mencionó anteriormente, este tipo de conductas se imponen en la descendencia,

propiciando la obesidad infantil e incrementando la probabilidad de padecimientos metabólicos a una edad temprana.

1.1.- El corazón y sus aspectos fisiológicos

El corazón es el órgano central del sistema circulatorio; compuesto por los vasos sanguíneos y la sangre. El corazón es un órgano con forma oblicua, que se encuentra desplazado levemente a la izquierda en la cavidad torácica (Pawlina & Ross, 2020) Está compuesto de cuatro cavidades o bóvedas cardíacas: dos aurículas (izquierda y derecha) y dos ventrículos (izquierdo y derecho), como se observa en la Figura 1. Las aurículas tienen como función la recepción de sangre del sistema vascular y los ventrículos envían la sangre a través del sistema arterial (Ira Fox, 2011). Ambos pares de aurícula y ventrículo tienen como función el bombeo y presurización de la sangre para ser transportada a través del cuerpo, por lo que se suele considerar a cada par como una bomba, dividiéndose en bomba izquierda (aurícula y ventrículo izquierdos) y bomba derecha (aurícula y ventrículo derechos). Estas bombas son las que dividen el sistema circulatorio en dos grandes partes, el sistema circulatorio pulmonar, que tiene como función oxigenar la sangre, y el sistema circulatorio sistémico, que provee al cuerpo de sangre oxigenada y la regresa al corazón (Raff & Levitzky, 2013).

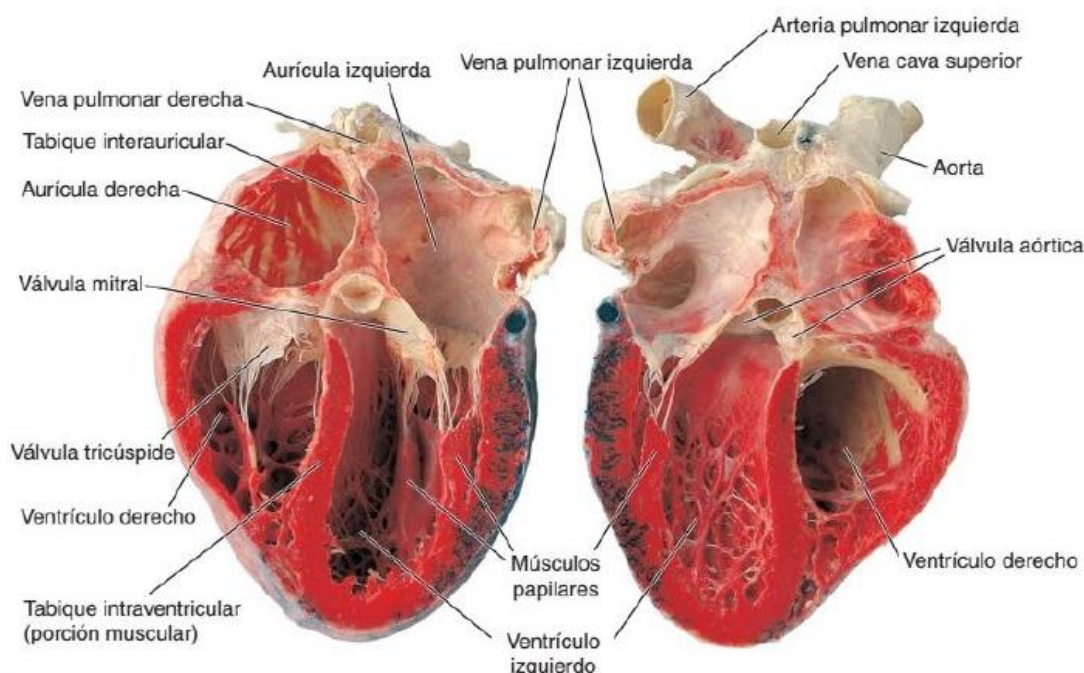


Figura 1: Anatomía del corazón. Recuperado de Pawlina & Ross. (2020)

El sistema pulmonar comienza con la sangre pobre en oxígeno que llega a la bomba cardíaca derecha, el corazón envía esta sangre a las arterias pulmonares hasta llegar a los pulmones donde se oxigena y es regresada al corazón por las venas pulmonares hasta la bomba izquierda. El sistema circular sistémico en cambio comienza en la bomba izquierda, donde la sangre es enviada a través de la aorta; una arteria de gran calibre y altamente elástica que conduce la sangre a través de los distintos vasos ubicados alrededor del cuerpo para finalmente proveer oxígeno. Una vez se da el intercambio de gases, oxígeno y dióxido de carbono, la sangre regresa al corazón por medio del sistema venoso y llega a la bomba derecha (Raff & Levitzky, 2013). Cada una de las bóvedas cardíacas por lo tanto tiene la tarea de bombear sangre hacia, y desde, distintas partes del sistema cardio-pulmonar, con el ventrículo izquierdo siendo el que debe ejercer una mayor fuerza, para poder enviar el flujo sanguíneo al resto del cuerpo. Esta demanda de fuerza en el ventrículo izquierdo también ocasiona que esta bomba requiera mayores niveles de oxígeno y un tejido muscular de mayor calibre capaz de ejercer esta fuerza (ECG Waves, n.d.)

En cuestiones histológicas, el corazón está compuesto en gran parte de tejido muscular cardíaco, aunque también podemos encontrar tejido fibroso formando un esqueleto fibroso que separa las cavidades cardíacas y tejidos especializados como el tejido que conforma el sistema de conducción cardíaco. El tejido muscular cardíaco se compone de gran cantidad de filamentos capaces de acortarse debido a la presencia de unidades fibrilares llamadas sarcómeros (Pawlina & Ross, 2020). El tejido del sistema de conducción, que es necesario para transmitir las señales eléctricas que mantienen la constante y rítmica contracción del músculo cardíaco, se compone de una red de células musculares modificadas llamadas fibras de Purkinje.

1.2.- La enfermedad cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (CVDs por sus siglas en inglés) son un grupo de desórdenes en el funcionamiento del corazón o los vasos sanguíneos. Entre estas se encuentran la enfermedad coronaria, la enfermedad cerebrovascular, enfermedades cardíacas congénitas, entre otras (Benjamin et al., 2018). De acuerdo con la Organización Mundial de Salud (OMS), las CVDs han prevalecido como la primer causa de muerte a nivel mundial, causado 17.9 millones de defunciones en 2019. Según los reportes más recientes, incluso se

ha observado una disminución en la edad promedio para la aparición de esta enfermedad (World Health Organization, 2022). De las causas de muerte más comunes entre todas las CVDs se encuentra el infarto agudo al miocardio (IAM), llegando a presentar hasta un 85% de todas las muertes relacionadas a CVDs (World Health Organization, 2021). El desenlace de una CVD avanzada suele resultar en una falla cardíaca que suele ser la principal causa del fallecimiento de los pacientes.

Hoy en día el tratamiento de las CVDs es un reto constante, siendo el mayor de estos la resolución de una falla cardíaca avanzada que, de acuerdo con las guías de práctica clínica mexicana, debe resolverse por medio de la instalación de aparatos como marcapasos o desfibriladores implantables o incluso, dependiendo del avance de la pérdida de función, se recomienda el trasplante cardíaco (IMSS, 2009). Sin embargo, los costos y la accesibilidad tanto de los implantes como los trasplantes son un impedimento para recurrir de forma regular a cualquiera de estas dos formas de terapia.

1.2.1. – Infarto agudo al miocardio e isquemia cardíaca

El IAM es una afección cardíaca común que tiene su origen cuando el corazón es incapaz de recibir la cantidad necesaria de oxígeno para su correcto funcionamiento y esto causa la rápida muerte de las células del miocardio, los cardiomiocitos (NIH National Heart, Lung, 2022b). Comúnmente el origen de esta falta de oxígeno es un bloqueo en el flujo de la arteria coronaria, lo que causa isquemia. La isquemia cardíaca (IC) se define como el daño causado en el tejido cardíaco por la falta de oxígeno previo al IAM (Mayo Clinic, 2021). La falta de oxígeno tiene una mayor repercusión en el ventrículo izquierdo, debido a su alto requisito de oxígeno y al grosor de su capa muscular, ya que esta evita que pueda oxigenarse por la misma sangre que bombea (ECG Waves, n.d.)

Usualmente el bloqueo de la arteria coronaria que origina la IC se debe a la presencia de coágulos o a la constricción de los vasos sanguíneos; en la mayoría de los casos, la reducción de la luz de la arteria coronaria es causada por una acumulación de placas compuestas principalmente de materia grasa lo cual es conocido, como aterosclerosis (Voigt & Abraham, 2021). La aterosclerosis es una enfermedad que puede llegar a afectar cualquier arteria. Se caracteriza por la formación de placas ateroscleróticas como resultado de la acumulación de

colesterol y grasas en el cuerpo, junto con la aparición de daño en arterias principales que recluta células de la respuesta inmune dentro de estas placas (NIH National Heart, Lung, 2022).

1.1.2. – La aterosclerosis una enfermedad inflamatoria

La aterosclerosis fue propuesta como una enfermedad inflamatoria apenas a finales del siglo XX (Ross, 1999) y desde entonces se ha intentado elucidar el papel de la inflamación en esta enfermedad. La primer presentación de cualquier cuadro de aterosclerosis es la aparición de la llamada estría lipídica (Hansson & Hermansson, 2011) la cual se origina cuando los lípidos que son transportados por la lipoproteína de baja densidad (LDL) en el torrente sanguíneo se adhieren a las paredes de las arterias mayores oxidándose para convertirse en LDL oxidado (oxLDL) y esto las vuelve reconocibles por receptores tipo Toll (TLR) ubicados en la pared arterial (Wolf & Ley, 2019). La unión a estos TLR causan el reclutamiento de células inmunes como macrófagos y células T, promoviendo una respuesta proinflamatoria que puede ir aumentando hasta llegar a la formación de placas ateroscleróticas (Curtiss & Tobias, 2009; Ley et al., 2011). En la **Figura 2** se puede encontrar un resumen gráfico de este proceso.

Adicional a los oxLDL, la placa aterosclerótica se conforma principalmente de células espumosas. Estas son células que sufrieron un cambio fenotípico tras el consumo de los oxLDL en un intento por llevar a cabo su eliminación (Kong et al., 2022). La acumulación de células espumosas resulta de una insuficiencia del sistema inmune por llevar a cabo su función de eliminar a los lípidos oxidados. Este estado de célula espumosa es incluso capaz de inducir apoptosis debido a una liberación de citocinas descontrolada, que, por consecuencia, recluta más macrófagos que se convierten en más células espumosas (Kong et al., 2022).

Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis, relacionados principalmente con la acumulación inicial de LDL en el torrente sanguíneo. La gran mayoría de estos factores de riesgo están relacionados con el cuidado personal y el estilo de vida de cada individuo. Algunos de estos factores que aumentan el riesgo de formar depósitos de LDL en las arterias son la obesidad, la hipertensión, la dislipidemia, la diabetes mellitus de

tipo 2 (DM2) y el síndrome metabólico (SM) (Mauricio et al., 2020). El aumento en la incidencia de las CVDs especialmente las relacionadas a IAM se debe a que la aterosclerosis y sus factores de riesgo se ven altamente afectadas por las dietas altas en grasas y la falta de actividad física que frecuentemente se puede observar en países desarrollados (Mauricio et al., 2020; Wang Miao, 2020).

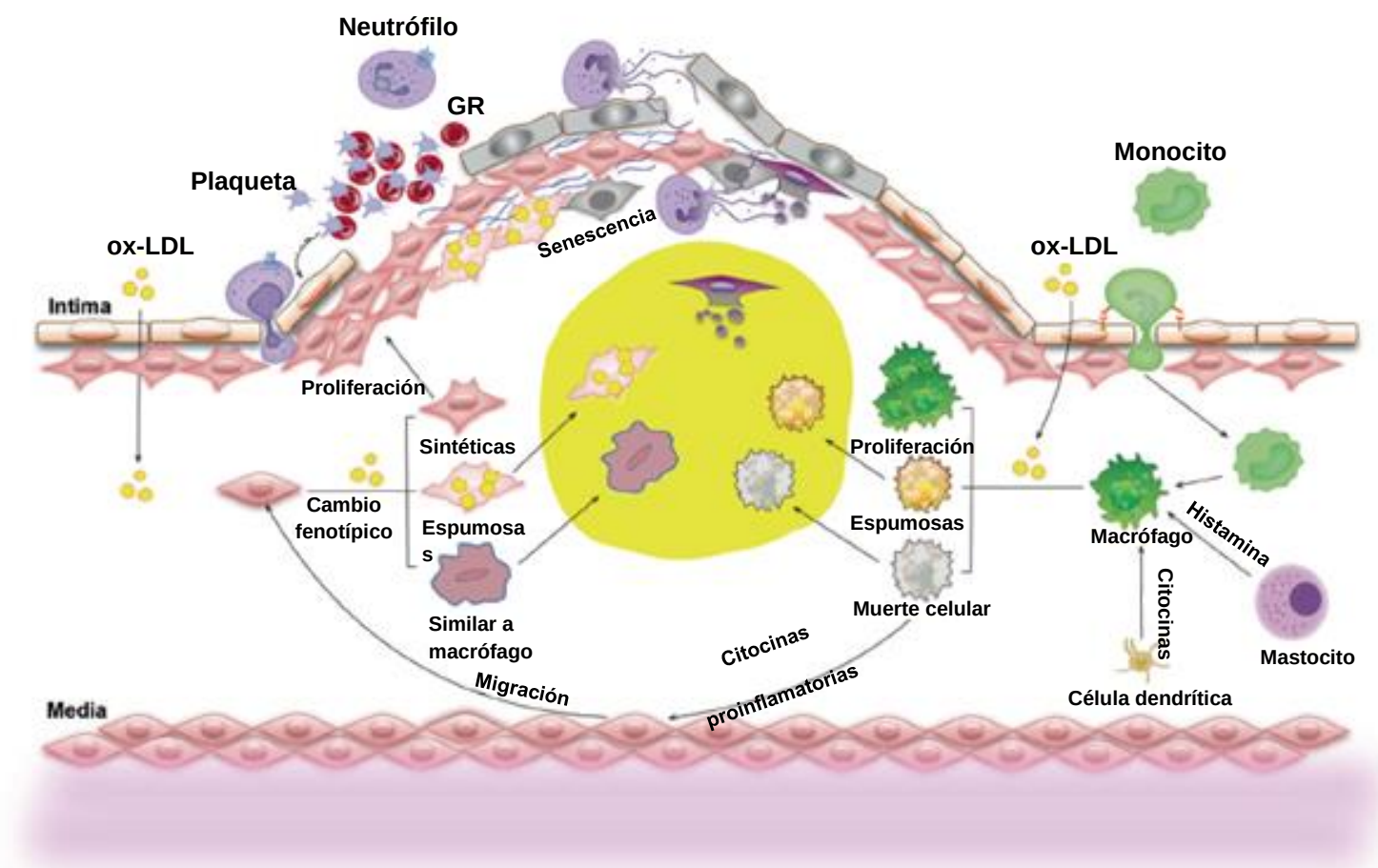


Figura 2: Mecanismo de formación de la placa aterosclerótica. Adaptado de Kong et al. (2022)

1.2. - Síndrome metabólico

Uno de los desencadenantes más comunes para las CVDs es el SM. Reconocido por primera vez por la OMS en 1999, el SM es la adición de afecciones incluidas la hipertensión, obesidad, la resistencia a la insulina y la dislipidemia aterogénica que en conjunto ocasionan un mayor riesgo de desarrollar CVDs, enfermedades metabólicas o cáncer (Rochlani et al.,

2017). El diagnóstico del SM en pacientes se hace a través de diversos hallazgos clínicos, mas no se ve delimitado a la aparición de cada uno de ellos o a una aparición de síntomas específicos para ser reconocido como tal. La Asociación Americana del Corazón (AHA) en conjunto con el Instituto Nacional del corazón, pulmón y sangre (NHLBI) de EUA, establecen que además de la presentación clínica, hay algunos biomarcadores asociados al SM como lo son LDL en sangre y la elevación de proteína C reactiva (CRP) que suele ser también un indicador de inflamación (Grundy, Hansen, et al., 2004).

La asociación de CVDs y SM se ha investigado al grado de probar que el SM es un factor predictivo para la aparición de CVDs, dado que aún sin un antecedente familiar, la presencia de SM ha podido predecir hasta un 25% de los nuevos casos de cualquier CVD, con enfoque en los pacientes masculinos (Grundy, Brewer, et al., 2004; Lakka et al., 2002). En el caso de pacientes femeninos se observó que ocurre un incremento de hasta dos veces de padecer una CVD tras ser diagnosticadas con SM, con una prevalencia aumentada a edades tempranas entre 20-39 años de edad (Macut et al., 2021).

1.2.1. - Relación entre el síndrome metabólico y el IAM

Diversos factores pertenecientes al SM como la resistencia a la insulina, la obesidad y la hipertensión se han asociado a la aparición de un episodio de IAM y a la prevalencia de este en distintas poblaciones (Hedblad et al., 2002; Kannel, 1995; Wolfram et al., 2006). Aun así, se ha buscado establecer la relación entre el síndrome como conjunto de enfermedades y se ha establecido que este afecta a la aparición o probabilidad de padecer un IAM concretamente, por encima de alguna CVD (Mente et al., 2010). Si bien el SM no tiene una composición regular de síntomas, si no que varía de persona a persona (Grundy, Hansen, et al., 2004) y por ello, continua la búsqueda de factores involucrados en el SM y como estos pueden afectar la probabilidad de padecer un IAM.

En un estudio por Fedorowski y colaboradores (Fedorowski et al., 2009) se demostró que la probabilidad de un IAM en pacientes con SM se vio significativamente asociada con la concentración de LDL en sangre, el grado de resistencia a insulina y la excreción de albumina en orina por encima de otros parámetros estudiados. Por otra parte, se ha visto que una historia familiar de SM y CVD también es un factor determinante para el desarrollo de un

posterior SM (Irakoze et al., 2021; Khan et al., 2014). Además, se ha observado en otros estudios que la historia familiar de CVD o SM puede incluso ligarse directamente a un IAM en los pacientes (An et al., 2022; Friedlander et al., 2001).

1.3. - Programación fetal

En 2001, Barker publicó su investigación en la que explica como la alimentación deficiente de una mujer durante el embarazo puede demostrar un efecto perjudicial en el producto, incluso demostrando enfermedad postnatal (Barker, 2001). Esta investigación originó lo que se conoce como la hipótesis de Barker, que establece que el inducir un cambio o afectación en una etapa crítica como lo es el desarrollo embrionario predispone al feto a enfermedades tras nacer, a este fenómeno se le adjudicó el nombre de programación fetal (Kwon & Kim, 2017).

Anteriormente ya se ha investigado la relación entre la alimentación de la madre durante el embarazo y como esta suele ser uno de los factores que mayor efecto tiene en el feto, induciendo enfermedades como la resistencia a la insulina, dislipidemias o incluso predisponiéndolo a CVDs (Marciniak et al., 2017; Ramírez-Vélez, 2012). Se ha asociado que, específicamente, en un estado de sobre alimentación materna, el feto suele presentar un incremento en la probabilidad de adquirir DM2 y CVD (Eriksson et al., 2014). En otras referencias se ha reportado que la programación fetal puede inducir cambios en los hábitos alimenticios de las crías y a su vez estos llevar a un desbalance metabólico (Samuelsson et al., 2008).

1.3.1. - Dieta de cafetería en programación fetal

Por naturaleza, los seres vivos tienden a tener una preferencia por los sabores dulces, encontrando que es un sabor agradable. Hoy en día la industria alimenticia hace gran uso de esta preferencia por el sabor dulce y a partir de la adición de azúcares a los alimentos procesados persuade al consumo de productos altamente procesados con alto contenido de azúcares y grasas pero con bajo contenido nutricional (Drewnowski et al., 2012). Estudios realizados en EUA demostraron que la preferencia a la comida alta en grasas y azúcares, como las bebidas carbonatadas, la comida rápida, y los dulces y postres producidos en masa han llevado a un aumento no sólo en el consumo de estos alimentos, también en el peso

promedio de la población y la prevalencia de enfermedades metabólicas como la resistencia a la insulina y el riesgo de desarrollar DM2 (Pereira et al., 2005).

En modelos animales se ha explorado una alternativa a esta dieta alta en grasas y azúcares comúnmente consumida en la cultura occidental, esta se conoce como dieta de cafetería (Caf). Se ha comprobado anteriormente que el utilizar la dieta Caf en modelos murinos produce efectos comparables con los observados en el SM en humanos (Gomez-smith et al., 2016). En otros estudios se ha visto que el realizar programación fetal con dieta Caf puede llegar a incrementar la concentración de citocinas inflamatorias en suero y, más importante, en el tejido nervioso de la descendencia (Beilharz et al., 2014; Cruz-carrillo et al., 2020; Trujillo-villarreal et al., 2021).

En un estudio, López-Jaramillo y colaboradores establecen que en modelos animales se ha visto el incremento en el tejido adiposo en animales cuyas madres tuvieron una dieta Caf (Lopez-Jaramillo et al., 2015). Aunado a esto se vio que las crías de estos animales programados con dieta Caf presentaban un estado inflamatorio aumentado, presentando incrementos en la expresión de factores proinflamatorios como IL-6, TNF- α y CRP. Además de observarse una disminución proporcional en la expresión de factores antiinflamatorios como IL-10 e IL-4. Estos cambios a causa de la programación fetal se han observado en otros estudios relacionados a la inflamación causada por programación con dieta Caf (Montalvo-Martínez et al., 2022).

1.4. - Efectos de las CVDs en la conductividad y contractilidad cardiaca

El corazón constantemente está expuesto a impulsos eléctricos que mantienen su función de bombeo a un ritmo determinado, esto se debe a la presencia del sistema eléctrico cardiaco. El sistema eléctrico cardiaco se compone de neuronas con una gran cantidad de bombas de iones con la capacidad de conducir señales eléctricas del sistema nervioso a través de diferencias en el potencial de acción (Bhattacharyya & Munshi, 2020). Algunas de las bombas con función importante para la conducción eléctrica en el corazón son las bombas codificadas en los genes SLC8A1 y KCNA2 (Doshi & Marx, 2009).

En un evento de IAM el corazón pierde una parte de su capacidad conductiva, pudiendo verse una disminución en la conducción de ciertas áreas del tejido, dependiendo de la localización

del infarto (Zimetbaum & Marine, 2024). Principalmente se han observado desviaciones en la capacidad conductiva de las células ubicadas en el ventrículo izquierdo, aunque se ha visto que una disminución de la capacidad conductiva no es, por su cuenta, un factor que afecta el estado de un paciente post-IAM (Athar et al., 2011).

A nivel celular la contracción cardiaca está controlada por los sarcómeros de los cardiomiocitos, por medio del intercambio de iones de calcio (Ca^{+2}) y depende directamente de la capacidad de la célula para absorber y responder a la presencia del Ca^{+2} (Solaro, 2011). La regulación de la contractilidad está mediada por diversos genes como RyR2, que codifica para el receptor de rianodina, un canal que libera el Ca^{+2} del sarcómero, SERCA2a que codifica para una MgATPasa, que transporta el Ca^{+2} del citoplasma al sarcómero, y NCX, que es el gen codificante para la bomba que intercambia iones sodio (Na^{+}) con iones de Ca^{+2} causando la diferencia de potencial que induce la contracción (Solaro, 2011).

Las CVDs suelen desencadenar la falla cardiaca, un proceso en el cual las válvulas del corazón ven su función afectada, como puede verse después de un IAM (Rodeheffer & Redfield, 2010; Stephenson, 2020; H. Zhang et al., 2011). En estos casos se ha podido observar que ciertas proteínas de la contractibilidad cardiaca se han visto afectadas en función o en estructura (Pasipoularides, 2016; Rueda et al., 2014).

1.5. - Factores Krüppel-like

Los factores Krüppel-like (KLF) son una familia de proteínas con un amplio rango de perfiles de expresión en los diversos tejidos. Los KLF están implicados en el mantenimiento y homeostasis de las células, así como la respuesta adaptativa a estímulos fisiológicos o patobiológicos. Muchos KLF regulan procesos celulares principalmente al controlar genes involucrados en la proliferación, diferenciación y apoptosis (McConnell & Yang, 2010).

Los KLF son proteínas de dedos de zinc compuestas de dos dominios mayores, un dominio de unión a ADN y un dominio de transactivación (McConnell & Yang, 2010). El dominio de unión a ADN está ubicado en el extremo C-terminal de la proteína y consiste en tres dedos de zinc compuestos por 23 a 25 aminoácidos. Estos motivos de unión a ADN están altamente conservados en las isoformas de los KLF lo que le confiere a los KLF la propiedad de unirse

a una secuencia consenso en cis, principalmente a secuencias de GT-box y la secuencia CACCC (García-Loredo et al., 2024; Pollak et al., 2018).

Por otro lado, los dominios de transactivación, posicionados en el extremo N-terminal, son la distinción entre las isoformas de KLF. La variabilidad en las secuencias producen regiones únicas para interacciones proteína-proteína con especificidad variada lo que causa que todos los KLF posean una diversidad funcional, uniéndose a diferentes blancos y actuando de formas distintas (Swamynathan, 2010). Aun así, se puede observar cierto grado de homología entre los dominios N-terminal de los KLF permitiendo clasificarlos en grupos.

1.5.1 Clasificación de los KLF por grupo

A la fecha existen registros de 18 diferentes isoformas de KLF (numerados del 1 al 18 respectivamente), los cuales se pueden dividir en tres grupos mayores de acuerdo con sus características estructurales y similitud en sus funciones (Pollak et al., 2018). El grupo 1 se compone de los KLF 3, 8 y 12 y se ha reportado que funcionan principalmente como factores represores de la transcripción. Los KLF del grupo 2 son el KLF1, 2, 4, 5, 6 y 7 los cuales funcionan principalmente como activadores de la transcripción. Por último, el grupo 3 incluye a los KLF 9, 10, 11, 13, 14 y 16 son reconocidos por su capacidad de reprimir la transcripción, por medio de unión a un blanco distinto al grupo 1. Los KLF 15, 17 y 18 no se incluyen en las 3 familias debido a diferencias en sus secuencias de aminoácidos que no les permiten unirse a los blancos de alguno de los grupos (Pollak et al., 2018).

1.5.2 - Papel de los KLF en el tejido cardiaco

Anteriormente ya se ha visto que hay participación de algunos KLFs en la homeostasis cardiaca normal, así como en su desarrollo. Entre los ejemplos más importantes, tenemos al KLF-15, el cual anteriormente se demostró que era esencial para el desarrollo cardiaco fetal (Noack et al., 2012). Otra participación importante conocida de los KLFs en el corazón es el papel del KLF-13, el cual tiene como parte de sus funciones la activación del gen GATA4, un gen esencial para el desarrollo cardiaco en la etapa fetal y, adicionalmente, la estabilidad del gen es necesaria para evitar la aparición de enfermedades cardiacas congénitas (Lavallée et al., 2006).

1.5.3 - Papel de los KLF en las CVDs

Debido a su distribución a través de varios tejidos, se ha buscado estudiar la participación de distintos KLF en diversas vías de señalización en una gran variedad de tejidos y órganos como tal. Debido a que los KLF se han encontrado involucrados en diversas vías asociadas a las CVD como lo son la inflamación o la proliferación, se comenzó a buscar la participación de los KLF en el corazón y su función en CVDs.

En un artículo de revisión por Santoyo-Suarez y colaboradores se describe ampliamente la participación de los KLF en las CVDs y la investigación realizada hasta ahora (Santoyo-Suarez et al., 2023). Entre estos hallazgos podemos destacar el papel de los KLF en la aterosclerosis donde algunas investigaciones han establecido si los KLF pueden utilizarse para la protección o promoción de esta enfermedad. Un ejemplo de esto es la participación de KLF-2, que se ha observado es capaz de reducir la inflamación en el endotelio arterial a través de la inhibición de la proteína 1 de adhesión de células vasculares (VCAM -1) y E-selectina (Nayak et al., 2011). Al reducir el riesgo de inflamación en el endotelio vascular se puede prevenir la formación de la estría lipídica causada por el daño inflamatorio. De forma similar KLF-4 también se ha visto que puede presentar un efecto protector, al evitar la formación de tejido cicatricial en el endotelio vascular por inhibición de actina de músculo liso (SMA- α) (Adam et al., 2000). Aun así se ha visto que la represión de KLF-4 también puede tener efectos benéficos, por lo que se le puede atribuir un efecto promotor de aterosclerosis por ejemplo al inhibir el fenotipo inflamatorio en células de músculo liso para detener el crecimiento o formación de las placas ateroscleróticas cuando se inhibe la expresión de KLF-4 (Shankman et al., 2015). En otros ejemplos, KLF-7 se ha visto relacionado con la enfermedad coronaria, encontrándose un aumento de la expresión de este en el tejido epicárdico, que a su vez se relacionó con el aumento de tejido adiposo en el órgano (Huang et al., 2020).

1.6. – Antecedentes directos

En nuestro equipo de trabajo anteriormente ya se había determinado que el KLF15 tiene un papel esencial en la diferenciación de células madre mesenquimales en cardiomiocitos, esto en la tesis del M.C. Pablo Carriquiry. En este trabajo además se estableció una relación entre

la expresión de KLF15 y algunos genes fetales cardiacos, sugiriendo la relación entre los niveles de expresión de KLF15 y el corazón.

Posteriormente en el trabajo de tesis de la M.C. Michelle G. Santoyo Suarez se estableció un modelo de inducción de hipertrofia cardiaca por daño con isoproterenol en ratas hembra. Adicionalmente se estableció una metodología para extraer el corazón de un animal de estudio por medio de cardiectomía quirúrgica. En este trabajo se obtuvieron patrones de expresión de los genes de los KLF en la primer semana posterior a una administración de isoproterenol en un modelo murino en ratas Wistar hembras, encontrando diferencias significativas en los KLFs 4, 7, 12, 13 y 15 (Santoyo-suarez, Garcia-loredo, et al., 2023) los cuales se estudiaran en este trabajo. Adicionalmente se obtuvieron patrones de expresión para algunos genes fetales cardiacos y de la respuesta inflamatoria. En este trabajo se va a utilizar la metodología ya establecida por la M.C. Michelle G. Santoyo Suarez y se van a tomar sus resultados como referencia para analizar nuestros datos.

2. - JUSTIFICACIÓN

La CVD es la primera causa de muerte a nivel mundial. Además, la dieta puede empeorar el pronóstico de los pacientes con CVDs, fenómeno que se observa comúnmente en la población general.

Los tratamientos para las CVDs suelen ser invasivos y costosos. Es por esto por lo que se han buscado nuevos blancos terapéuticos para ellas. Los KLF han sido estudiados como posibles blancos de tratamiento en enfermedades cardíacas. Sin embargo, por el momento no existe una investigación que demuestre el comportamiento de los KLF en un modelo de daño cardíaco y dieta hipercalórica.

En este trabajo se piensa realizar un estudio exploratorio que identifique el papel de los KLF en un modelo murino que sea capaz de demostrar el efecto de la dieta cuando ocurre un episodio similar al IAM.

3. - HIPÓTESIS

Los niveles de expresión de los genes de los factores Krüppel-like con función cardioprotectora posterior a un daño cardíaco disminuyen y los promotores de daño aumentan en modelos de alimentación hipercalórica.

4. - OBJETIVOS

4.1. - Objetivo general

- Evaluar los cambios en los perfiles de expresión en genes de los factores Krüppel-like, de conductividad y de contractilidad en el ventrículo izquierdo de ratas Wistar expuestas a dieta de cafetería tras etapas tempranas del insulto cardíaco inducido con isoproterenol.

4.2. - Objetivos específicos

- Establecer un modelo murino de alimentación con dieta de cafetería y daño cardíaco.
- Analizar los niveles de expresión de los genes de los factores Krüppel-like en rata Wistar alimentadas con dieta de cafetería con insulto con isoproterenol.
- Determinar los niveles de expresión de genes relacionados con inflamación, conductividad y contractilidad cardíaca en rata Wistar alimentada con dieta de cafetería con insulto con isoproterenol.

5. - ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

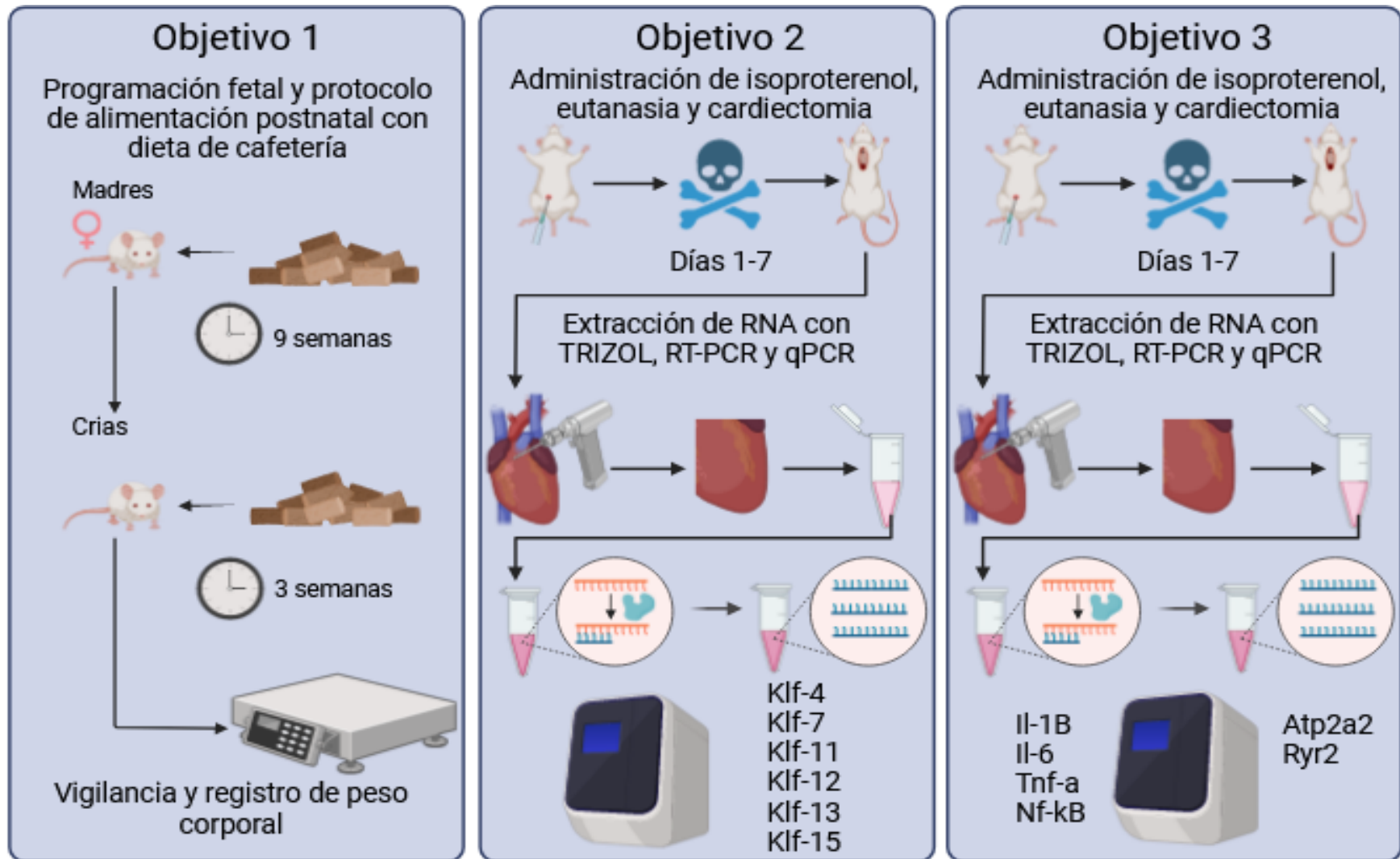


Figura 3: Estrategia Experimental.

6. - METODOLOGÍA

6.1. - *Animales de Experimentación*

Todos los experimentos se realizaron empleando ratas hembra de la cepa Wistar ($\approx$ 200 gramos) estas fueron alojadas en cajas de polimetilmetacrilato, mantenidas a 20 – 24 ° C en una habitación con un ciclo luz / oscuridad de 12 horas. El agua y comida (con dieta de cafetería o dieta control Labdiet5000) estuvo disponible *ad libitum* en la jaula.

6.2. - *Modelo de alimentación con dieta de cafetería*

La dieta de cafetería (Caf) se preparó siguiendo la lista de ingredientes propuesta por De la Garza y colaboradores cuya receta se incluye en el **Apéndice 1** (de la Garza et al., 2023). El modelo de alimentación se dividió de acuerdo con los grupos de estudio. El grupo 1 consistió en animales cuyas madres se hayan alimentado con dieta Caf y su alimentación se haya basado en la misma dieta, será el grupo denominado Caf-Caf. El segundo grupo consistió en animales cuyas madres hayan consumido dieta control y su alimentación tras el destete fuera dieta Caf, este grupo será denominado Ctrl-Caf.

Para el protocolo del grupo Caf-Caf, se alimentaron con dieta Caf durante 3 semanas a ratas Wistar hembras de 3 meses de edad. Posteriormente se colocaron en jaulas de cruce con una rata macho durante una semana en la cual aún tuvieron acceso a alimentarse con dieta Caf. Al terminar la semana se separaron en jaulas individuales hasta terminar su periodo de gestación y lactancia lo cual conllevaría un periodo adicional de 6 semanas. Tras el destete las crías se alimentaron durante 3 semanas con dieta Caf. El grupo Ctrl-Caf pasó por las mismas fases de tiempo para las ratas hembra, pero con acceso solamente a dieta control, las crías de estas fueron alimentadas con dieta Caf por 3 semanas tras el destete.

6.3. – *Administración de isoproterenol*

Se administró de forma intraperitoneal la dosis de 55mg/kg 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 tomó al animal por la base de la cola con una mano para su acomodo y se ubicará 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 colocó este sobre la base del cráneo y se ejerció tracción hacia atrás del animal a través de la base de la cola, para ocasionar la dislocación cervical.

6.5 *Cardiectomy: Obtención y almacenamiento de las muestras*

Se utilizó el método quirúrgico estandarizado por la M.C. Michelle G. Santoyo Suarez. Inicialmente se accedió al tórax mediante una incisión en T invertida y esternotomía longitudinal. El corazón se liberó pinzando y cortando los grandes vasos de la corona cordis (**Figura 4**). Se extrajo el corazón del cuerpo de la rata y se tomaron tres muestras del área ventricular izquierda de aproximadamente 1mm³ cada uno. Las muestras fueron suspendidas en 150µl de TRIzol® (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento. Para realizar cortes histológicos se tomó el resto del corazón muestreado y se resguardó en 50mL de formaldehído al 4% por cada centímetro cúbico de tejido.

6.6 *Tinciones histológicas*

El corazón extraído se colocó en 50mL de formaldehído al 4% refrigerado y se mantuvo a 4°C durante 24 horas. Posteriormente el tejido se incluyó en parafina utilizando un procesador automático de tejidos KD-TS1A de Zhejiang Jinhua Kedee Instrumental Equipment Co. Ltd (Zhejiang, China).

El tejido incluido se embebió en un bloque de parafina y posteriormente se cortó por microtomo para obtener láminas de 5µm de grosor. Se realizaron cortes por triplicado de un control y de muestras de animales de ambos grupos en el día 7 post-insulto con isoproterenol. Los cortes se desparafinaron en una incubadora a 65°C durante 20 minutos. Posteriormente

se rehidrataron siguiendo los pasos encontrados en el **Apéndice 2**. Los cortes obtenidos se tiñeron con tinción de Hematoxilina y Eosina (**Apéndice 3**) y Tricrómico de Masson (**Apéndice 4**).

6.7 *Diseño de primers*

Se realizó la búsqueda de secuencias de genes diana en la plataforma ENSEMBL del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) parte del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) . Las secuencias de cDNA se descargaron en formato FASTA. Dichas secuencias se analizaron utilizando el programa Oligo 7 de DBA Oligo, Inc. (Vondelpark, Colorado Springs, CO) y se seleccionaron pares de cebadores para cada gen diana buscando cumplir con las siguientes condiciones: longitud de 18-24 pares de bases ;contenido de G+C alrededor del 50-60%;T_m entre 55 – 80° C;evitar la formación de estructuras secundarias.

6.8 *Extracción de ARN total, Retrotranscripción y q-PCR*

El ARN total se extrajo con TRIzol® (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.), según el protocolo del fabricante (**Apéndice 5**). El ARN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando Nanodrop 3000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Se midieron parámetros de pureza mediante el cálculo de las relaciones A260/280 y A260/230. La integridad del ARN se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ADN complementario (ADNc) se sintetizó mediante reacción de transcripción inversa con 250 µg de ARN total utilizando la transcriptasa inversa del kit SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc. (**Apéndice 6**). El ADNc se utilizó como plantilla para la qPCR, que se realizó siguiendo el protocolo SYBR-Green® FAST (Thermo Fisher Scientific, Inc.) Las condiciones de reacción se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante (**Apéndice 7**) y tras haber logrado la correcta optimización de los primers para genes diana utilizando el termociclador 7500Fast . Los niveles de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y de β-actina se utilizaron para normalizar la expresión de los genes diana. Los niveles de expresión relativa de los genes se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Se incluirán resultados de las muestras procesadas en la tesis de la M.C. Michelle G. Santoyo Suarez, los cuales servirían como un control sin dieta y con daño cardiaco por isoproterenol, este grupo se indicará como Ctrl-Ctrl. Esto enriquecerá el análisis de los datos obtenidos en este trabajo, aunque la tesis de la M.C. Michelle G. Santoyo Suarez no hace medición de todos los genes incluidos en este trabajo.

6.9. – *Análisis estadístico*

Se analizaron los datos utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0 (GraphPad Software Inc. Boston, MA, EE. UU.). Se realizó comparación de medias con el método de ANOVA de un factor y prueba posthoc de Dunnett bilateral. Se considerará significativo un valor de $P \leq 0,05$.

7.- RESULTADOS

7.1 Establecimiento del modelo de dieta hipercalórica y daño cardiaco

Para el establecimiento del modelo los animales alimentados durante el tiempo establecido fueron medidos, registrando su peso y el largo de su fémur. Posteriormente se les administró isoproterenol por vía intraperitoneal a una dosis única de 55mg/kg. Estos animales fueron muestreados durante 7 días posterior a la inyección de isoproterenol. Para este muestreo se estableció un abordaje quirúrgico que permitiera la obtención del corazón, proceso que se observa en la **Figura 4**. Al órgano extirpado también se le realizaron mediciones, tomando medidas de su peso y su tamaño.

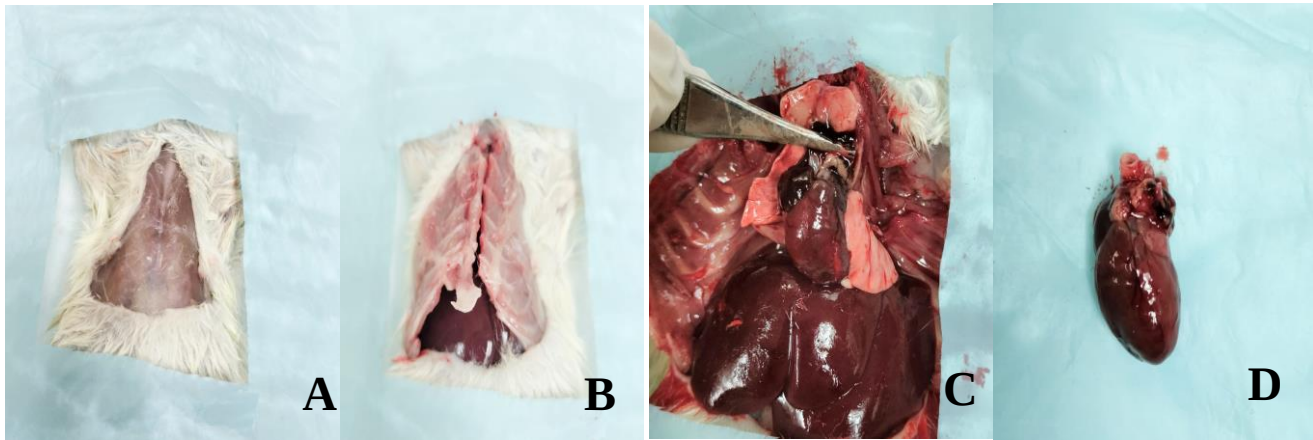


Figura 4: Abordaje Quirúrgico utilizado: Cardiectomía. A) Incisión en “T invertida”. B) Esternotomía longitudinal para exponer la cavidad torácica. C) Pinzamiento de los grandes vasos a nivel de la corona cordis. D) Corte y extirpación del órgano.

Tabla 1: Morfometría grupo Caf-Caf

Dia	Peso corporal (g)	Largo del fémur (mm)	Peso cardiaco (g)	Largo del corazón (mm)	Ancho del corazón (mm)
Control	183	31.4	1	12.8	9
1	192	37.4	1.1	13.6	7.6
2	188	26.7	1	13.6	9.3
3	180	24.6	0.5	13.7	8.3
4	195	26.5	0.7	15.7	9.3
5	178	26.6	0.7	16.8	10.6
6	185	27	0.8	16	11
7	188	25.2	0.7	16	11.3

Tabla 2: Morfometría grupo Ctrl-Caf

Día	Peso corporal (g)	Largo del fémur (mm)	Peso cardiaco (g)	Largo del corazón (mm)	Ancho del corazón (mm)
Control	248.5	30.4	0.8	14.15	10.35
1	207	27.9	1	14.9	10.7
2	204.5	30.95	1.1	14.9	10.88
3	188.5	28	1.35	16.6	10.95
4	220.5	26.6	1.25	16	11.25
5	216	26	1.35	17.9	13.35
6	212	31.65	1.2	17.95	12.85
7	194.5	32.3	1.45	19.3	13.9

Una vez obtenidos los datos morfométricos se utilizó la fórmula para el cálculo de volumen de una elipse para calcular el volumen total del corazón muestreado. Una vez obtenidos los datos del volumen cardiaco, estos se graficaron (**Figura 5**) a modo de poder observar el efecto de hipertrofia dado por la administración de isoproterenol.

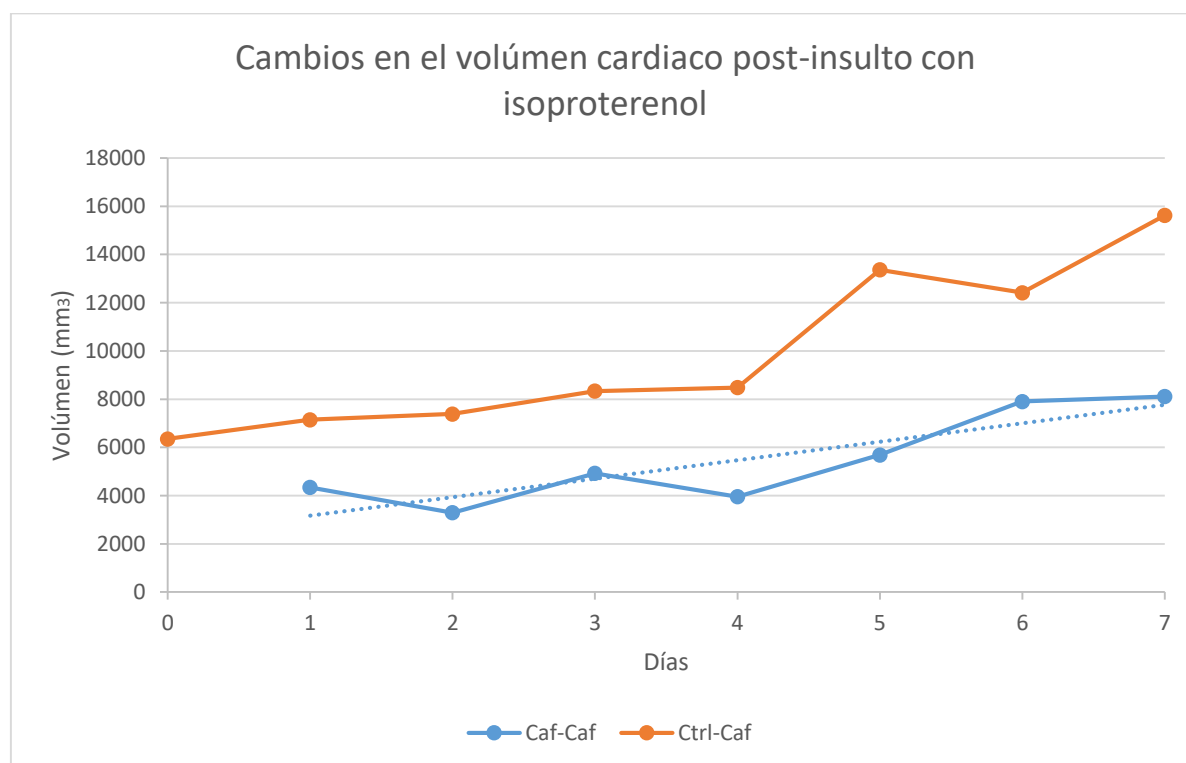


Figura 5: **Cambios en el volumen cardiaco post-insulto con isoproterenol.** Comparación de media. $n=32$. $p<0.01$ Día 7 post administración de isoproterenol, frente a control.

Se realizaron cortes histológicos (**Figura 6**) que permitieran evidenciar el daño estructural en los corazones de ambos grupos estudiados.

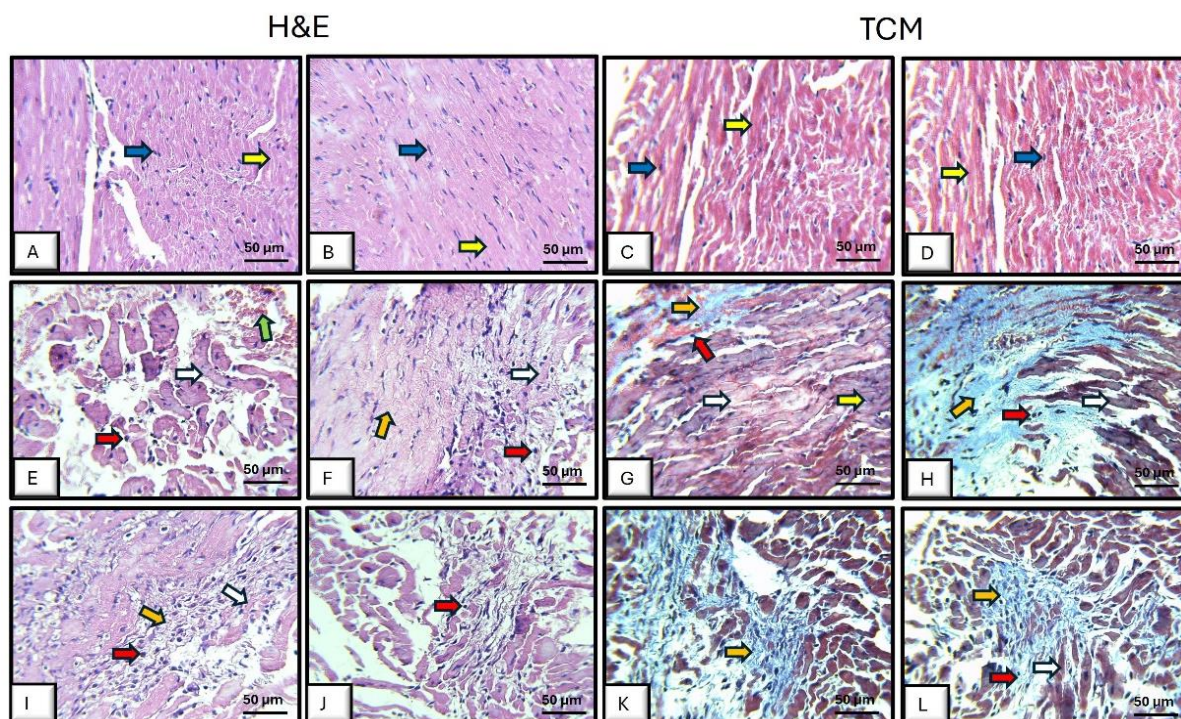


Figura 6: Cortes histológicos de tejido cardíaco. **A y B)** Control. **C y D)** Control. **E y F)** Muestra del día 7 post-insulto con isoproterenol del grupo Caf-Caf. **G y H)** Muestra del día 7 post-insulto con isoproterenol del grupo Caf-Caf. **I y J)** Muestra del día 7 post-insulto con isoproterenol del grupo Ctrl-Caf. **K y L)** Muestra del día 7 post-insulto con isoproterenol del grupo Ctrl-Caf. Hematoxilina y eosina (H&E); Tricrómico de Masson (TCM) Flechas azules: Núcleos. Flechas amarillas: Fibras musculares. Flechas blancas: Disminución del diámetro de fibras musculares. Flechas naranjas: Fibrosis. Flechas verdes: Hemorragia. Flechas rojas: Infiltrado Inflamatorio.

Aunque no se realizó una cuantificación de la fibrosis o área de necrosis en los cortes histológicos es importante recalcar que fue posible observar el daño ocasionado por la administración de isoproterenol en ambos grupos. Se encontró presencia de fibrosis y necrosis en ambos grupos, así como una disminución de la integridad de las fibras musculares.

Ya que se había establecido correctamente el modelo de alimentación y daño se procedió con el análisis de expresión de genes. Como se mencionó anteriormente, este proyecto se enfocó al análisis de genes de KLF, de inflamación, de contractilidad y conductividad cardíaca. Los genes se evaluaron la primer semana posterior al infarto obteniendo una medición diaria durante siete días.

7.2 Diseño y elección de primers

En la siguiente tabla (**Tabla 3**) se muestran las secuencias nucleotídicas seleccionadas para el diseño de los pares de primers tanto de los KLFs como de los genes seleccionados que se involucran en inflamación, conductividad y contractilidad cardíaca. Cabe aclarar que se incluye la fuente de identificación en PrimerBank en caso de haberse utilizado para el diseño de los primers utilizados en el presente trabajo.

Tabla 3: Listado de Primers

GEN	PRIMERBANK ID	FORWARD 5'-3'	REVERSE 5'-3'
KLF4	6754456 ^{a1}	GTGCCCCGACTAACCGTTG	TCGTTGAACTCCTCGGTCT
KLF7	31981436 ^{a1}	TCCACGACACCGGCTACTT	GGGAGCAGCAAGGGGTCTA
KLF11	23510267 ^{a1}	CATGGACATTTGTGAGTCAATCC	CCTTTGGTAGATCAGGTGCAG
KLF12	118130075c2	CAAGGGTCTCCAAACGTCCAC	TGATCTACAGGCAATGAGTCC
KLF13	N/A	GATGGGAATGTCCCTGTGGG	CTCACCAGGCTCTCTGTTGG
KLF15	12963561 ^{a1}	GAGACCTTCTCGTCACCGAAA	GCTGGAGACATCGCTGTCAT
IL-1 β	6680415 ^{a1}	GCAACTGTCCCTGAACTCAACT	TGGATGCTCTCATCTGGACAG
IL-6	13624311 ^{a1}	TAGTCCTTCCTACCCCAACTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF α	N/A	CATCCGTTCTCTACCCAGCC	CCCAGAGCCACAATTCCCTT
NF- κ B	N/A	GAAAATGGTGGAGTTTGGGAA	CTCCTTGTCTTTGATTTCGGG

ATP2A2	N/A	CAAAGGCTTTTACAGGGCGAG	CACCATCACCAGTCATAGCTG
KCNA2	N/A	GACACAGTGGCTTAAATTCCC	ATATGGGTGACCAGGAATAA
SLC8a1	N/A	CCGTCTGGTGGAGATGAGTGA	CTCTCCTCCTCCTCTTTGCTG
RYR2	29165716 ^{a1}	ACCGCAACCATCCACAAAG	AAAGTCTGTTGCCAAATCCTCCT

7.3 PCR en tiempo real

Se realizó qPCR utilizando el kit de Fast SYBR™ Green. Las muestras se corrieron por triplicado, recordando que se tomaron tres muestras de cada animal de experimentación. Las placas de PCR se corrieron en el equipo 7500 Fast Real-time PCR (Applied Biosystems) siguiendo las condiciones del proveedor del kit (**Apéndice 3**).

A continuación, se muestran los gráficos obtenidos tras el procesamiento de los datos con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los datos se analizaron del día 1 al día 7 post-insulto con isoproterenol, tomando en cuenta que se llevará a cabo la comparación entre el grupo Ctrl-Caf y Caf-Caf. Los datos fueron normalizados utilizando la muestra control (sin dieta Caf ni administración de isoproterenol) para obtener una expresión relativa de las muestras experimentales. Debido a esto un resultado significativo por encima de un valor de 1.0 nos indicaría una sobreexpresión y un valor significativo por debajo de 1.0 nos indicaría una subexpresión.

En caso de contar con los datos, se incluirán resultados de las muestras procesadas en la tesis de la M.C. Michelle G. Santoyo Suarez, los cuales servirían como un control sin dieta y con daño cardíaco por isoproterenol, este grupo se indicará como Ctrl-Ctrl. Esto enriquecerá el análisis de los datos obtenidos en este trabajo.

7.3.1 Resultados de los genes asociados a KLFs

7.3.1.1 KLF4

En la figura 2 se presentan los cambios en los niveles de expresión (Fold Change) del gen para KLF4, de los días 1 al 7 post-insulto con isoproterenol. Se muestran los tres grupos experimentales de este proyecto: Caf-Caf Ctrl-Caf y Ctrl-Ctrl (derivado de la tesis de maestría de la M.C. Michelle G. Santoyo Suarez). En la **Figura 2** podemos observar una sobreexpresión del gen KLF4 durante los 7 días analizados para los dos grupos de experimentación (Caf-Caf y Ctrl-Caf) en comparación con el grupo de referencia Ctrl-Ctrl. Adicionalmente, se observó un aumento significativo en los niveles de expresión del grupo Caf-Caf en comparación con las muestras del grupo Ctrl-Caf desde el primer día hasta el sexto. ése encontró una similitud en el patrón de expresión en ambos grupos (Caf-Caf y Ctrl-Caf), observando que su pico de máxima expresión se encuentra en el día 1 y posteriormente baja para volver a subir en días posteriores.

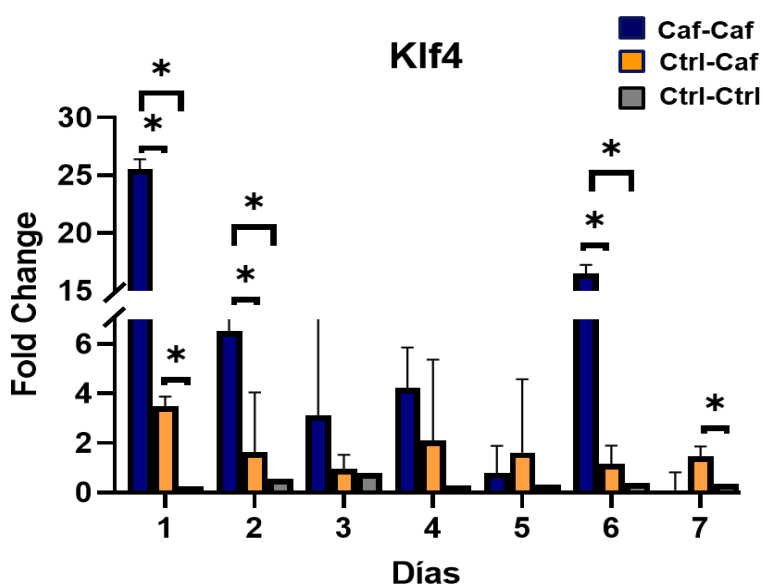
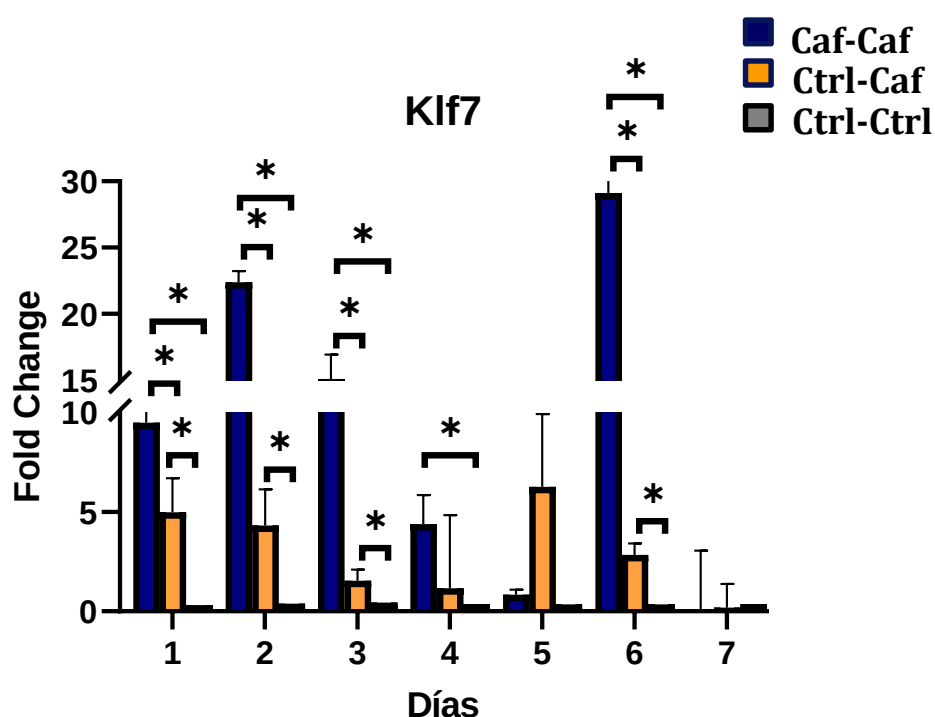


Figura 7: Niveles **de expresión genética de KLF4** normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.1.2 KLF7

Similar al caso con KLF4, en la **Figura 8** podemos observar los Fold Change de la expresión del gen de KLF7. En el gráfico podemos observar que hay un aumento de la expresión en los grupos Caf-Caf y Ctrl-Caf en comparación al grupo de control. Al igual que en el caso anterior, el grupo Caf-Caf presentó una mayor expresión global de KLF7 a comparación del grupo Ctrl-Caf, siendo el día 5 la única excepción. Podemos observar que nuevamente los grupos comparten un patrón similar de expresión, teniendo el máximo nivel de expresión días después de la inducción de daño, el día 5 para el grupo Ctrl-Caf y el día 6 para el grupo Caf-Caf. Finalmente es importante señalar que el día 7 hubo un nivel de expresión de KLF7 significativamente menor al resto de los días.



*Figura 8: Niveles de expresión genética de KLF7 normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$*

7.3.1.3 KLF11

Siguiendo con el patrón de expresión de KLF11 podemos observar que este tuvo mayores niveles de Fold Change que los dos grupos presentados anteriormente, llegando a magnitudes de 1×10^4 unidades. En la **Figura 9** podemos observar dos cuestiones interesantes, la primera, este nivel de expresión abundante para el grupo de Caf-Caf comparando con los otros dos

tratamientos, y la segunda, la similitud en el patrón de expresión para ambos grupos en los días 3, 4 y 5, donde podemos observar una regulación de los niveles, manteniéndose constantes durante estos tres días, fenómeno que no se ha observado en los genes analizados anteriormente. Adicionalmente podemos observar, nuevamente, la sobreexpresión del gen en ambos grupos en comparación con el grupo de control. Es interesante hacer notar que a diferencia de los KLFs observados anteriormente, KLF11 presenta picos de expresión máxima en días distantes para ambos grupos, siendo el día 1 para el grupo de Caf-Caf y el día 7 para Ctrl-Caf. Este patrón podría indicar que la respuesta de KLF11 al estímulo de daño es más tardía en el grupo de Ctrl-Caf al compararse con el grupo Caf-Caf.

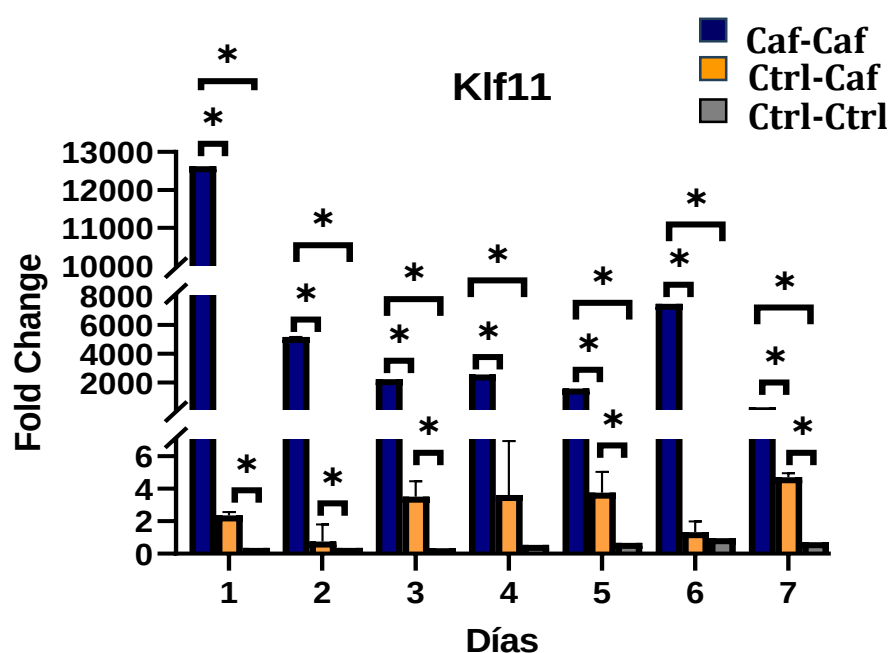


Figura 9: Niveles de expresión genética de KLF11 normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.1.4 KLF12

La Figura 10 de expresión de KLF12 se observó que hay Fold Change mayor en el grupo de Caf-Caf que Ctrl-Caf; el grupo Ctrl-Ctrl carece de datos ya que no se realizaron mediciones para este gen en este grupo. El grupo Ctrl-Caf tiene mayor nivel de expresión que el grupo Caf-Caf, en el día 5 y 7. En cuanto a los días de máxima expresión podemos observar que,

como en el caso de KLF11, los días son distintos para ambos grupos, siendo el día 1 para el grupo Caf-Caf y el día 5 para el grupo Ctrl-Caf.

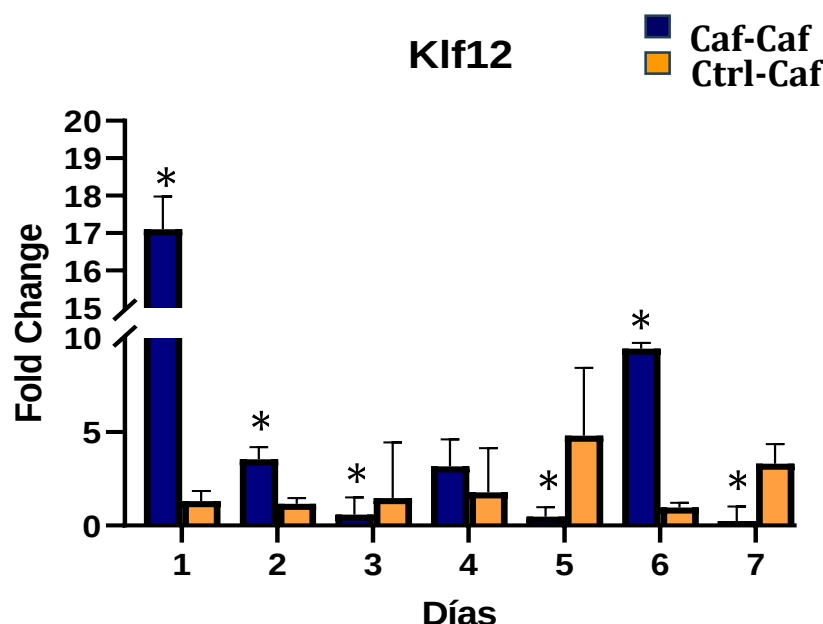


Figura 10: Niveles **de expresión genética de KLF12** normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.1.5 KLF13

En la **Figura 11** se observan los patrones de expresión de KLF13, nuevamente no se incluyen datos del grupo Ctrl-Ctrl. De la misma forma que en los genes anteriormente analizados, el grupo Caf-Caf presentó un mayor nivel de expresión global a lo largo de la semana analizada, pero este grupo tuvo un menor Fold Change que el grupo Ctrl-Caf en los días 4 y 7. En este gen podemos observar un comportamiento singular de los patrones de expresión ya que, notoriamente, se observa que los grupos tienen un comportamiento opuesto. El grupo Caf-Caf tiene su pico de máxima expresión en el primer día post-insulto y posteriormente, comienza a disminuir la expresión hasta volverse equivalente al control en el séptimo día. El grupo Ctrl-Caf en cambio comienza con una sobreexpresión de menor magnitud que el grupo Caf-Caf en el día 1 y esta se eleva con el paso de los días hasta llegar a su pico de máxima expresión en el día 7.

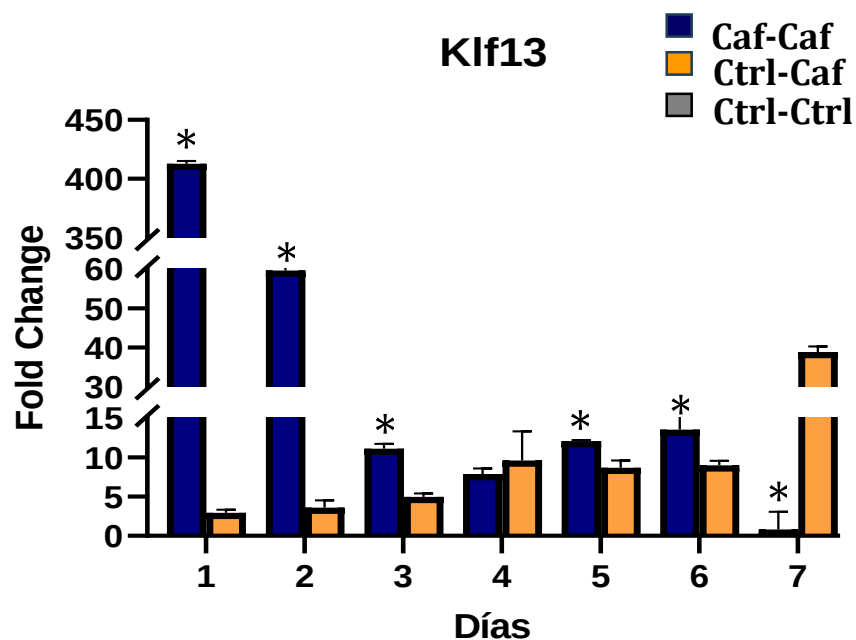


Figura 11: Niveles de expresión genética de *KLF13* normalizada a *GAPDH* y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.1.6 *KLF15*

Finalmente se tienen los resultados de cambios en el nivel de expresión del *KLF15*, incluyendo el grupo Ctrl-Ctrl (**Figura 12**). Se observó que el grupo sin efecto de la dieta, Ctrl-Ctrl mostró una subexpresión generalizada a través de los 7 días analizados contrario a los grupos pertenecientes a este trabajo. Además, se encontró que ocurrió un aumento en los niveles de expresión en gran parte de las muestras del grupo Caf-Caf, pero hubo un día en el que este se encontró subexpresado, el día 7. El grupo Ctrl-Caf en cambio tuvo niveles menores en comparación, pero nunca hubo una subexpresión del gen de *KLF15*. Cabe resaltar también que el comportamiento del grupo Ctrl-Caf es más similar al patrón que presentó el grupo Ctrl-Ctrl; esto puede ser un indicio de que la variable de una dieta hipercalórica durante la gestación pueda ser una variable con mayor peso en este gen.

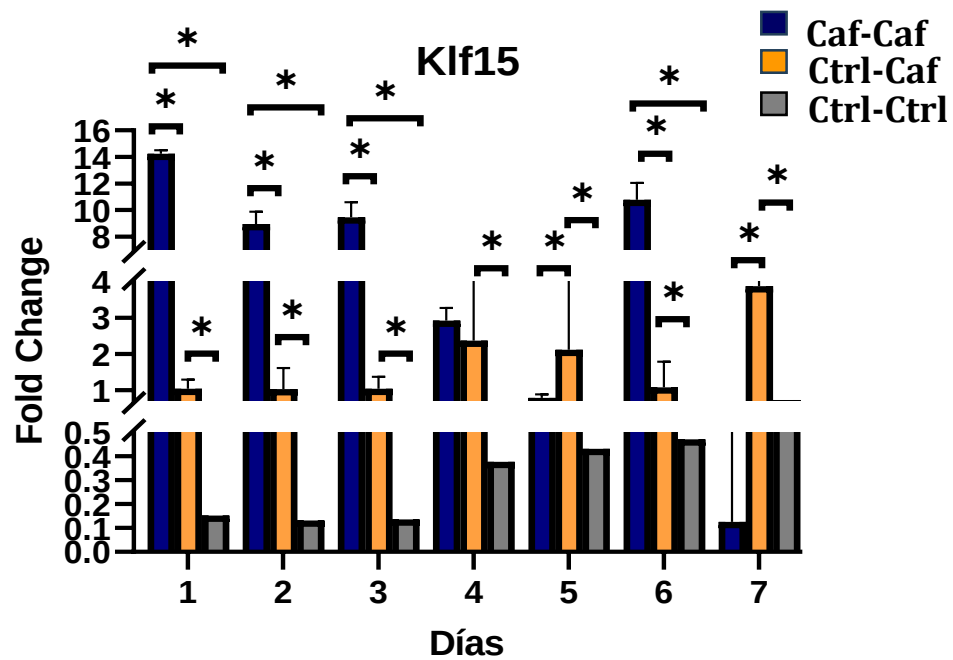


Figura 12: Niveles **de expresión genética de KLF15** normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

A continuación, se incluye una tabla que resume los resultados obtenidos:

Tabla 4: Resumen de resultados de qPCR para genes de KLF

Gen	Día de máxima expresión		Día de mínima expresión	
	Ctrl-Caf	Caf-Caf	Ctrl-Caf	Caf-Caf
KLF4	Día 1	Día 1	Día 3	Día 7
KLF 7	Día 5	Día 6	Día 7	Día 7
KLF 11	Día 7	Día 1	Día 2	Día 7
KLF12	Día 5	Día 1	Día 6	Día 7
KLF 13	Día 7	Día 1	Día 1	Día 7
KLF 15	Día 7	Día 1	Días 1-3	Día 7

7.3.2 Resultados de los genes asociados a respuesta inflamatoria

7.3.2.1 IL-1 β

Los resultados (**Figura 13**) nos muestran como hubo un aumento en la expresión del gen IL1 β en los grupos Caf-Caf y Ctrl-Caf conforme al grupo Ctrl-Ctrl. Adicionalmente notamos que hubo una expresión más elevada en el grupo Ctrl-Caf en comparación al grupo Caf-Caf, sobre todo en el día 1 posterior al tratamiento, lo cual difiere de los resultados para los genes de KLF donde el grupo Caf-Caf tenía mayores niveles de expresión global. Podemos observar que el pico máximo de ambos días varía, siendo el día 1 para el grupo Ctrl-Caf y el día 6 para el grupo Caf-Caf, esto contrastando con lo observado para los genes de KLF 4, KLF 11, KLF 12, KLF 13 y KLF 15, donde la expresión máxima de los genes era temprana para el grupo Caf-Caf y tardía para Ctrl-Caf. También se encontró que la expresión de IL-1 β presentaba un con una tendencia de subir y bajar progresivamente.

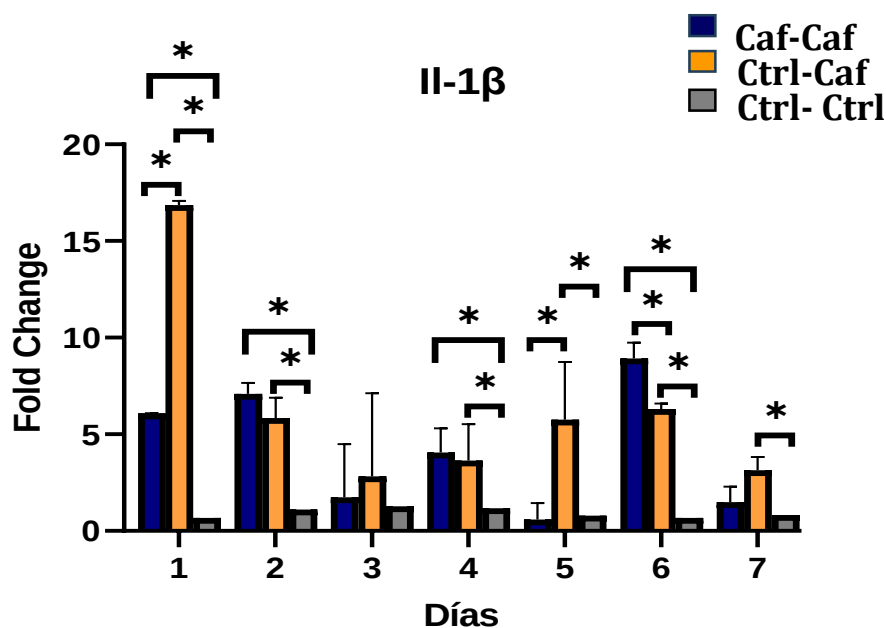


Figura 13: Niveles de expresión genética de IL-1 β normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.2.2 IL-6

Al igual que en el caso del gen anterior, IL-6 se ve mayormente expresado en el grupo de Ctrl-Caf. Se puede observar que el grupo de Ctrl-Caf incrementa en su nivel de expresión del gen de IL-6 desde el día 1 y continúa aumentando hasta su pico máximo en el día 7. En cambio, el grupo Caf-Caf llega a su pico máximo en el día 3 y posteriormente presenta niveles equivalentes a los del grupo Ctrl-Ctrl. Esto lleva a pensar que la alimentación de cafetería puede llevar a incrementar la respuesta inmune.

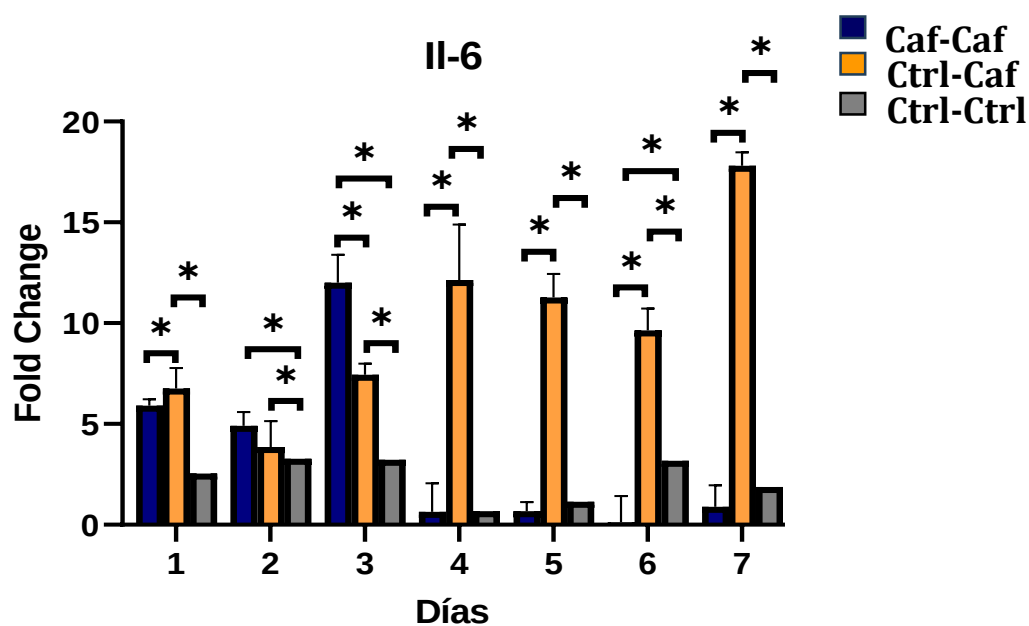


Figura 14: *Datos de expresión genética de IL-6 normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. *P<0.05*

7.3.2.3 *TNF- α*

Este gen también codifica para un factor de la respuesta inmune. Los resultados de este gen, así como los siguientes en este trabajo, carecen de mediciones del grupo Ctrl-Ctrl. Ambos grupos presentan una elevación del nivel de expresión, pero se puede observar que el grupo Caf-Caf tiene un nivel significativamente mayor que el grupo Ctrl-Caf. En este caso la elevación de *TNF- α* en el grupo Caf-Caf es mucho más marcada y esta continúa elevada hasta su pico máximo alcanzado a los 6 días post tratamiento, para luego descender al nivel del grupo Ctrl-Caf en el día 7. El grupo Ctrl-Caf por su parte, aunque sobreexpresado, no llega a los niveles del grupo Caf-Caf; este grupo alcanza su pico máximo al día 5 y posteriormente vuelve a descender. Estos datos podrían indicar que la regulación de *TNF- α* es menos controlada en el grupo de Caf-Caf.

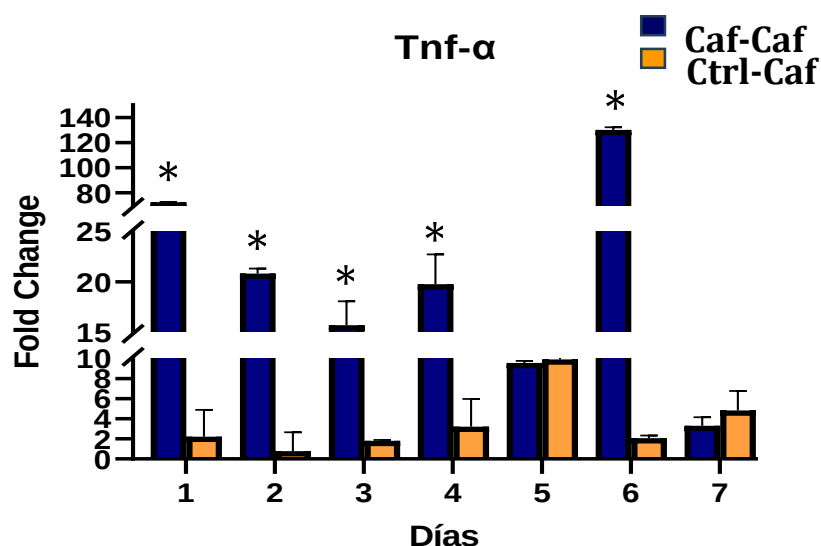


Figura 15. Niveles de expresión genética de *TNF- α* normalizada a *GAPDH* y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.2.4 *NF- κ B*

El grupo de Caf-Caf tiene mayores niveles de expresión de *NF- κ B* a lo largo de los 7 días y comienza con un pico de máxima expresión al día 1 que va disminuyendo con el paso de los días. El grupo Ctrl-Caf en cambio tiene su pico de mínima expresión en el día 1 y sube hasta alcanzar su máxima expresión en el día 5, para finalmente volver a disminuir a niveles

basales al séptimo día. Como en el caso de los tres genes de la respuesta inmune antes presentados, el gen de NF- κ B presenta un patrón muy distinto entre ambos grupos.

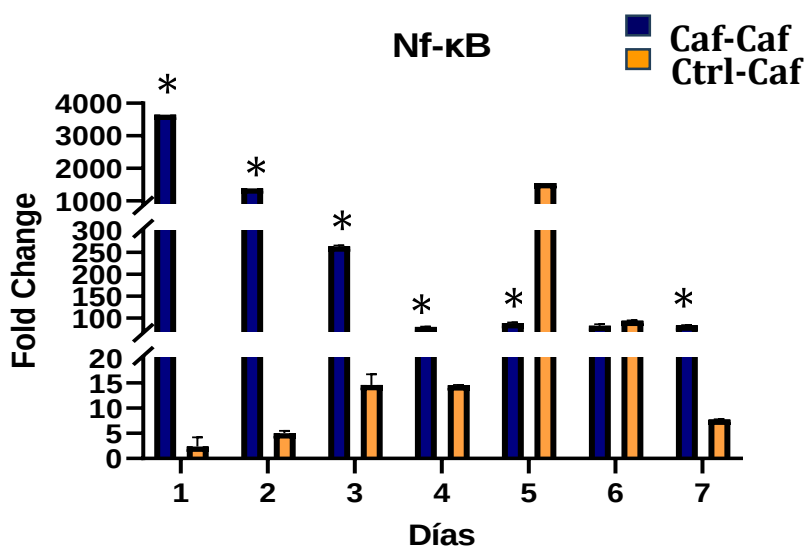


Figura 16: Niveles de expresión genética de NF- κ B normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.3 Resultados de los genes asociados a conductividad y contractilidad cardiaca

7.3.3.1 ATP2A2

Los datos obtenidos por qPCR (**Figura 17**) nos muestran que ambos grupos (Caf-Caf y Ctrl-Caf) presentan una sobreexpresión del gen, hasta el día 7 donde las muestras de ambos grupos presentan una subexpresión significativa infiriendo una desactivación de la transcripción de este gen. Además, se observaron que los patrones de expresión de ATP2A2 son similares con respecto al tiempo, con la distinción de los picos de máxima expresión del grupo Caf-Caf, que, si bien se encuentran en los mismos días, cuentan con un Fold Change mucho mayor. Adicionalmente el hecho de tener niveles más elevados en el grupo de Caf-Caf marcan un indicio de la importancia de la dieta de una madre gestante.

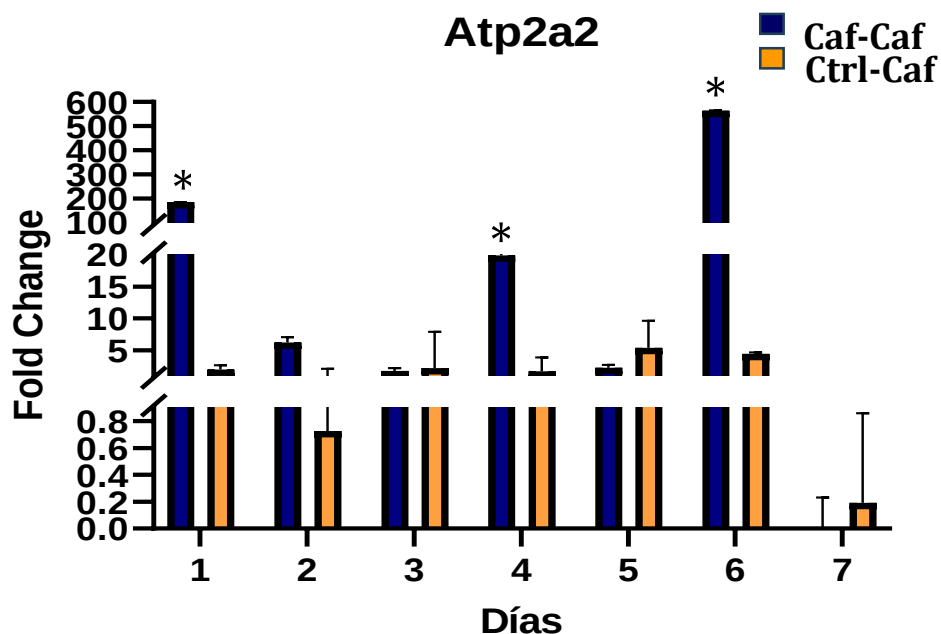


Figura 17. Niveles de expresión genética de ATP2A2 normalizada a GAPDH y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.3.2 RYR2

En la **Figura 18** se muestran los niveles de expresión de RYR2, observamos que el grupo Caf-Caf nuevamente tiene los niveles de expresión más altos, y, adicionalmente, el grupo Ctrl-Caf sólo presenta una sobreexpresión del gen RYR2 en el día 5 tras la inyección de isoproterenol. El grupo Caf-Caf en cambio tiene su punto de máxima expresión en el día 1 y se llega a subexpresar en el día 7.

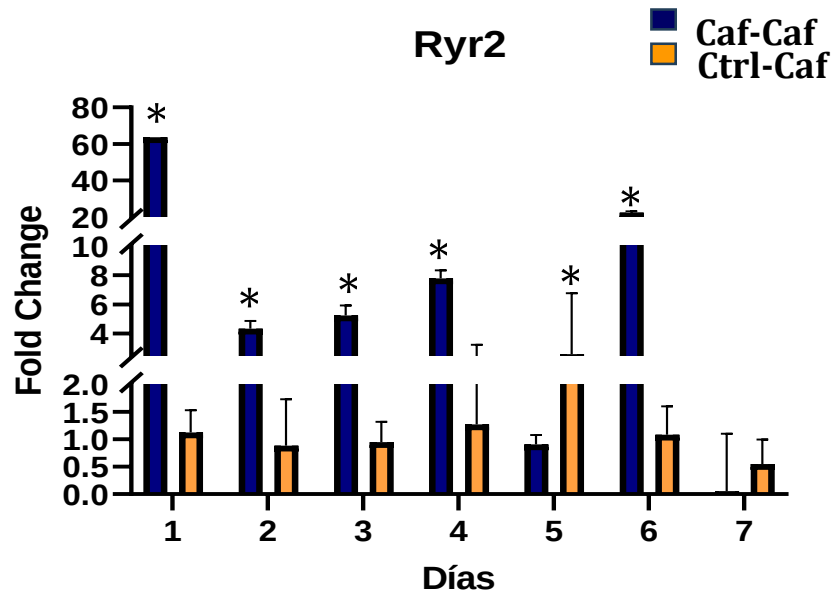


Figura 18: Niveles de expresión genética de *RYR2* normalizada a *GAPDH* y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.3.3 *SLC8A1*

Los resultados que observamos por análisis de qPCR nos muestran un aumento en la expresión del gen *SLC8A1* en ambos grupos. Además, se puede recalcar que el comportamiento de las muestras del grupo Ctrl-Caf indican que ocurre un aumento de la expresión de este gen a etapas tardías del insulto, ya que su punto máximo de expresión es al día 7 y el día anterior la expresión ya se encuentra elevada. En el caso del grupo Caf-Caf, hay una elevación marcada en el día 6, siendo este el pico máximo, pero llega incluso a haber subexpresiones de este gen, como se observa en el día 5.

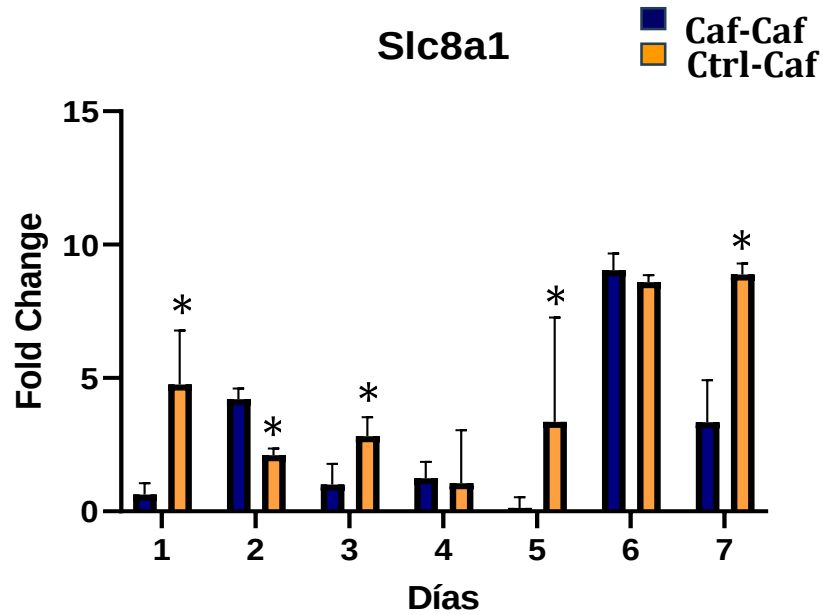


Figura 19: Niveles de expresión genética de *SLC8A1* normalizada a *GAPDH* y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

7.3.3.4 *KCNA2*

El gen *KCNA2* al igual que *SLC8A1* tuvieron una mayor expresión en el grupo de Ctrl-Caf, observando que incluso se ve subexpresado en todos los días en que se analizó para el grupo Caf-Caf. Esto nos hace ver que la variable que está teniendo mayor efecto debe ser asociada a la dieta que siguió la madre durante la gestación. También se puede observar que, aunque sean diferentes en magnitudes, ambos grupos siguieron el mismo patrón de expresión, con el día 6 como su día de máxima expresión.

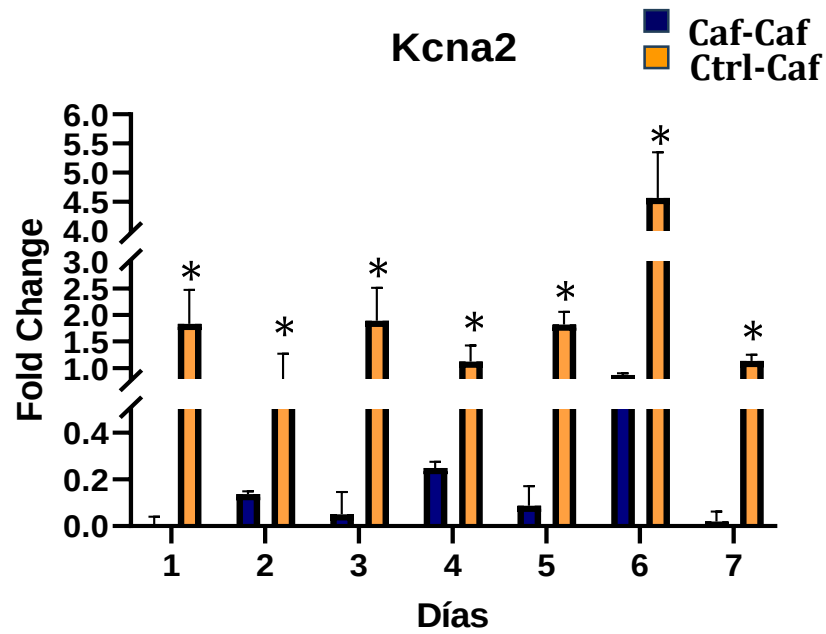


Figura 20: Niveles de expresión genética de *KCNA2* normalizada a *GAPDH* y expresado como media $\pm$ SEM. * $P < 0.05$

Como fue en el caso de los niveles de expresión de los genes de KLF, se resumen los resultados más relevantes de los genes relacionados a función cardíaca y a respuesta inmune en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Resumen de resultados de qPCR de genes asociados a respuesta inmune y función cardíaca

Gen	Día de máxima expresión		Día de mínima expresión	
	Ctrl-Caf	Caf-Caf	Ctrl-Caf	Caf-Caf
IL-1β	Día 1	Día 6	Día 3	Día 5
IL-6	Día 7	Día 3	Día 2	Día 6
TNF-α	Día 5	Día 6	Día 2	Día 7
NF-κB	Día 5	Día 1	Día 1	Día 4
ATP2A2	Día 5	Día 6	Día 7	Día 7
RYR2	Día 5	Día 1	Día 7	Día 7
SCL8A1	Día 6 y 7	Día 6	Día 4	Día 5
KCNA2	Día 6	Día 6	Día 2	Día 1

8.- DISCUSIÓN

Actualmente a pesar de los avances que se tiene del desarrollo y progresión de las CVD poco se conoce de los mecanismos moleculares clave que están involucrados durante el desarrollo de la fibrosis y que conllevan a el deterioro de la función normal de corazón. En la actualidad, los tratamientos para las CVD, como los trasplantes o los marcapasos, son muy costosos. Por ello, se ha explorado la posibilidad de utilizar moléculas pequeñas, como los factores de transcripción, como blancos terapéuticos o como formas de terapia.

Dentro de los nuevo abordajes se encuentran algunos factores de transcripción como los factores de la familia de los Krüppel-like. Los KLFs poseen una función cardiaca esencial durante el desarrollo del corazón. Sin embargo, su papel durante el fallo de la función cardiaca y su modulación en un escenario del establecimiento de la fibrosis posterior al infarto han sido poco explorados. Con el fin de establecer posibles blancos terapéuticos o utilizar a los mismos KLFs como terapia biológica fue estudiada su participación durante este trabajo.

Nos centramos en estudiar los niveles de expresión de los KLFs, en un modelo de daño cardiaco inducido por isoproterenol, expuesto a dieta alta en calorías de modo que se pudieran emular las condiciones que suele sufrir un paciente común con CVD. Basándonos en un modelo de hipertrofia cardiaca establecida anteriormente por el equipo de trabajo, se añadió el efecto de una dieta Caf con el fin de conocer el impacto de una dieta alta en calorías en el desenlace y daño ocasionado por una CVD. Además se estudió la relación de la dieta con los niveles de expresión de un grupo de genes relacionados con inflamación, conductividad y contractilidad cardiaca durante una fase temprana del insulto cardiaco, correspondiente a la primer semana tras inducir el daño en un modelo murino expuesto a dieta Caf desde el desarrollo embrionario o desde la edad temprana.

La dieta CAF es una dieta hipercalórica alta en grasas y azúcares procesadas; ya hay diversos reportes del efecto de la dieta CAF en el metabolismo cardiaco y cómo afectan a un modelo animal. Entre lo reportado, se sabe que una alimentación con dieta de cafetería ocasiona un aumento en el peso corporal del modelo animal, así como un incremento en la acumulación de tejido adiposo en el área abdominal (L. E. Mballa et al., 2021). Nuestros resultados siguen

esta tendencia, pudiendo observar que el peso de los animales alimentados con dieta CAF (**Tabla 1 y 2**) tienen un peso que en promedio excede los 200g a las 5 semanas de edad. Adicionalmente se sabe que la dieta de cafetería tiene un efecto directo en el volumen cardiaco, el cual aumenta en animales que son alimentados con dieta CAF (Hatton-Jones et al., 2022) fenómeno que también pudimos observar en nuestras muestras.

Encontramos la sobreexpresión generalizada de Klf4 a través de los 7 días estudiados en el grupo Caf-Caf y Ctrl-Caf en comparación del grupo Ctrl-Ctrl. Se ha visto que KLF4 tiene función para inhibir la apoptosis al inhibir a TP53 y reducir la expresión de BAX (Ghaleb & Yang, 2017). Esto nos habla que KLF4 al más elevado en el grupo Caf-Caf que Ctrl-Caf en nuestro modelo tras el insulto con isoproterenol, éste gen puede estar relacionado a la cantidad de apoptosis que está produciéndose en el tejido de los animales alimentados con dieta hipercalórica.

Los niveles de expresión máxima de KLF4 fueron en el día 1, para posteriormente disminuir y, aunque ocurren repentes en ciertos días, nunca alcanzar el nivel del primer día tras el insulto. El corazón pasa por un proceso de remodelación posterior a un IAM, conformado por tres fases, la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de maduración (**Figura 20**) las cuales se caracterizan por distintas poblaciones celulares y procesos regenerativos (Ferrini et al., 2019; Weil & Neelamegham, 2019)

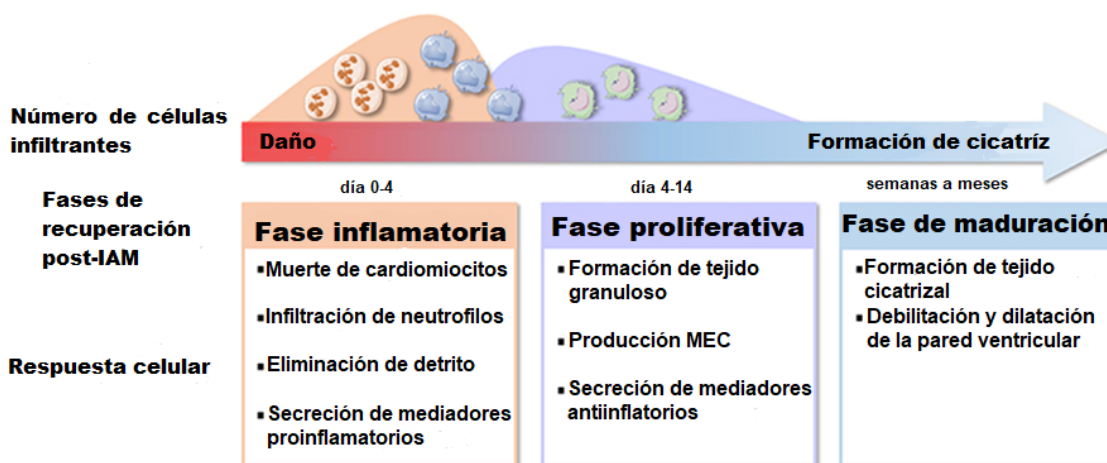


Figura 21: Fases de la remodelación cardíaca. Adaptado de Ferrini y colaboradores. 2019

De acuerdo con proceso natural de remodelación que sufre el corazón tras el IAM, la fase en la que se observa la mayor expresión de KLF4 es la fase inflamatoria, caracterizada principalmente por la muerte celular; además, su disminución progresivamente puede ser debido al cambio a la fase proliferativa, en la que ya no habría necesidad de que Klf4 siga regulando la apoptosis.

Según el trabajo de Ferrier y colaboradores, a partir del día 4 post IAM, inicia la fase proliferativa en la que, además de secretar mediadores antiinflamatorios, se empieza a presentar la producción de MEC o ECM (Ferrini et al., 2019) Esta MEC o ECM es secretada por miofibroblastos, los cuales proliferan durante esta fase al estarse diferenciando de los normalmente quiescentes, fibroblastos cardiacos (Weil & Neelamegham, 2019). Anteriormente ya se ha establecido que KLF4 tiene un papel específico en la promoción de esta diferenciación de fibroblastos cardiacos a miofibroblastos (Yi Zhang et al., 2013), por lo que, a mayor nivel de KLF4 expresado, mayor va a ser la tasa de diferenciación y por ende mayor el número de miofibroblastos productores de MEC en el órgano. Esto sugiere que el grupo Caf-Caf, que posee mayor expresión de Klf4 a partir del día 4, puede tener una mayor cantidad de miofibroblastos en su tejido y por ende su fibrosis va a ser más severa. Aun así, es necesario analizar esto de forma cuantitativa, ya sea por medio de análisis morfométrico o por citometría para detectar la población de miofibroblastos en muestras, para determinar si el grupo de Caf-Caf en verdad tiene un mayor daño que el grupo Ctrl-Caf como sugieren los niveles de expresión de KLF4. Esto nos hace pensar que la dieta alta en calorías durante la gestación y la edad reproductiva puede llegar a agravar los efectos de una CVD más de lo que lo hace en un organismo que solo consumió la dieta durante la edad reproductiva.

Se evaluó KLF7, conocido por estar expresado alrededor de diversos tejidos humanos, acuñándosele el nombre de “KLF ubicuo” y ya se conoce que tiene una participación importante en el desarrollo de tejido neuronal y adiposo (Mao et al., 2023). Adicionalmente se le ha relacionado con algunas enfermedades afines al metabolismo, la DM2 (Kanazawa et al., 2005; Kawamura et al., 2006) y con cáncer pulmonar (Niu et al., 2020), gástrico (Z. Jiang et al., 2017) y pancreático (Gupta et al., 2020) entre otros.

Los resultados obtenidos con el gen KLF7 demuestran una sobreexpresión a todos los tiempos evaluados, con excepción del día 7, donde se observa que hay una subexpresión. El

grupo de Caf-Caf presentó niveles superiores al grupo de Ctrl-Caf. En ambos grupos podemos observar una elevación de la expresión en los primeros días que comienza a disminuir al día 4, antes de volver a elevarse hasta su pico máximo en el día 6. Anteriormente ya se ha estudiado la relación del KLF7 con la respuesta inflamatoria en el corazón. En un estudio realizado con muestras de pacientes que sufrían de enfermedad coronaria, se encontró que había una elevación en el nivel de expresión de KLF7 en muestras de tejido adiposo epicárdico (TAE) (Huang et al., 2020). Esta elevación, se relacionó además con los niveles de expresión de algunos marcadores inflamatorios y quimioatrayentes en el TAE, los cuales se vieron elevados significativamente junto con KLF7 y se concluyó que eran parte de la causa para la enfermedad coronaria. Aunque esto haya sido reportado en TAE, puede que esté teniendo el mismo efecto en el tejido cardíaco, una elevación de KLF7 en los primeros días post-insulto está activando genes de la respuesta inflamatoria y que son capaces de atraer células de la respuesta inmune, como las que se encontraron en los cortes histológicos realizados (**Figura 6**) hacia adentro del tejido ventricular.

Aunque estas elevaciones iniciales en la expresión de KLF7 se pudieran relacionar con la fase inflamatoria de la remodelación cardíaca (**Figura 21**) su pico de máxima expresión no se encuentra dentro de los días de la fase inflamatoria, como sucedió para el KLF4. El pico de máxima expresión de KLF7 fue en los días 5 y 6 para los grupos de Ctrl-Caf y Caf-Caf respectivamente. Esto sugiere que la elevación inicial de este gen se deba a la respuesta inflamatoria de este proceso de remodelación, pero sus posteriores picos de máxima expresión deben de ocurrir debido a un proceso adicional.

En un estudio por Wang y colaboradores se determinó que KLF7 tiene un papel en la modulación del metabolismo de un corazón patológico, como lo es un corazón con hipertrofia o que ha llegado al nivel de falla cardíaca (C. Wang et al., 2023). En el estudio se habla de cómo tanto una sobreexpresión como un silenciamiento del gen de KLF7 puede causar un desbalance metabólico en el tejido cardíaco, este desbalance a su vez es capaz de agravar la patología cardíaca, poniendo un énfasis en la hipertrofia cardíaca. En un estudio similar, se encontró que tanto en pacientes con DM2, como en modelos murinos de DM2 una expresión elevada de KLF7 en secciones de aorta, indicando una conexión entre el estado metabólico sistémico y los niveles de KLF7 en el corazón (Hulshoff et al., 2023). De forma similar, el

efecto de los lípidos en el endotelio arterial se estudió por medio de un modelo similar a la aterosclerosis utilizando células de cordón umbilical suplementadas con ox-LDL, en donde se observó que ocurría una disminución de la expresión del gen de KLF7 y esta disminución a su vez disminuía la viabilidad de las células (H. Jiang & Lv, 2021). Estos estudios sugieren que KLF7 puede estar mayormente involucrado en la función metabólica del corazón y del organismo como tal.

Los resultados obtenidos para este gen en el análisis de qPCR muestra que hay una activación inicial del gen tras el insulto con isoproterenol. Debido a su participación reportada en la respuesta inmune y su actividad de reclutar células inflamatorias, nuestros resultados sugieren que el gen de KLF7 está siendo activado para actuar en la respuesta inflamatoria correspondiente a la administración del fármaco. Los estudios descritos anteriormente sugieren que KLF7 puede estar modificando sus niveles de expresión no sólo como parte de la modulación de la respuesta inmune, sino también por participar en la modulación de diversas vías metabólicas. Esto también sería una forma de explicar la diferencia entre los grupos de este estudio, que contaban con dieta CAF, y los grupos de trabajo de la M.C. Michelle G. Santoyo Suarez, donde los niveles de expresión son mucho menores y hubo alimentación solamente con dieta control. KLF7 pareciera tener una participación importante en la modulación energética de un corazón con cualquier proceso de daño. Por todo lo anterior considero que sería interesante observar si KLF7 es capaz de modularse para poder evitar o revertir el daño causado en modelos similares a los utilizados en este trabajo.

Evaluamos KLF11 debido a que es un factor de transcripción con poco estudio en la función cardiaca, pero se tiene bien establecido que la expresión de este gen está relacionada con la enfermedad diabética de tipo MODY (Sun et al., 2021) para la cual incluso se ha considerado que pueda llegar a ser un gen de diagnóstico predictivo. Adicionalmente también se ha asociado a KLF11 con distintos tipos de cáncer como lo son el adenocarcinoma pulmonar (Guangyin Zhao et al., 2023), osteosarcoma (Y. Wang et al., 2021) y cáncer de mama (Lin et al., 2023), aunque, de forma más significativa para el sistema cardiovascular, también se ha estudiado la participación de KLF11 en las afectaciones cerebrovasculares (Yin et al., 2013) llegando a considerarse un gen con una función protectora esencial en el sistema cerebrovascular (X. Zhang et al., 2020; Zhou et al., 2022).

En cuanto a los resultados obtenidos para la expresión de KLF11, se encontró la sobreexpresión en los grupos Caf-Caf y Ctrl-Caf contra el Ctrl-Ctrl. En cuanto a su patrón de expresión se obtuvo un pico máximo al día 1 en el grupo de Caf-Caf y un pico en el día 7 para el grupo Ctrl-Caf, el cual coincide con el pico de mínima expresión del grupo Caf-Caf. Esto nos lleva a pensar en que la activación de la transcripción para el gen de KLF11 es en etapas tempranas para el grupo de Caf-Caf y tardía en el grupo de Ctrl-Caf. Se ha reportado la relación que tiene el nivel de KLF11 en la homeostasis de las células endoteliales y lo esencial de este para mantener la integridad del tejido cardiaco. La sobreexpresión de Klf11 en nuestro modelo murino puede deberse a un esfuerzo del organismo de mantener la integridad del tejido endotelial cardiaco posterior al insulto de isoproterenol.

Adentrándonos un poco en la función conocida de KLF11, se conoce que KLF11 es esencial para la protección del sistema cerebrovascular en el caso de sufrir por un proceso de daño o isquemia. Se ha estudiado que KLF11 puede inducir la transcripción del gen de PPAR γ (Yin et al., 2013), el cual es capaz de reducir la expresión del mir-15a, reconocido por sus funciones proapoptóticas en tejido nervioso, promoviendo la protección de células endoteliales en el tejido cerebrovascular. Adicionalmente, un estudio de la capacidad de KLF11 de mantener la función y estructura de las células endoteliales vasculares en la barrera hematoencefálica reveló que KLF11 es capaz de unirse al promotor del gen de la ocludina y el gen ZO-1 (X. Zhang et al., 2020), productores de proteínas esenciales para las uniones estrechas entre células endoteliales y encargados de mantener la estructura de los vasos sanguíneos contruidos por estas. De forma similar se ha visto este fenómeno en el endotelio vascular del sistema cardiovascular, donde se encontró que pacientes y modelos animales con aneurisma aórtica tenían una disminución de la expresión de KLF11 en el tejido endotelial de la aorta, además de un aumento muerte celular por apoptosis (Guizhen Zhao et al., 2021).

Entre otras funciones conocidas de KLF11 también se ha estudiado su papel en la activación de la respuesta inmune. En un estudio por Zhou y colaboradores se encontró que la delección genómica de KLF11 en un modelo murino de daño cerebral ocasionó un incremento en la polarización de la microglía en un fenotipo inflamatorio y una disminución en la población de microglía antinflamatoria (Zhou et al., 2022). En un modelo animal de delección del gen

de KLF11 y daño renal se encontró una mayor infiltración de macrófagos en el tejido y una elevación en la expresión de citocinas proinflamatorias esto comparado con un control sin delección de KLF11 (De Lorenzo et al., 2022). En células endoteliales se ha observado que la expresión de KLF11 es inversamente proporcional a la intensidad del fenotipo proinflamatorio, esto al estudiar la sobreexpresión del gen por medio de un vector lentiviral, sin ningún estímulo de daño, mientras que en modelos animales con daño por LPS se observó un mayor reclutamiento de leucocitos en el endotelio vascular cuando hay delección de KLF11 (Fan et al., 2012). Con la información presentada, se sugiere que KLF11 es capaz de proteger contra un perfil proinflamatorio en los tejidos, por lo tanto, en el caso de nuestros grupos de estudio la función puede ser similar. Los niveles de expresión elevados de KLF11 en comparación con el control, pueden deberse a una respuesta compensatoria de la inflamación ocasionada por el daño causado por la administración de isoproterenol.

Finalmente se ha podido relacionar a la expresión de KLF11 con modificaciones en la expresión de genes relacionados con la fibrosis posterior a un daño, principalmente por vías activadas por medio de TGF- β (De Lorenzo et al., 2022). En este caso una disminución de la expresión de KLF11 por medio de delección, incrementó la expresión de genes profibróticos como Stat1, SMAD1-5 y Plau (De Lorenzo et al., 2022). Este fenómeno podría explicar el segundo incremento en la expresión de KLF11 en el grupo de Caf-Caf en el día 6 y el pico de máxima expresión del grupo Ctrl-Caf en el día 7. Según el fenómeno de remodelación cardíaca mencionado anteriormente (**Figura 21**) a partir del día 4 post daño cardíaco, empieza a haber una producción de matriz extracelular, incluyendo fibras de colágeno. Esto sugiere que en este escenario KLF11 está actuando como mecanismo de compensación para este proceso de producción de matriz extracelular al contrarrestar la expresión de TGF- β .

El gen de KLF12 tiene un papel importante en el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Entre las actividades que se le han adjudicado a la expresión de KLF12 se encuentra la de promover la supervivencia de las células cancerígenas. En estudios de cáncer de pulmón de células pequeñas se ha observado que KLF12 es capaz de unirse al promotor del gen de PD-L1 el cual es capaz de detener la respuesta inmune contra múltiples tipos de células cancerosas (Pan et al., 2023). Esta capacidad de promover la producción de PD-L1 ha sido aprovechada para inducir sensibilidad a ciertas quimioterapias dirigidas a este receptor en tipos de cáncer

que suelen tener una baja expresión de PD-L1 y KLF12 (Zheng et al., 2023). En un estudio en cáncer de mama se encontró que KLF12 es capaz de inhibir la transcripción de p21, por medio de ubiquitinación de la proteína p53 (Y. Li et al., 2023). Por último, en estudios de células madre de tumor pancreáticas se encontró que la expresión de KLF12 está relacionada con la capacidad de estas células de mantenerse pluripotenciales, y al inhibir la expresión de KLF12 se logró reducir la población de células madre de tumor pancreáticas

Nuestro análisis de los niveles de expresión de KLF12 reveló que el gen se vio sobreexpresado en el grupo de Caf-Caf, alcanzando un pico máximo en el día 1 post-insulto. El grupo Ctrl-Caf en cambio tuvo una expresión basal, con excepción del día 5 y 7 donde hubo una sobreexpresión, siendo el día 5 el punto máximo. Aunque no hay estudios que discutan el papel de KLF12 en el tejido cardiaco, por su papel conocido en distintos tipos de cáncer, se puede concluir que KLF12 tiene capacidades relacionadas tanto con la supervivencia celular como con la inducción de la pluripotencialidad de las células. Estas características de KLF12 sugieren que el gen se ve sobreexpresado cuando está induciendo un efecto protector contra la apoptosis, como el que puede ocurrir para proteger de un daño. Siendo que el grupo Caf-Caf tuvo un pico de alta expresión de KLF12 en el día uno, es posible sugerir que este pico se deba a una actividad compensatoria por parte del KLF12 en respuesta a la muerte celular excesiva ocasionada por el insulto cardiaco en etapas agudas del daño. En cuanto al grupo de Ctrl-Caf cuyo pico máximo ocurre posterior, es posible que sea debido a que el daño en este grupo tarda más tiempo en llegar a un punto en el que requiera ser modulado. Esto podría indicar que el bagaje generacional de la dieta Caf está haciendo al grupo Caf-Caf más susceptible al daño causado por el isoproterenol. Sin embargo más estudios. Son necesarios para llegar a la comprensión de su función y participación en las CVD.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión del gen Klf13 mostraron una sobreexpresión significativa en los grupos de Ctrl-Caf y Caf-Caf. El grupo de Caf-Caf tiene una elevación desde el día 1 post-insulto con isoproterenol, siendo este el de mayor expresión en la semana de estudio, para posteriormente disminuir progresivamente hasta llegar a su punto de mínima expresión, el día 7. Al contrario, el grupo Ctrl-Caf tiene su día de mínima expresión observada en el día 1 posterior al daño, y se elevaba progresivamente hasta llegar

a su pico de máxima expresión en el día 7, aunque sin llegar al mismo nivel de expresión que presentaba el grupo Caf-Caf en su pico máximo.

KLF13 es un factor que tiene un papel definido en el desarrollo cardíaco, ya que es esencial para la activación de el gen de desarrollo cardíaco fetal, GATA-4; incluso se ha observado que la mutación en el gen de KLF13 es causante de enfermedades cardíacas congénitas (Lavallée et al., 2006) como la miocardiopatía dilatada congénita (Guo et al., 2022). Debido a esto, en estudios más recientes se han hecho investigaciones con el propósito de determinar el efecto que tiene el factor KLF13 en un corazón adulto y en un corazón con daño. Entre los resultados publicados se ha observado que KLF13 es esencial para proteger a los cardiomiocitos de daño en el DNA y muerte celular ocasionada por administración de fármacos como la doxorrubicina, y su silenciamiento podría llevar a una falla cardíaca por cardiotoxicidad relacionada a fármacos (Cruz-Topete et al., 2016) indicio del papel de protección cardíaca del KLF13. En otro modelo celular de daño cardíaco, se estableció que la expresión de KLF13 puede ser modulada por el RNA largo no codificante FTX, donde la sobreexpresión de FTX, y por consiguiente de KLF13, se relacionó con una supresión de la apoptosis tras la inducción de daño con peróxido de hidrógeno (Yamin Zhang et al., 2020). De forma aún más reciente, se ha descubierto que la sobreexpresión de KLF13 en un modelo de inducción de daño por LPS o por sepsis, fue capaz de disminuir el daño en el tejido cardíaco y disminuir la apoptosis de cardiomiocitos mediada por la respuesta inmune, comprobando además que mecanísticamente este efecto fue dado por la capacidad de KLF13 de inhibir vías de inflamación como la de NF- κ B (Zeng et al., 2023).

Los resultados obtenidos en este trabajo para el grupo de Caf-Caf indican que KLF13 está llevando a cabo su respuesta de protección contra el daño desde el día 1 post-insulto y al disminuir su nivel con el paso de los días se puede sugerir que la expresión de este factor pierde su capacidad de combatir el daño o que la muerte celular va en caída, como lo sugiere el proceso natural de remodelación cardíaca. El grupo de Ctrl-Caf en cambio muestra una activación progresiva de KLF13 donde el último día llega a su pico máximo, indicando que es posible que KLF13 solo requiera llevar a cabo su función antiapoptótica en días posteriores, lo cual indicaría que el nivel de muerte celular fue menor en el grupo de Ctrl-Caf, cosa que ya se ha visto sugerida por los resultados en las mediciones de otros miembros

de la familia de los KLFs. Aun así, resulta necesario medir más marcadores de daño cardíaco o de muerte celular para afirmar que KLF13 está cumpliendo con esta función propuesta de protección contra la muerte celular de los cardiomiocitos.

Finalmente en términos de los KLF, tenemos a KLF15, un factor que, a diferencia de los otros en este estudio, no se encuentra clasificado dentro de algún sub grupo de la familia de los KLFs (García-Loredo et al., 2024). Aunque este factor se ha visto relacionado con distintas enfermedades, es de los pocos KLFs que se ha estudiado con un enfoque en el tejido cardíaco y su participación en el mismo. En este estudio se decidió medir el nivel de expresión de este gen debido a la cantidad de efectos que tiene este en la homeostasis cardíaca.

Una de las razones por las cuales se ha enfocado el estudio de KLF15 en el tejido cardíaco es porque ya se ha reportado que KLF15 es un factor esencial para el desarrollo prenatal del corazón, siendo capaz de controlar la distribución y diferenciación de las células progenitoras de tejido cardíaco (Noack et al., 2012b). Se ha visto incluso que la expresión de ciertos genes controladores del ciclo celular con capacidad de reprimir la expresión de KLF15 pueden llegar a ocasionar disfunción cardíaca en días tempranos postnatales (Hashimoto et al., 2022). Adicionalmente ya se ha determinado que los niveles de expresión de mRNA de KLF15 en necropsias de corazones con falla cardíaca se encuentran disminuidos en comparación con muestras control sin daño (Haldar et al., 2010). En nuestros podemos observar cómo nuestros grupos parecieran asemejarse con estas mediciones realizadas en humanos por Haldar y colaboradores, esto debido a que los niveles de expresión del gen parecieran disminuir con el paso de los días, al igual que sucede en un corazón con falla cardíaca.

Un ejemplo del mecanismo compensatorio que puede estar llevando a cabo KLF15 en el tejido cardíaco dañado es la inhibición de la hipertrofia cardíaca. En años anteriores, se ha reportado que una sobreexpresión del nivel de KLF15 en modelos *in vitro* de hipertrofia por dosis de angiotensina II (Ang II) en cardiomiocitos es suficiente para prevenir el crecimiento de las células (Leenders et al., 2012) esto debido a su capacidad de disminuir la expresión de diversos genes pro-hipertróficos cardíacos (Patel et al., 2017, 2018). Otra de las funciones protectoras de KLF15 está relacionada a su capacidad de inhibir el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), el cual es un factor activador de fibrosis presente en la cicatrización

cardiaca (B. Wang et al., 2008) que se presenta en la segunda y tercera fase de la remodelación cardiaca posterior a un daño (Ferrini et al., 2019). Por último, KLF15 participa también como modulador de la respuesta inmune en los procesos de remodelación cardiaca al disminuir los niveles de expresión de los genes CXCL1 y CXCR2, productores de una quimiocina y su receptor que son capaces de reclutar macrófagos al tejido cardiaco en modelos celulares de hipertrofia por adición de Ang II (He et al., 2021). En general KLF15 funciona como un protector de daño en el tejido cardiaco, siendo uno de los genes que se encuentra diferencialmente expresados en la mayoría de los tratamientos contra daño cardiaco, por ejemplo, en el tratamiento con la proteína CTRP12 para daño por isquemia reperusión cardiaca (Liao & Tian, 2022) y en tratamientos contra la enzima WWP1 conocida por su papel en cardiomiopatías no isquémicas (X. Lu et al., 2023).

De acuerdo con los resultados en los niveles de expresión de KLF15 (**Figura 12**) se puede observar en el grupo Ctrl-Caf, se mantienen en su mayoría en un nivel de expresión basal, equivalente a un Fold Change de 1, con excepción de los días 4, 5 y 7. El grupo de Caf-Caf en cambio se observa sobreexpresado en todos los días de estudio, con excepción del día 5 donde se encuentra a un nivel basal y el día 7 donde se ve significativamente subexpresado. Los picos presentados en el inicio de nuestras mediciones para el grupo de Caf-Caf, y en días esporádicos para el grupo de Ctrl-Caf, sugieren un mecanismo de compensación por parte de KLF15, que, acorde a lo reportado funciona como inhibidor de hipertrofia, inflamación, o fibrosis, con el fin de reducir el daño al tejido cardiaco. La disminución de Klf15 en días posteriores sucede en la mayoría de los casos de IAM donde KLF15 se encuentra subexpresado (Halder et al., 2010). Por último, comparándolo con el grupo Ctrl-Ctrl, observamos que los resultados son de subexpresión en los 7 días de estudio, sugiriendo que la variable de la dieta pueda ser la causante de estas discrepancias en los niveles de expresión.

Debido a que KLF15 es un regulador importante del metabolismo cardiaco de lípidos, recordando que estos son su fuente principal de energía (Prosdocimo et al., 2014) (Prosdocimo et al., 2015). ; creemos que el incremento en la expresión de KLF15 desde el día 1 post-insulto con isoproterenol en el grupo Caf-Caf puede deberse a esta sobreactivación de la vía de oxidación de lípidos ocasionado por la dieta consumida por el animal de estudio y por su ascendencia. Es por ello, que la mayor expresión está en Caf-Caf y Ctrl-Caf con

respecto al Ctrl-Ctrl. Con estos resultados podemos pensar que una dieta alta en grasas puede inducir la sobreactivación de KLF15 en el tejido cardiaco, efecto que se ve agravado cuando existe una carga generacional de consumo de este tipo de dieta.

En este trabajo se midieron los niveles de expresión de cuatro genes relacionados con la respuesta inflamatoria, estos fueron IL-1 β , IL-6, TNF- α y NF-kB; estos genes se activan en respuesta a un daño en los tejidos, pero en este estudio la finalidad fue encontrar una relación entre la activación de estos y los niveles de los KLFs estudiados.

IL-1 β es una citocina de tipo proinflamatorio que se ve elevada normalmente después de un episodio de IAM en el tejido cardiaco (Cheng et al., 2023). En un estudio realizado en el año 2023 incluso se determinó que el día 3 postinfarto es el día donde se alcanza el pico poblacional de monocitos productores de IL-1 β en el tejido cardiaco (T. Li et al., 2022). En el caso de este estudio se logró determinar que hubo una sobreexpresión significativa del gen durante los siete días de estudio con los niveles más altos de IL-1 β encontrados en el día 1 post insulto en el grupo de Ctrl-Caf. En ambos grupos podemos observar una tendencia de iniciar con un nivel alto en el día 1 para posteriormente bajar hasta el día 3 y volver a elevarse a partir del día 4. Este patrón puede ser explicado por las fases de la remodelación cardiaca, recordando que la fase inflamatoria, donde se esperaría que hubiera mayores niveles de IL-1 β consiste en los días 1 al 3 post IAM (Ferrini et al., 2019). Estas elevaciones en días iniciales de la expresión del gen se pueden deber a este proceso de remodelación, en cambio los picos posteriores en los que hay una sobreexpresión pero de menor magnitud pueden deberse al fenómeno de reclutamiento de células de la respuesta inmune ya que, como se mencionó antes, se alcanza la población más alta de células productoras de IL-1 β hasta el día 3 post IAM (T. Li et al., 2022) lo que ocasionaría que a partir del día 4 hubiera un incremento de esta interleucina, similar a lo observado en nuestros gráficos.

La IL-6 es también una citocina que se ha encontrado que se eleva en el tejido cardiaco posterior a un IAM (Cheng et al., 2023). Adicionalmente esta citocina se ha visto directamente relacionada con el área de infarto en el tejido cardiaco observado en necropsias (Groot et al., 2019) sugiriendo que los niveles elevados de expresión de este gen son indicio de un daño tisular mayor. Al igual que IL-1 β las fases de la remodelación cardiaca también nos sugieren que este gen se debería de ver sobreexpresado durante la fase inflamatoria

(Ferrini et al., 2019). En el caso de este trabajo podemos observar que efectivamente hay una sobreexpresión del gen de IL-6 en los grupos de estudio durante los 3 primeros días post IAM, pero observamos que a partir del día 4 hay una disminución significativa de la expresión en el grupo de Caf-Caf mientras que el grupo de Ctrl-Caf llega a un nivel de expresión aún mayor al observado en los primeros tres días. Esto sugiere que, según el modelo de alimentación utilizado, hay un fenómeno que está disminuyendo la capacidad de respuesta al daño de IL-6 en el grupo de Caf-Caf o está aumentando la respuesta de IL-6 en el grupo Ctrl-Caf.

El (*TNF- α*) es una citocina proinflamatoria con participación en la activación de distintas vías de señalización como lo son la apoptosis, la fibrosis y la oxidación de especies reactivas (*TNF Tumor Necrosis Factor [Homo Sapiens (Human)] - Gene - NCBI*, n.d.). Esta también se ha visto elevada después de un IAM en el tejido cardíaco y en suero (Cheng et al., 2023). De manera específica, se ha vinculado a la elevación de TNF- α con la producción de fibrosis, al participar en la activación de genes codificantes para la producción de fibras de colágeno y matriz extracelular (Mo et al., 2020). Los resultados obtenidos (**Figura 15**) nos demuestra un incremento en los niveles de expresión del gen de TNF- α para ambos grupos, con un aumento más marcado en el grupo de Caf-Caf. Además, se observa que ambos grupos tuvieron un pico de expresión en la segunda fase de la remodelación cardíaca, la fase proliferativa. Esta fase se caracteriza por una producción de matriz extracelular y la acumulación de células de la respuesta inmune (Ferrini et al., 2019) lo cual podría estar relacionado a la expresión del gen de TNF- α que tiene funciones para producción de fibras. En el grupo de Caf-Caf se observa un aumento inicial en el día 1 post-insulto con isoproterenol significativo al compararse con el grupo de Ctrl-Caf, que, tomando en cuenta las propiedades y funciones de TNF- α , puede deberse a un estado inflamatorio inicial más grave en el tejido obtenido del grupo Caf-Caf.

El último gen medido en relación con la respuesta inflamatoria fue NF- κ B, este es un gen que codifica para una proteína con función de factor transcripcional. Se conoce que NF- κ B es capaz de translocarse al núcleo de las células y estimular la transcripción de genes asociados a diversos procesos, comúnmente asociados a la inflamación y en procesos apoptóticos y se sabe que puede ser activado por el resto de los genes inflamatorios

estudiados, IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Se ha reportado que niveles elevados de NF-kB se asocian con la disfunción cardíaca debido a un aumento en la apoptosis de cardiomiocitos (L. Zhao et al., 2017). Adicionalmente, ya se ha determinado que hay una elevación en los niveles de expresión de NF-kB en modelos animales de IAM tratados específicamente con isoproterenol como es el caso de este trabajo (Manjunatha et al., 2020). Nuestros resultados muestran una elevación significativa en los niveles de expresión del gen para NF-kB con un aumento máximo en el día 1 post-insulto para el grupo Caf-Caf y un aumento gradual hasta llegar al máximo en el día 5 para el grupo Ctrl-Caf. Estos picos máximos pueden estar relacionados a la cantidad de daño presente en el tejido, como se mencionó por Manjunatha y colaboradores, sugiriendo que el grupo Caf-Caf sufrió un mayor daño tras la administración de isoproterenol (Manjunatha et al., 2020). Finalmente también se ha observado que la programación fetal puede inducir una expresión elevada en un gran número de citocinas proinflamatorias (Matuszewska et al., 2021) donde se incluyen aquellas estudiadas en este trabajo. Las diferencias entre los grupos experimentales evaluados en el caso de los genes inflamatorios, la diferencia en las magnitudes de expresión se puede deber justamente a este fenómeno de programación fetal.

Nuestro último grupo de genes estudiado fueron aquellos pertenecientes a funciones esenciales cardíacas, la contractilidad y la conductividad. Estos genes pertenecen a dos genes encargados de controlar el proceso de contracción muscular en el corazón, ATP2A2 y RYR2, y dos genes encargados de la conducción de la señal eléctrica de marcapasos cardíaco, SLC8A1 y KCNA2. Esta elección de genes fue gracias a un estudio bioinformático previo de nuestro equipo de trabajo, donde se predijeron genes blanco de KLF en diversas CVDs.

Como se mencionó anteriormente, ATP2A2 es el gen codificador para la enzima SERCA2a, encargada de la translocación de calcio hacia el retículo sarcoplásmico (Q. Lu et al., 2022) lo que permite la contracción del músculo cardíaco. Anteriormente ya se ha reportado que la enzima SERCA2a pierde su capacidad funcional normal después de un IAM, reduciéndose la capacidad contráctil del corazón (Dally et al., 2006).

En nuestros resultados observamos un comportamiento opuesto, donde en realidad se encontró una sobreexpresión de los niveles del gen ATP2A2 en la mayoría de las muestras estudiadas, lo que sugiere que debería haber una ganancia de la función de su enzima. Aun

así, existe un solo reporte, aunque de una fecha antigua, que evidencia que la expresión del gen ATP2A2 a nivel de proteína no sufre ningún cambio tras un IAM, pero la enzima sufre una disminución en su capacidad de transporte de calcio (Schwinger et al., 1995). Con la poca literatura sobre el estudio de este gen, se puede inferir que la expresión del gen puede tener variación, pero los niveles proteicos se mantienen, siendo la pérdida de su función la verdadera causa por la que el corazón pierde su capacidad contráctil. Debido a esto es necesario profundizar más en las vías en las que actúa la enzima SERCA2a y encontrar cual es la causa de que la proteína no pueda cumplir con sus funciones.

El gen de RYR2 codifica para la proteína receptora de rianodina, y es la misma proteína encargada de liberar el calcio de retículo sarcoplásmico (Szentandrassy et al., 2022), complementando la acción del gen ATP2A2. El receptor de rianodina es el encargado de realizar la relajación del músculo cardíaco, por lo cual debe ser capaz de actuar en momentos determinados, al igual que SERCA2a. En cuanto a modificaciones en su expresión, en un estudio por Waddell y colaboradores, se observó que la proteína RYR2 gana sensibilidad al calcio posterior a un IAM por un mecanismo desconocido, aunque existen algunas propuestas explicadas en el mismo estudio (Waddell et al., 2023).

Aunque no hay reportes de modificaciones en la expresión del gen RYR2 a nivel de proteína o de mRNA, los resultados de este trabajo muestran una expresión basal en el grupo de Ctrl-Caf de forma global durante los 7 días estudiados, pero se observa una sobreexpresión en el grupo de Caf-Caf. La literatura sugiere que RYR2 se vuelve sensible al calcio, ocasionando que actúe y libere calcio del retículo sarcoplásmico antes de tiempo, y por lo tanto el músculo cardíaco se relaje cuando no debería. Esto, adicionado con la producción elevada de la proteína de RYR2 que podría estar pasando en el grupo de Caf-Caf, podría ser un indicador de una menor capacidad contráctil en el tejido cardíaco del grupo Caf-Caf en comparación al grupo Ctrl-Caf. Cabe aclarar que esto es una suposición y se deben realizar pruebas adicionales de flujo cardíaco para determinar si esta posibilidad existe.

El gen de SLC8A1 codifica para una bomba de intercambio de sodio y calcio cuyo rol principal es la conducción de la señal eléctrica desde el nodo atrial hasta el nodo atrioventricular, funcionando como el marcapasos del músculo cardíaco (Sano et al., 2014). De lo poco que se sabe de los niveles de expresión de este gen es que un aumento en la

expresión se ha visto relacionado con un incremento en el área de daño postinfarto en el tejido cardíaco (Xie et al., 2021). En el caso de nuestro proyecto, podemos observar que los resultados de expresión de ambos grupos de estudio están elevados en comparación al control. Adicionalmente se puede observar que la expresión de SLC8A1 incrementa con el paso de los días post insulto con isoproterenol. La información de la literatura y nuestros resultados en conjunto, sugieren que con el paso de los días la expresión de SLC8A1 y el área de daño en el tejido cardíaco van en aumento.

Finalmente, el gen de KCNA2 codifica para un canal de potasio dependiente de voltaje. Este está encargado de recibir y transmitir las señales eléctricas que controlan el ritmo cardíaco (Lee et al., 2013), de la misma forma que hacen los canales de SLC8A1. Ya se ha reportado anteriormente que la actividad de KCNA2 se reduce como función cardioprotectora para reducir el ritmo cardíaco y de esa forma no forzar el músculo cuando pierde su capacidad contráctil (Chen et al., 2010). Nuestros resultados demuestran una disminución de la expresión de KCNA2 en el grupo de Caf-Caf, como se menciona en la publicación de Chen y colaboradores. El grupo Ctrl-Caf en cambio se encuentra sobreexpresado en 6 de los 7 días analizados, lo cual podría indicar que no hay necesidad de proteger contra daño, esto se relaciona con los resultados del resto de genes de contractilidad y conductividad cardíaca, ya que a lo largo de este estudio se han observado resultados que sugieren que el grupo Ctrl-Caf padece de un menor nivel de daño que el grupo de Caf-Caf. Aun así, se requieren resultados adicionales ya que con solo saber los niveles de expresión y sus variaciones a través de los días no podemos tener certeza del estado de las muestras utilizadas, desde el daño ocasionado por la administración de isoproterenol, como los estados histológicos según las fases de remodelación cardíaca.

En cuanto a los efectos de la dieta de cafetería sobre ciertos genes, ya se ha reportado anteriormente el efecto de la dieta CAF en genes relacionados a la inflamación, fibrosis, producción de especies reactivas y apoptosis. En un estudio por Abdelwahab y colaboradores se encontró que la dieta de cafetería ocasiona un aumento en los niveles proteicos de IL-6 y TNF- α tanto en suero como en corazón, además una activación de genes profibróticos y un aumento en la muerte celular debido a una activación de la transcripción de los genes Bax y caspasa-3 (Abdelwahab et al., 2023). Esto se ve relacionado con nuestros resultados donde

también pudimos observar la sobreexpresión de los genes IL-6 y TNF- α , además del aumento en la expresión de NF-kB que, como se mencionó anteriormente, es capaz de activar genes profibróticos y por último observamos el incremento en expresión de KLFs que responden a la apoptosis, incluso desde el día 1 tras el insulto con isoproterenol, como el KLF4, KLF7, KLF 12 y KLF13.

Otro factor que resalta en nuestros resultados son las diferencias entre el grupo de Caf-Caf y el Ctrl-Caf, cuya única diferencia está en si la dieta tiene más de una generación siendo usada como alimento. El efecto de la dieta de una madre durante la gestación y la lactancia sobre su descendencia es lo que se conoce como programación fetal, la cual ya fue introducida en los antecedentes. La original teoría de la programación fetal, también conocida como teoría del origen fetal, menciona que la CVD se ve estrechamente relacionada con adaptaciones ocasionadas por una desnutrición desbalanceada en el desarrollo fetal y esta puede afectar causando que la descendencia tenga un peso más bajo durante su desarrollo (Barker, 2001). Esto puede ser evidenciado en nuestros resultados donde se observa que pese a tener la misma edad y alimentarse con la misma dieta, los animales pertenecientes al grupo Caf-Caf tienen un tamaño de fémur, peso corporal y volumen cardiaco menor a los animales del grupo Ctrl-Caf. Este efecto puede atribuirse al fenómeno descrito por Barker, en el que la mala nutrición de la madre afectó el tamaño de las crías durante el desarrollo postnatal.

Aunque originalmente la teoría propuesta por Barker mencionaba que la desnutrición era la causante de algunas CVDs, se ha reportado que cualquier tipo de malnutrición, agente tóxico o estrés al que se exponga la madre durante la gestación y lactancia puede tener un efecto directo sobre la descendencia (Rodríguez-Rodríguez et al., 2018). Adicionalmente se ha observado que los modelos de programación fetal tienen un aspecto en común, el cual es la disminución de cardiomiocitos y la presencia de fibrosis cardiaca desde la infancia (Rodríguez-Rodríguez et al., 2018). Este fenómeno se puede ver relacionado con lo observado en los cortes histológicos (**Figura 6**) donde podemos encontrar una mayor cantidad de fibras aparentes en los cortes teñidos con tricrómico de Masson del grupo de Caf-Caf, aunque cabe aclarar que hace falta un análisis semicuantitativo de estas imágenes para poder llegar a afirmar este fenómeno.

9.- CONCLUSIÓN

En este estudio se encontró que hubo un efecto de la dieta consumida sobre la expresión de los genes de KLF, así como aquellos relacionados a la inflamación y a la función cardiaca. Se pudo observar que los grupos de trabajo de este proyecto tenían una mayor expresión de todos los genes analizados al compararse con el control de dieta con daño cardiaco. Esto nos da a entender que, al menos para el caso de los genes inflamatorios, la dieta es capaz de aumentar la agresividad de la respuesta inflamatoria o tal vez esta se encuentre activa antes del mismo insulto cardiaco. Adicionalmente los genes de KLFs también se vieron afectados por la dieta y dado a que todos estos están relacionados con actividad de reparación y respuesta a daño, la dieta de cafetería es capaz de inducir la activación de estos procesos. Aunque pareciera positivo el activar las vías de regeneración, reparación y respuesta al daño relacionadas a los KLFs, es posible que la dieta, al incrementar en exceso la expresión de estos genes, esté ocasionando un daño mayor de lo que logra reparar, pero para establecer esto es necesario seguir estudiando el efecto de las dietas consumidas hoy en día sobre la actividad cardiaca. Una vez se logre elucidar todas las interacciones entre moléculas reguladoras como lo son los KLFs y algunas proteínas importantes para el tejido cardiaco, va a ser posible utilizar a los KLFs como un blanco terapéutico o como terapia como tal. Sigue siendo importante el continuar estudiando las CVDs y de esta forma comprender mejor los procesos que las componen y las formas de inhibirlos.

10.- PERSPECTIVAS

Para lograr complementar este trabajo se sugiere realizar el análisis de expresión de los genes estudiados a nivel de proteína por medio de Western Blot, de esta forma asegurando que los resultados obtenidos de mRNA tengan correlación con la actividad de las proteínas codificadas. Además, sería interesante realizar inmunohistoquímicas para detectar las áreas de actividad de los distintos KLFs ya que se desconoce en qué células y en qué áreas de estas es que llevan a cabo su actividad. Por último, es de nuestro interés explorar las metilaciones presentes en los promotores, por medio de CHIP, en los genes de KLF, debido a que son los mecanismos de regulación más importantes para estos.

Parte de este trabajo ya se ha iniciado, específicamente la medición de las proteínas por medio de inmunohistoquímica, esto en colaboración con el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Hasta ahora se cuentan con cortes realizados en tejidos que se utilizan como control positivo para la presencia de los genes de estudio, como se muestra a continuación. Estos nos permitieron estandarizar la técnica y verificar la función de los anticuerpos adquiridos.

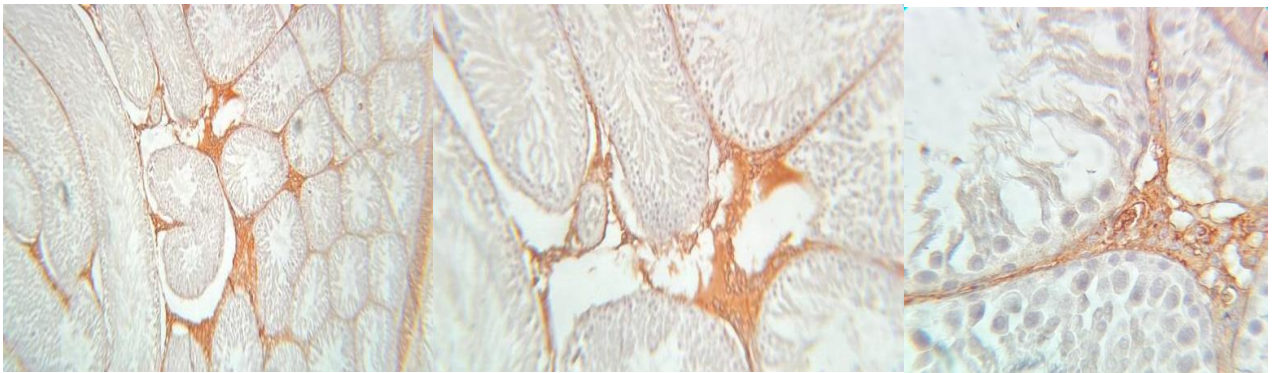


Figura 22: Cortes de testículo de rata marcados con anticuerpo anti-KLF15 con contraste de Hematoxilina.

Este trabajo se complementaría también con análisis en fases posteriores tras la inducción de daño cardíaco, ya que aquí se analizó solamente la fase temprana o inicial de lo que se asemeja a un proceso postinfarto. Sin mencionar que sería buen complemento explorar más genes relacionados a la actividad de los aquí estudiados, así como el resto de los KLFs que no se incluyen en este proyecto.

Esta parte de las perspectivas también se ha estado trabajando de forma que ya se amplió la lista de genes para analizar por PCR en tiempo real y se han estado realizando mediciones hasta el día 21 post tratamiento. Datos que se han resumido en un mapa de calor.

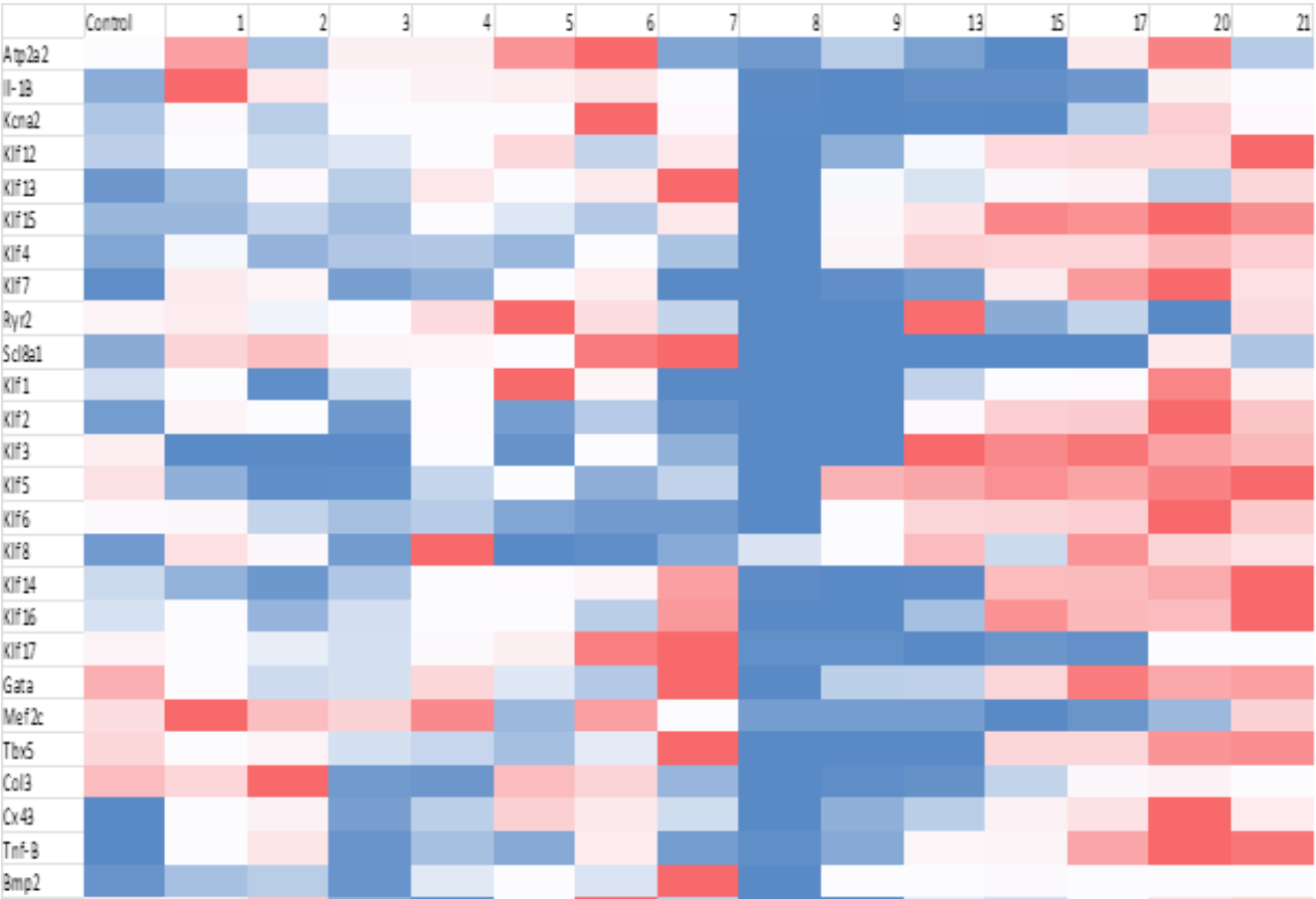


Figura 23: Expresión genética relativa cardiaca de diferentes genes asociados a función cardiaca e inflamación.

Los resultados que se obtengan de estos estudios adicionales se analizarán y se incluirán en el manuscrito original basado en este proyecto, el cual se encuentra en proceso de preparación.

11.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1. García Loredó, J.A., Santoyo-Suarez, M.G., **Rodríguez-Núñez, O.**, Benítez Chao, D.F., Garza-Treviño, E.N., Zapata-Morín, P.A., Padilla-Rivas, G.R., Islas, J.F. (2024) Is the Cis-Element CACCC-Box a Master Regulatory Element during Cardiovascular Disease? A Bioinformatics Approach from the Perspective of the Krüppel-like Family of Transcription Factors.

12.- REFERENCIAS

- Abdelwahab, A. H., Negm, A. M., Mahmoud, E. S., Salama, R. M., Schaalán, M. F., El-Sheikh, A. A. K., & Ramadan, B. K. (2023). The cardioprotective effects of secoisolariciresinol diglucoside (flaxseed lignan) against cafeteria diet-induced cardiac fibrosis and vascular injury in rats: an insight into apelin/AMPK/FOXO3a signaling pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2023.1199294/FULL>
- Adam, P. J., Regan, C. P., Hautmann, M. B., & Owens, G. K. (2000). Positive- and Negative-acting Kru " ppe-like Transcription Factors Bind a Transforming Growth Factor □ Control Element Required for Expression of the Smooth Muscle Cell Differentiation Marker SM22 □ in Vivo *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(48), 37798–37806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006323200>
- An, S., Moon, S., & Park, S. K. (2022). Association of metabolic comorbidity with myocardial infarction in individuals with a family history of cardiovascular disease: a prospective cohort study. *BMC Public Health*, 22(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s12889-022-14330-2>
- Athar, M. K., Bagga, S., Nair, N., Punjabi, V., Vito, K., Schorr, C., & Gerber, D. R. (2011). Risk of cardiac arrhythmias and conduction abnormalities in patients with acute myocardial infarction receiving packed red blood cell transfusions. *Journal of Critical Care*, 26(4), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2010.08.008>
- Barker, D. J. P. (2001). A new model for the origins of chronic disease. In *Health Care and Philosophy* (Vol. 4).
- Barquera, S., Pedroza-Tobias, A., & Medina, C. (2016). Cardiovascular diseases in mega-countries: The challenges of the nutrition, physical activity and epidemiologic transitions, and the double burden of disease. *Current Opinion in Lipidology*, 27(4), 329–344. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000320>
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2014). Short exposure to a diet rich in both fat

- and sugar or sugar alone impairs place , but not object recognition memory in rats. *Brain Behavior and Immunity*, 37, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.016>
- Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., Chiuve, S. E., Cushman, M., Delling, F. N., Deo, R., De Ferranti, S. D., Ferguson, J. F., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jiménez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., ... Muntner, P. (2018). Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. In *Circulation* (Vol. 137, Issue 12). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>
- Bhattacharyya, S., & Munshi, N. V. (2020). Development of the Cardiac Conduction System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(12), 1–21. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A037408>
- Chen, P., Dendorfer, A., Finol-Urdaneta, R. K., Terlau, H., & Olivera, B. M. (2010). Biochemical Characterization of κ M-R111J, a Kv1.2 Channel Blocker: EVALUATION OF CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF κ M-CONOTOXINS*. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 14882. <https://doi.org/10.1074/JBC.M109.068486>
- Cheng, P., Wang, X., Liu, Q., Yang, T., Qu, H., & Zhou, H. (2023). *Extracellular vesicles mediate biological information delivery : A double-edged sword in cardiac remodeling after myocardial infarction. February*, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1067992>
- Cruz-carrillo, G., Montalvo-martínez, L., Cárdenas-tueme, M., Bernal-vega, S., Maldonado-ruiz, R., Reséndez-pérez, D., Rodríguez-ríos, D., Lund, G., & Garza-ocañas, L. (2020). *Fetal Programming by Methyl Donors Modulates Central Inflammation and Prevents Food Addiction-Like Behavior in Rats*. 14(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00452>
- Cruz-Topete, D., He, B., Xu, X., & Cidlowski, J. A. (2016). Krüppel-like Factor 13 Is a Major Mediator of Glucocorticoid Receptor Signaling in Cardiomyocytes and Protects These Cells from DNA Damage and Death. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(37), 19374. <https://doi.org/10.1074/JBC.M116.725903>

- Curi-Quinto, K., Unar-Munguía, M., Rodríguez-Ramírez, S., Röss, E., Willett, W. C., & Rivera, J. A. (2022). Diet cost and quality using the Healthy Eating Index-2015 in adults from urban and rural areas of Mexico. *Public Health Nutrition*, 25(9), 2554–2565. <https://doi.org/10.1017/S1368980021004651>
- Curtiss, L. K., & Tobias, P. S. (2009). Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 50(SUPPL.), S340–S345. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800056-JLR200>
- Dally, S., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J. P., Clausen, J. D., Dode, L., Fanchaouy, M., Gelebart, P., Monceau, V., Del Monte, F., Gwathmey, J. K., Hajjar, R., Chaabane, C., Bobe, R., Raies, A., & Enouf, J. (2006). Ca²⁺-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochemical Journal*, 395(Pt 2), 249. <https://doi.org/10.1042/BJ20051427>
- de la Garza, A. L., Martínez-Tamez, A. M., Mellado-Negrete, A., Arjonilla-Becerra, S., Peña-Vázquez, G. I., Marín-Obispo, L. M., & Hernández-Brenes, C. (2023). Characterization of the Cafeteria Diet as Simulation of the Human Western Diet and Its Impact on the Lipidomic Profile and Gut Microbiota in Obese Rats. *Nutrients*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/nu15010086>
- De Lorenzo, S. B., Vrieze, A. M., Johnson, R. A., Lien, K. R., Nath, K. A., Garovic, V. D., Khazaie, K., & Grande, J. P. (2022). KLF11 deficiency enhances chemokine generation and fibrosis in murine unilateral ureteral obstruction. *PLoS ONE*, 17(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0266454>
- Doshi, D., & Marx, S. O. (2009). Ion channels, transporters, and pumps as targets for heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(4), 273. <https://doi.org/10.1097/FJC.0B013E3181A1B9C7>
- Drewnowski, A., Mennella, J. A., Johnson, S. L., & Bellisle, F. (2012). Sweetness and Food Preference. 7, 1142–1148. <https://doi.org/10.3945/jn.111.149575.1142S>
- ECG Waves. (n.d.). *The left ventricle in myocardial ischemia and infarction –*

Cardiovascular Education. Retrieved July 8, 2024, from <https://ecgwaves.com/topic/left-ventricle-ischemia-acute-myocardial-infarction-coronary-artery/>

Eriksson, J. G., Sandboge, S., Salonen, M. K., Kajantie, E., & Osmond, C. (2014). Long-term consequences of maternal overweight in pregnancy on offspring later health: Findings from the Helsinki Birth Cohort Study. *Annals of Medicine*, 46(6), 434–438. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.919728>

Fan, Y., Guo, Y., Zhang, J., Subramaniam, M., Song, C. Z., Urrutia, R., & Chen, Y. E. (2012). Krüppel Like Factor 11, a Transcription Factor Involved in Diabetes, Suppresses Endothelial Cell Activation via the NF- κ B signaling pathway: Fan, KLF11 Inhibits Endothelial Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(12), 2981. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300349>

Fedorowski, A., Burri, P., Hulthén, L., & Melander, O. (2009). The metabolic syndrome and risk of myocardial infarction in familial hypertension (Hypertension Heredity in Malmö Evaluation study). *Journal of Hypertension*, 27(1), 109–117. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328314b80a>

Ferrini, A., Stevens, M. M., Sattler, S., & Rosenthal, N. (2019). Toward Regeneration of the Heart: Bioengineering Strategies for Immunomodulation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 444715. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2019.00026/BIBTEX>

Flores-Moreno, B. J., Martínez-Andrade, G., Klünder-Klünder, M., Miranda-Lora, A. L., Beristain-Lujano, B., Flores-Huerta, S., Mendoza, E., Mayorga-Lima, A., Duque, X., & Vilchis-Gil, J. (2022). Evidence of Unhealthy Dietary Patterns in the School Lunch Sent from Home for Children in Mexico City. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(18). <https://doi.org/10.3390/ijerph191811650>

Friedlander, Y., Arbogast, P., Schwartz, S. M., Marcovina, S. M., Austin, M. A., Rosendaal, F. R., Reiner, A. P., Psaty, B. M., & Siscovick, D. S. (2001). Family history as a risk factor for early onset myocardial infarction in young women.

- Atherosclerosis*, 156(1), 201–207. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00635-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00635-3)
- García-Loredo, J. A., Santoyo-Suarez, M. G., Rodríguez-Nuñez, O., Benitez Chao, D. F., Garza-Treviño, E. N., Zapata-Morin, P. A., Padilla-Rivas, G. R., & Islas, J. F. (2024). Is the Cis-Element CACCC-Box a Master Regulatory Element during Cardiovascular Disease? A Bioinformatics Approach from the Perspective of the Krüppel-like Family of Transcription Factors. *Life*, 14(4), 493. <https://doi.org/10.3390/LIFE14040493/S1>
- Ghaleb, A. M., & Yang, V. W. (2017). Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*, 611, 27. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.02.025>
- Gomez-smith, M., Karthikeyan, S., Jeffers, M. S., Thomason, L. A., Stefanovic, B., & Corbett, D. (2016). A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiology & Behavior*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.09.029>
- Groot, H. E., Al Ali, L., van der Horst, I. C. C., Schurer, R. A. J., van der Werf, H. W., Lipsic, E., van Veldhuisen, D. J., Karper, J. C., & van der Harst, P. (2019). Plasma interleukin 6 levels are associated with cardiac function after ST-elevation myocardial infarction. *Clinical Research in Cardiology*, 108(6), 612. <https://doi.org/10.1007/S00392-018-1387-Z>
- Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004). Definition of Metabolic Syndrome. *Circulation*, 109(3), 433–438. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6>
- Grundy, S. M., Hansen, B., Smith, S. C., Cleeman, J. I., & Kahn, R. A. (2004). Clinical Management of Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(2), 551–556. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000112379.88385.67>
- Guo, Y. H., Wang, J., Guo, X. J., Gao, R. F., Yang, C. X., Li, L., Sun, Y. M., Qiu, X. B., Xu, Y. J., & Yang, Y. Q. (2022). KLF13 Loss-of-Function Mutations Underlying Familial Dilated Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 11(22), 27578. <https://doi.org/10.1161/JAHA.122.027578>

- Gupta, R., Malvi, P., Parajuli, K. R., Janostiak, R., Bugide, S., Cai, G., Zhu, L. J., Green, M. R., & Wajapeyee, N. (2020). KLF7 promotes pancreatic cancer growth and metastasis by up-regulating ISG expression and maintaining Golgi complex integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(22), 12341–12351. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2005156117/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Haldar, S. M., Lu, Y., Jeyaraj, D., Kawanami, D., Cui, Y., Eapen, S. J., Caili, H., Li, Y., Doughman, Y. Q., Watanabe, M., Shimizu, K., Kuivaniemi, H., Sadoshima, J., Margulies, K. B., Cappola, T. P., & Jain, M. K. (2010). Klf15 Deficiency Is a Molecular Link Between Heart Failure and Aortic Aneurysm Formation. *Science Translational Medicine*, 2(26), 26ra26. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3000502>
- Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology*, 12(3), 204–212. <https://doi.org/10.1038/ni.2001>
- Hashimoto, K., Kodama, A., Ohira, M., Kimoto, M., Nakagawa, R., Usui, Y., Ujihara, Y., Hanashima, A., & Mohri, S. (2022). Postnatal expression of cell cycle promoter Fam64a causes heart dysfunction by inhibiting cardiomyocyte differentiation through repression of Klf15. *IScience*, 25(5). <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2022.104337>
- Hatton-Jones, K., Cox, A. J., Peart, J. N., Headrick, J. P., & du Toit, E. F. (2022). Stress-induced body weight loss and improvements in cardiometabolic risk factors do not translate to improved myocardial ischemic tolerance in western diet-fed mice. *Physiological Reports*, 10(2), 15170. <https://doi.org/10.14814/PHY2.15170>
- He, S., Lu, Y., Guo, Y., Li, S., Lu, X., Shao, S., Zhou, H., Wang, R., Wang, J., Gao, P., & Li, X. (2021). Krüppel-Like Factor 15 Modulates CXCL1/CXCR2 Signaling-Mediated Inflammatory Response Contributing to Angiotensin II-Induced Cardiac Remodeling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.644954/FULL>
- Hedblad, B., Nilsson, P., Engström, G., Berglund, G., & Janzon, L. (2002). Insulin

- resistance in non-diabetic subjects is associated with increased incidence of myocardial infarction and death. *Diabetic Medicine*, 19(6), 470–475.
<https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2002.00719.x>
- Huang, W. H., Xue, Y. J., Zhou, Y. J., Wu, X. G., Wu, X. X., Zhang, X. X., Dong, X. X., & Wei, Y. T. (2020). KLF7 promotes macrophage activation by activating the NF- κ B signaling pathway in epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(12), 7002–7014.
https://doi.org/10.26355/EURREV_202006_21693
- Hulshoff, M. S., Schellinger, I. N., Xu, X., Fledderus, J., Rath, S. K., Wong, F. C., Maamari, S., Haunschild, J., Krenning, G., Raaz, U., & Zeisberg, E. M. (2023). miR-132-3p and KLF7 as novel regulators of aortic stiffening-associated EndMT in type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 15(1), 11.
<https://doi.org/10.1186/S13098-022-00966-Y>
- IMSS, I. M. D. S. S. (2009). Guía de Práctica Clínica Diagnóstico y Tratamiento de la Cardiopatía Isquémica Crónica. In *Instituto Mexicano del Seguro Social*.
<https://bit.ly/3bgcbUy>
- Ira Fox, S. (2011). *Fisiología Humana* (S. A. de C. V. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES (Ed.); 12va ed.). The McGraw-Hill Companies.
- Irakoze, L., Manirakiza, A., Zhang, Y., Liu, J., Li, J., Nkengurutse, L., Deng, S., & Xiao, X. (2021). Metabolic Syndrome in Offspring of Parents with Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis. *Obesity Facts*, 14(1), 148–162. <https://doi.org/10.1159/000513370>
- Jiang, H., & Lv, J. (2021). MicroRNA-301a-3p increases oxidative stress, inflammation and apoptosis in ox-LDL-induced HUVECs by targeting KLF7. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(6). <https://doi.org/10.3892/ETM.2021.10001>
- Jiang, Z., Yu, T., Fan, Z., Yang, H., & Lin, X. (2017). Krüppel-Like Factor 7 is a Marker of Aggressive Gastric Cancer and Poor Prognosis. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 43(3), 1090–1099.

<https://doi.org/10.1159/000481748>

- Kanazawa, A., Kawamura, Y., Sekine, A., Iida, A., Tsunoda, T., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kawai, K., Iizumi, T., Fujioka, T., Imanishi, M., Kaku, K., Iwamoto, Y., Kawamori, R., Kikkawa, R., Nakamura, Y., & Maeda, S. (2005). Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding Krüppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 48(7), 1315–1322. <https://doi.org/10.1007/S00125-005-1797-0>
- Kannel, W. B. (1995). Framingham Study Insights into Hypertensive Risk of Cardiovascular Disease. *Hypertension Research - Clinical and Experimental*, 18(3), 181–196. <https://doi.org/10.1291/hypres.18.181>
- Kawamura, Y., Tanaka, Y., Kawamori, R., & Maeda, S. (2006). Overexpression of Kruppel-like factor 7 regulates adipocytokine gene expressions in human adipocytes and inhibits glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cell line. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(4), 844–856. <https://doi.org/10.1210/ME.2005-0138>
- Khan, R. J., Gebreab, S. Y., Riestra, P., Xu, R., & Davis, S. K. (2014). Parent-offspring association of metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-140>
- Kong, P., Cui, Z. Y., Huang, X. F., Zhang, D. D., Guo, R. J., & Han, M. (2022). Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00955-7>
- Kwon, E. J., & Kim, Y. J. (2017). What is fetal programming?: A lifetime health is under the control of in utero health. *Obstetrics and Gynecology Science*, 60(6), 506–519. <https://doi.org/10.5468/ogs.2017.60.6.506>
- L. E. Mballa, D., Yadang, F. S. A., Tchamgoue, A. D., Mba, J. R., Tchokouaha, L. R. Y., M. Biang, E., T. Tchinda, A., Djomeni Dzeufiet, D. P., & Agbor, G. A. (2021). Cafeteria Diet-Induced Metabolic and Cardiovascular Changes in Rats: The Role of

Piper nigrum Leaf Extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5585650>

- Lakka, H. M., Laaksonen, D. E., Lakka, T. A., Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., & Salonen, J. T. (2002). The metabolic syndrome and total cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *Journal of the American Medical Association*, 288(21), 2709–2716. <https://doi.org/10.1001/jama.288.21.2709>
- 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>
- Lee, J. H., Choi, S. H., Lee, B. H., Hwang, S. H., Kim, H. J., Rhee, J., Chung, C. H., & Nah, S. Y. (2013). Activation of lysophosphatidic acid receptor by gintonin inhibits Kv1.2 channel activity: involvement of tyrosine kinase and receptor protein tyrosine phosphatase α . *Neuroscience Letters*, 548, 143–148. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2013.05.048>
- Leenders, J. J., Wijnen, W. J., van der Made, I., Hiller, M., Swinnen, M., Vandendriessche, T., Chuah, M., Pinto, Y. M., & Creemers, E. E. (2012). Repression of Cardiac Hypertrophy by KLF15: Underlying Mechanisms and Therapeutic Implications. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0036754>
- Ley, K., Miller, Y. I., & Hedrick, C. C. (2011). Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7), 1506–1516. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221127>
- Li, T., Yan, Z., Fan, Y., Fan, X., Li, A., Qi, Z., & Zhang, J. (2022). Cardiac repair after myocardial infarction: A two-sided role of inflammation-mediated. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCVM.2022.1077290>
- Li, Y., Li, S., Shi, X., Xin, Z., Yang, Y., Zhao, B., Li, Y., Lv, L., Ren, P., & Wu, H. (2023). KLF12 promotes the proliferation of breast cancer cells by reducing the transcription of p21 in a p53-dependent and p53-independent manner. *Cell Death & Disease*, 14(5).

<https://doi.org/10.1038/S41419-023-05824-X>

Liao, B., & Tian, X. (2022). CTRP12 alleviates cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury via regulation of KLF15. *Molecular Medicine Reports*, 26(1), 1–11.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12763>

Lin, L., Pfender, K., Ditsch, N., Kuhn, C., Rahmeh, M., Peng, L., Schmoeckel, E., Mayr, D., Trillsch, F., Mahner, S., Kessler, M., Jeschke, U., & Hester, A. (2023). KLF11 is an independent negative prognostic factor for breast cancer from a cohort study and induces proliferation and inhibits apoptosis in vitro. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*, 30(5), 758. <https://doi.org/10.1007/S12282-023-01470-5>

Lopez-Lopez, J., Lopez-Jaramillo, P., Camacho, P. A., Gomez-Arbelaez, D., & Cohen, D. D. (2015). The Link between Fetal Programming, Inflammation, Muscular Strength, and Blood Pressure. *Mediators of Inflammation*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/710613>

Lu, Q., Pan, B., Bai, H., Zhao, W., Liu, L., Li, G., Liu, R., Lv, T., Huang, X., Li, X., & Tian, J. (2022). Intracellular cardiac troponin I plays a functional role in regulating Atp2a2 expression in cardiomyocytes. *Genes & Diseases*, 9(6), 1689.
<https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2021.04.007>

Lu, X., Yang, B., Qi, R., Xie, Q., Li, T., Yang, J., Tong, T., Niu, K., Li, M., Pan, W., Zhang, Y., Shi, D., Li, S., Dai, C., Shen, C., Wang, X., Wang, Y., & Song, J. (2023). Targeting WWP1 ameliorates cardiac ischemic injury by suppressing KLF15-ubiquitination mediated myocardial inflammation. *Theranostics*, 13(1), 417–437.
<https://doi.org/10.7150/thno.77694>

Macut, D., Ognjanović, S., Ašanin, M., Krljanać, G., & Milenković, T. (2021). Metabolic Syndrome and Myocardial Infarction in Women. *Current Pharmaceutical Design*, 27(36), 3786–3794. <https://doi.org/10.2174/1381612827666210610114029>

Manjunatha, S., Shaik, A. H., E, M. P., Al Omar, S. Y., Mohammad, A., & Kodidhela, L. D. (2020). Combined cardio-protective ability of syringic acid and resveratrol against isoproterenol induced cardio-toxicity in rats via attenuating NF- κ B and TNF- α

pathways. *Scientific Reports*, 10(1), 3426. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59925-0>

Mao, Y., Chen, Y., & Zhang, Z. (2023). Molecular function of Krüppel-like factor 7 in biology: Molecular function of KLF7 in biology. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 55(5), 713. <https://doi.org/10.3724/ABBS.2023061>

Marciniak, A., Patro-ma, J., Marciniak, B., & Oleszczuk, J. (2017). *Fetal programming of the metabolic syndrome*. 56, 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.01.001>

Matuszewska, J., Zalewski, T., Klimaszyk, A., Ziarniak, K., Jurga, S., Chmurzynska, A., & Sliwowska, J. H. (2021). Mothers' cafeteria diet induced sex-specific changes in fat content, metabolic profiles, and inflammation outcomes in rat offspring. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-97487-X>

Mauricio, D., Castelblanco, E., & Alonso, N. (2020). Cholesterol and inflammation in atherosclerosis: An immune-metabolic hypothesis. *Nutrients*, 12(8), 1–4. <https://doi.org/10.3390/nu12082444>

Mayo Clinic. (2021). *Myocardial ischemia - Symptoms and causes*. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/myocardial-ischemia/symptoms-causes/syc-20375417>

McConnell, B. B., & Yang, V. W. (2010). Mammalian Krüppel-Like Factors in Health and Diseases. *Physiological Reviews*, 90(4), 1337. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00058.2009>

Medina, C., Tolentino-Mayo, L., López-Ridaura, R., & Barquera, S. (2017). Evidence of increasing sedentarism in Mexico City during the last decade: Sitting time prevalence, trends, and associations with obesity and diabetes. *PLoS ONE*, 12(12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188518>

Mente, A., Yusuf, S., Islam, S., McQueen, M. J., Tanomsup, S., Onen, C. L., Rangarajan, S., Gerstein, H. C., & Anand, S. S. (2010). Metabolic Syndrome and Risk of Acute Myocardial Infarction. A Case-Control Study of 26,903 Subjects From 52 Countries.

Journal of the American College of Cardiology, 55(21), 2390–2398.

<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.12.053>

Mo, F., Luo, Y., Yan, Y., Li, J., Lai, S., & Wu, W. (2020). *Relation between quantity and quality of peri-coronary epicardial adipose tissue and its underlying hemodynamically significant coronary stenosis*. <https://doi.org/10.1186/s12872-020-01775-9>

Montalvo-Martínez, L., Cruz-Carrillo, G., Maldonado-Ruiz, R., Trujillo-Villarreal, L. A., Cardenas-Tueme, M., Viveros-Contreras, R., Ortiz-López, R., & Camacho-Morales, A. (2022). Transgenerational Susceptibility to Food Addiction-Like Behavior in Rats Associates to a Decrease of the Anti-Inflammatory IL-10 in Plasma. *Neurochemical Research*, 47(10), 3093–3103. <https://doi.org/10.1007/S11064-022-03660-7>/METRICS

Nayak, L., Lin, Z., & Jain, M. K. (2011). “*Go With the Flow*”: How Krüppel-Like Factor 2 Regulates the Vasoprotective Effects of Shear Stress. 15(5).

NIH National Heart, Lung, and B. I. (2022a). *Atherosclerosis - Causes and Risk Factors*. <https://www.nhlbi.nih.gov/health/atherosclerosis/causes>

NIH National Heart, Lung, and B. I. (2022b). *Heart Attack - What Is a Heart Attack?* <https://www.nhlbi.nih.gov/health/heart-attack>

Niu, R., Tang, Y., Xi, Y., & Jiang, D. (2020). High Expression of Krüppel-like Factor 7 Indicates Unfavorable Clinical Outcomes in Patients with Lung Adenocarcinoma. *The Journal of Surgical Research*, 250, 216–223. <https://doi.org/10.1016/J.JSS.2019.12.053>

Noack, C., Zafiriou, M. P., Schaeffer, H. J., Renger, A., Pavlova, E., Dietz, R., Zimmermann, W. H., Bergmann, M. W., & Zelarayán, L. C. (2012a). Krueppel-like factor 15 regulates Wnt/ β -catenin transcription and controls cardiac progenitor cell fate in the postnatal heart. *EMBO Molecular Medicine*, 4(9), 992–1007. <https://doi.org/10.1002/emmm.201101043>

Noack, C., Zafiriou, M. P., Schaeffer, H. J., Renger, A., Pavlova, E., Dietz, R.,

- Zimmermann, W. H., Bergmann, M. W., & Zelaráyan, L. C. (2012b). Krueppel-like factor 15 regulates Wnt/ β -catenin transcription and controls cardiac progenitor cell fate in the postnatal heart. *EMBO Molecular Medicine*, 4(9), 992. <https://doi.org/10.1002/EMMM.201101043>
- Pan, X., Zhang, W., Wang, L., Guo, H., Zheng, M., Wu, H., Weng, Q., He, Q., Ding, L., & Yang, B. (2023). KLF12 transcriptionally regulates PD-L1 expression in non-small cell lung cancer. *Molecular Oncology*, 17(12), 2659. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13512>
- Pasipoularides, A. (2016). *Linking Genes to Cardiovascular Diseases: Gene Action and Gene–Environment Interactions*. 8(9), 506–527. <https://doi.org/10.1007/s12265-015-9658-9>
- Patel, S. K., Ramchand, J., Crocitti, V., & Burrell, L. M. (2018). Kruppel-Like Factor 15 Is Critical for the Development of Left Ventricular Hypertrophy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS19051303>
- Patel, S. K., Wai, B., Lang, C. C., Levin, D., Palmer, C. N. A., Parry, H. M., Velkoska, E., Harrap, S. B., Srivastava, P. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.036>
- Pawlina, W., & Ross, M. H. (2020). *Ross Histologia Texto y Atlas* (W. Pawlina & M. H. Ross (Eds.); 8va ed.). Wolters Kluwer.
- Pereira, M. A., Kartashov, A. I., Ebbeling, C. B., Horn, L. Van, Slattery, M. L., Jr, D. R. J., & Ludwig, D. S. (2005). *Fast-food habits , weight gain , and insulin resistance (the CARDIA study) : 15-year prospective analysis*. 365, 36–42.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.09.001>

- Prosdocimo, D. A., Anand, P., Liao, X., Zhu, H., Shelkay, S., Artero-Calderon, P., Zhang, L., Kirsh, J., Moore, D., Rosca, M. G., Vazquez, E., Kerner, J., Akat, K. M., Williams, Z., Zhao, J., Fujioka, H., Tuschl, T., Bai, X., Schulze, P. C., ... Haldar, S. M. (2014). Kruppel-like Factor 15 Is a Critical Regulator of Cardiac Lipid Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 5914.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M113.531384>
- Prosdocimo, D. A., John, J. E., Zhang, L., Efraim, E. S., Zhang, R., Liao, X., & Jain, M. K. (2015). KLF15 and PPAR α Cooperate to Regulate Cardiomyocyte Lipid Gene Expression and Oxidation. *PPAR Research*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/201625>
- Raff, H., & Levitzky, M. (2013). Fisiología médica: Un enfoque por aparatos y sistemas. In McGraw-Hill (Ed.), *Fisiología Medica. Un enfoque por aparatos y sistemas* (1a ed., Vol. 53). McGraw-Hill Companies.
- Ramírez-vélez, R. (2012). *In utero fetal programming and its impact on health in adulthood*. 59(6).
- Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 11(8), 215–225.
<https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
- Rodeheffer, R. J., & Redfield, M. M. (2010). *Contractility and Ventricular Systolic Stiffening in Hypertensive Heart Disease: Insights into the Pathogenesis of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*. 54(5), 410–418.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.013>
- Rodríguez-Rodríguez, P., Ramiro-Cortijo, D., Reyes-Hernández, C. G., López de Pablo, A. L., Carmen González, M., & Arribas, S. M. (2018). Implication of Oxidative Stress in Fetal Programming of Cardiovascular Disease. *Frontiers in Physiology*, 9(MAY), 602.
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00602>
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis: An inflammatory disease. *International Congress and*

- Rueda, A., Alba-aguayo, D. R. De, & Valdivia, H. (2014). *Receptor de rianodina , fuga de calcio y arritmias*. 84(3).
- Samuelsson, A. M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H. J. M., Piersma, A. H., Ozanne, S. E., Twinn, D. F., Remacle, C., Rowlerson, A., Poston, L., & Taylor, P. D. (2008). Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: A novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, 51(2), 383–392. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477>
- Sano, M., Kamitsuji, S., Kamatani, N., Hong, K. W., Han, B. G., Kim, Y., Kim, J. W. oo., Aizawa, Y., & Fukuda, K. (2014). Genome-wide association study of electrocardiographic parameters identifies a new association for PR interval and confirms previously reported associations. *Human Molecular Genetics*, 23(24), 6668–6676. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDU375>
- Santoyo-suarez, M. G., Garcia-loredo, J. A., Mares-montemayor, J. D., Garza-ocañas, L., Benitez-chao, D. F., Soto-dominguez, A., Estrada-rodriguez, A. E., Camacho-morales, A., Zapata-Morin, P. A., Garza-treviño, E. N., Delgado-Gallegos, J. L., Padilla-rivas, G. R., & Islas, J. F. (2023). *Krüppel-like factors hypertrophy modulation following Isoproterenol-Induced Myocardial damage*. <https://doi.org/10.20944/preprints202308.2187>
- Santoyo-suarez, M. G., Mares-montemayor, J. D., Padilla-rivas, G. R., Delgado-gallegos, J. L., Quiroz-reyes, A. G., Roacho-perez, J. A., Benitez-chao, D. F., Garza-ocañas, L., Arevalo-martinez, G., Garza-treviño, E. N., & Islas, J. F. (2023). *The Involvement of Krüppel-like Factors in Cardiovascular Diseases*. 1–19.
- Schwinger, R. H. G., Böhm, M., Schmidt, U., Karczewski, P., Bavendiek, U., Flesch, M., Krause, E. G., & Erdmann, E. (1995). Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca²⁺ uptake and Ca(2+)-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients

with nonfailing hearts. *Circulation*, 92(11), 3220–3228.

<https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.11.3220>

Shankman, L. S., Gomez, D., Cherepanova, O. A., Salmon, M., Alencar, G. F., Haskins, R. M., Swiatlowska, P., Newman, A. A. C., Greene, E. S., Straub, A. C., Isakson, B., Randolph, G. J., & Owens, G. K. (2015). KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature Medicine*, May. <https://doi.org/10.1038/nm.3866>

Solaro, R. J. (2011). Regulation of Cardiac Contractility. *Regulation of Cardiac Contractility*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54078/>

Stephenson, R. B. (2020). The Heart As a Pump. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*, 216–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55227-1.00021-1>

Sun, Y., Qu, J., Wang, J., Zhao, R., Wang, C., Chen, L., & Hou, X. (2021). Clinical and Functional Characteristics of a Novel KLF11 Cys354Phe Variant Involved in Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Journal of Diabetes Research*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/7136869>

Swamynathan, S. K. (2010). Krüppel-like factors: Three fingers in control. *Human Genomics*, 4(4), 263–270. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-4-263/TABLES/2>

Szentandrassy, N., Magyar, Z., Hevesi, J., Bányász, T., Nánási, P. P., & Almássy, J. (2022). Therapeutic Approaches of Ryanodine Receptor-Associated Heart Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS23084435>

TNF tumor necrosis factor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. (n.d.). Retrieved June 28, 2024, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>

Trujillo-villarreal, L. A., Romero-díaz, V. J., Marino-martínez, I. A., Fuentes-mera, L., Ponce-camacho, M. A., Devenyi, G. A., Chakravarty, M. M., Camacho-morales, A., & Garza-villarreal, E. E. (2021). Maternal cafeteria diet exposure primes depression-like behavior in the offspring evoking lower brain volume related to changes in synaptic

- terminals and gliosis. *Translational Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01157-x>
- Voigt, J. U., & Abraham, T. P. (2021). Ischemic heart disease. In *ASE's Comprehensive Strain Imaging*. National Academies Press (US). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-75947-2.00017-9>
- Waddell, H. M. M., Mereacre, V., Alvarado, F. J., & Munro, M. L. (2023). Clustering properties of the cardiac ryanodine receptor in health and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 185, 38–49. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2023.10.012>
- Wang, B., Haldar, S. M., Lu, Y., Ibrahim, O. A., Fisch, S., Gray, S., Leask, A., & Jain, M. K. (2008). The Kruppel-like factor KLF15 inhibits connective tissue growth factor (CTGF) expression in cardiac fibroblasts. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 45(2), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.05.005>
- Wang, C., Qiao, S., Zhao, Y., Tian, H., Yan, W., Hou, X., Wang, R., Zhang, B., Yang, C., Zhu, F., Jiao, Y., Jin, J., Chen, Y., & Tian, W. (2023). The KLF7/PFKL/ACADL axis modulates cardiac metabolic remodelling during cardiac hypertrophy in male mice. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-023-36712-9>
- Wang Miao. (2020). Coronary Artery Disease: Therapeutics and Drug Discovery. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1177). <http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-2517-9%0Ahttp://www.springer.com/series/5584>
- Wang, Y., Wu, J., Chen, H., Yang, Y., Xiao, C., Yi, X., Shi, C., Zhong, K., He, H., Li, Y., Wu, Z., Zhou, G., Rao, Q., Wang, X., Zhou, X., Lomberg, G., Liu, B., Zhao, J., Ge, J., ... Qu, L. (2021). Genome-wide CRISPR-Cas9 screen identified KLF11 as a druggable suppressor for sarcoma cancer stem cells. *Science Advances*, 7(5), 3445–3472. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABE3445>
- Weil, B. R., & Neelamegham, S. (2019). Selectins and immune cells in acute myocardial infarction and post-infarction ventricular remodeling: Pathophysiology and novel

- treatments. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 434816.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00300/BIBTEX>
- Wolf, D., & Ley, K. (2019). Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 124(2), 315–327. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>
- Wolfram, R. M., Brewer, H. B., Xue, Z., Satler, L. F., Pichard, A. D., Kent, K. M., & Waksman, R. (2006). Impact of Low High-Density Lipoproteins on In-Hospital Events and One-Year Clinical Outcomes in Patients With Non-ST-Elevation Myocardial Infarction Acute Coronary Syndrome Treated With Drug-Eluting Stent Implantation. *American Journal of Cardiology*, 98(6), 711–717.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.04.006>
- World Health Organization. (2021). *Cardiovascular diseases (CVDs)*.
[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- World Health Organization. (2022). World health statistics 2022 (Monitoring health of the SDGs). In *Monitoring health of the SDGs*. <http://apps.who.int/bookorders>.
- Xie, L., Zhang, Q., Mao, J., Zhang, J., & Li, L. (2021). The Roles of lncRNA in Myocardial Infarction: Molecular Mechanisms, Diagnosis Biomarkers, and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.680713>
- Yin, K. J., Fan, Y., Hamblin, M., Zhang, J., Zhu, T., Li, S., Hawse, J. R., Subramaniam, M., Song, C. Z., Urrutia, R., Lin, J. D., & Chen, Y. E. (2013). KLF11 mediates PPAR γ cerebrovascular protection in ischaemic stroke. *Brain*, 136(4), 1274.
<https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWT002>
- Zeng, N., Jian, Z., Zhu, W., Xu, J., Fan, Y., & Xiao, F. (2023). KLF13 overexpression protects sepsis-induced myocardial injury and LPS-induced inflammation and apoptosis. *International Journal of Experimental Pathology*, 104(1), 23.
<https://doi.org/10.1111/IEP.12459>
- Zhang, H., Chen, X., Gao, E., Macdonnell, S. M., Wang, W., Nakayama, H., Zhang, X.,

- Jaleel, N., Harris, D. M., Li, Y., Tang, M., Berretta, R., Leri, A., Kajstura, J., Sabri, A., Walter, J., Molkentin, J. D., & Houser, S. R. (2011). *Increasing Cardiac Contractility After Myocardial Infarction Exacerbates Cardiac Injury and Pump Dysfunction*. 107(6), 800–809. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.219220>.Increasing
- Zhang, X., Tang, X., Ma, F., Fan, Y., Sun, P., Zhu, T., Zhang, J., Hamblin, M. H., Chen, Y. E., & Yin, K. J. (2020). Endothelium-targeted overexpression of Krüppel-like factor 11 protects the blood-brain barrier function after ischemic brain injury. *Brain Pathology*, 30(4), 746. <https://doi.org/10.1111/BPA.12831>
- Zhang, Yamin, Fan, X., & Yang, H. (2020). Long noncoding RNA FTX ameliorates hydrogen peroxide-induced cardiomyocyte injury by regulating the miR-150/KLF13 axis. *Open Life Sciences*, 15(1), 1000. <https://doi.org/10.1515/BIOL-2020-0100>
- Zhang, Yi, Wang, Y., Liu, Y., Wang, N., Qi, Y., & Du, J. (2013). Krüppel-Like Factor 4 Transcriptionally Regulates TGF- β 1 and Contributes to Cardiac Myofibroblast Differentiation. *PLOS ONE*, 8(4), e63424. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0063424>
- Zhao, Guangyin, Liang, J., Shan, G., Gu, J., Xu, F., Lu, C., Ma, T., Bi, G., Zhan, C., & Ge, D. (2023). KLF11 regulates lung adenocarcinoma ferroptosis and chemosensitivity by suppressing GPX4. *Communications Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/S42003-023-04959-Z>
- Zhao, Guizhen, Chang, Z., Zhao, Y., Guo, Y., Lu, H., Liang, W., Rom, O., Wang, H., Sun, J., Zhu, T., Fan, Y., Chang, L., Yang, B., Garcia-Barrio, M. T., Eugene Chen, Y., & Zhang, J. (2021). KLF11 protects against abdominal aortic aneurysm through inhibition of endothelial cell dysfunction. *JCI Insight*, 6(5). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.141673>
- Zhao, L., Wu, D., Sang, M., Xu, Y., Liu, Z., & Wu, Q. (2017). Stachydrine ameliorates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by suppressing inflammation and oxidative stress through inhibiting NF- κ B and JAK/STAT signaling pathways in rats. *International Immunopharmacology*, 48, 102–109.

<https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2017.05.002>

Zheng, Y., Zhang, H., Xiao, C., Deng, Z., Fan, T., Zheng, B., Li, C., & He, J. (2023). Original research: KLF12 overcomes anti-PD-1 resistance by reducing galectin-1 in cancer cells. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 11(8).
<https://doi.org/10.1136/JITC-2023-007286>

Zhou, C., Sun, P., Hamblin, M. H., & Yin, K. J. (2022). Genetic deletion of Krüppel-like factor 11 aggravates traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1).
<https://doi.org/10.1186/S12974-022-02638-0>

Zimetbaum, P. J., & Marine, J. E. (2024). *Conduction abnormalities after myocardial infarction*. <https://doi.org/https://www.uptodate.com/contents/conduction-abnormalities-after-myocardial-infarction>

13. - 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 sobrenadante 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 sobrenadante 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 sobrenadante con una micropipeta.
13. Dejar secar la pastilla de ARN durante 5-10 minutos.
14. Resuspender la pastilla en 20-50 uL de H₂O libre de RNasas 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 Desparafinado y rehidratación de láminas con tejido cardiaco

1. Colocar las laminillas en una estufa a 60°C por 20min.
2. Sumergir las laminillas con tejido en xilol durante 5 minutos.
3. Cambiar las laminillas a una solución 1:1 de xilol-etanol por 5 minutos.
4. Sumergir las laminillas en etanol absoluto por 2 minutos.
5. Colocar las laminillas en etanol al 96% por 2 minutos.
6. Cambiar las laminillas a una solución de etanol al 70% por 2 minutos.
7. Enjuagar suavemente las laminillas en agua destilada.

13.3 Tinción de Hematoxilina y Eosina

1. Seguir los pasos de rehidratación del **Apéndice 2**.
2. Sumergir las laminillas en hematoxilina por 2 minutos.
3. Enjuagar suavemente los tejidos en agua de la llave.
4. Realizar una inmersión rápida de las laminillas en alcohol ácido.
5. Enjuagar suavemente los tejidos en agua de la llave.
6. Sumergir rápidamente las laminillas en agua amoniacal dos veces.
7. Enjuagar suavemente los tejidos en agua de la llave.
8. Lavar los cortes en agua destilada por inmersión.
9. Sumergir rápidamente las laminillas en eosina 6 veces.
10. Enjuagar brevemente con alcohol al 96%.
11. En otro baño de alcohol al 96% reposar las laminillas 1 minuto.
12. Sumergir las laminillas en alcohol absoluto por 2 minutos.
13. Colocar las laminillas en solución 1:1 de xilol-alcohol por 3 minutos.
14. Sumergir las laminillas en xilol por 5 minutos.
15. Colocar una gota de resina sintética o Entellan en la laminilla y colocar un cubreobjetos, posteriormente dejar reposar hasta secar.

13.4 Tinción de Tricrómico de Masson

1. Sumergir las laminillas en solución de Bouin por 60min a 56°C o toda la noche a temperatura ambiente.
2. Lavar las laminillas con agua de la llave hasta barrer el color de la solución de Bouin.
3. Enjuagar suavemente con agua destilada.
4. Sumergir las laminillas en Hematoxilina férrica de Weigert durante 10 minutos.
5. Lavar con agua de la llave durante 5min.
6. Enjuagar suavemente con agua destilada.
7. Teñir los cortes con solución de Fucsina-Escarlata por 5seg.
8. Lavar con agua destilada hasta que las laminillas dejen de desprender color.
9. Colocar las laminillas en solución de ácidos fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 min.
10. Enjuagar suavemente con agua destilada.
11. Sumergir las laminillas en solución de azul de anilina durante 15seg.
12. Lavar con agua destilada hasta que las laminillas dejen de desprender color.
13. Colocar las laminillas en solución de ácido acético acuoso por 1min.
14. Deshidratar las laminillas en alcohol al 96% por 5seg.
16. Sumergir las laminillas en alcohol absoluto por 2 minutos.
17. Colocar las laminillas en solución 1:1 de xilol-alcohol por 3 minutos.
18. Sumergir las laminillas en xilol por 5 minutos.
19. Colocar una gota de resina sintética o Entellan en la laminilla y colocar un cubreobjetos, posteriormente dejar reposar hasta secar.

13.5 Síntesis de DNAc

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.

13.6 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	AmpliAq	95°C	20 segundos	1
	Fast DNA polimerasa			
Desnaturalización		95°C	3 segundos	40
Alineamiento/Extensión		60°C	30 segundos	