



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EXPRESION DE KRÜPPEL-LIKE FACTOR 14 (KLF14) EN LINEAS  
CELULARES DE LINFOMA NO HODGKIN Y SU POSIBLE PAPEL EN LA  
FISIOPATOLOGIA DEL LINFOMA”**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**RAQUEL ACEVEDO RAMIREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. MARIO I. VEGA PAREDES**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO 2018**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

**VOCAL: JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ**

**SECRETARIO: MARIO I. VEGA PAREDES**

**1er. SUPLENTE: GIBRAN PÉREZ MONTESINOS**

**2º SUPLENTE: GUSTAVO OLVERA GARCÍA**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE SEÑALIZACIÓN MOLECULAR EN CÁNCER DE LA UIMEO. CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI. HOSPITAL DE ONCOLOGÍA DEL IMSS. Y EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ SSA.**

---

**MARIO I. VEGA PAREDES**  
**ASESOR**

---

**RAQUEL ACEVEDO RAMÍREZ**  
**SUSTENTANTE**

# Índice

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>1</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>4</b>
1.1 Definición de cáncer.....	4
1.1.1 Epidemiología .....	4
1.2 Linfoma .....	6
1.3 Linfoma No Hodgkin.....	7
1.3.1 Etiología de LNH.....	9
1.3.2 Tratamiento .....	13
1.3.3 Fisiopatología del LNH .....	17
1.3.4 Patrones de expresión de LNH.....	19
1.4 Biomarcadores en cáncer.....	22
1.5 Familia de los Factores de Transcripción tipo Krüpel (Krüpel like Factors (KLFs)....	24
1.5.1 Estructura general de los KLF's .....	25
1.5.2 Papel de los KLF's en la biología del tumor .....	28
1.5.3 KLF14 .....	30
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 Objetivo general .....	34
3.2 Objetivos particulares.....	34
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
5.1 Líneas celulares .....	35
5.2 Electroforesis .....	36
5.3 Western Blot.....	36
5.4 Citometría de flujo .....	37
5.5 Inmunocitoquímica .....	38
5.6 Microarreglo de biopsias de pacientes con LNH.....	39
5.7 Inmunohistoquímica .....	39
5.8 Análisis estadístico.....	41
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
6.1 Análisis de la expresión de KLF14 en líneas celulares de LNH .....	42

6.2 Análisis de expresión de KLF14 en tejido de ratón .....	47
6.3 Análisis de la expresión de KLF14 en microarreglo de tejidos de biopsias de pacientes con linfoma.....	49
<b>7. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>8. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>59</b>

## Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**Apo A1:** Apolipoproteína A1

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ATCC:** The American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipos de Cultivo)

**CD:** Clúster de diferenciación

**CG:** Centros germinales

**CHOP:** Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y prednisona

**CtBP:** Proteína de unión C-terminal

**DLBCL:** Linfoma difuso de células grandes

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EMT:** Transición epitelial-mesenquimal

**FAK:** Cinasa de adhesión focal

**GC:** Guanina-citosina

**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IMF:** Intensidad media de fluorescencia

**INEGI:** Instituto Nacional de Estadística y Geografía

**IPI:** Índice de pronóstico internacional

**KLF:** Factor tipo Krüppel

**KO:** Knockout

**KRAS:** Gen involucrado en crecimiento celular y apoptosis

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**LNH:** Linfoma No Hodgkin

**MALT:** Linfoma asociado a tejido de mucosas

**mRNA:** RNA mensajero

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PBS:** Buffer de fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PS:** Estadio de evolución

**siRNA:** ARN pequeño de interferencia

**TBS:** Buffer de trisaminometano salino

**TGF $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**TMA:** Tecnología de microarreglo de tejidos

**TSDR:** Región demetilación Treg específica

**UV:** Ultravioleta

**VEB:** Virus de Epstein-Barr

**VHC:** Virus de hepatitis C

**VHSK:** Virus del herpes asociado a sarcoma de Kaposi

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia adquirida

**WB:** Western blot

**WHO:** Organización mundial de Salud por sus siglas en inglés World Health Organization

## Resumen

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo; el cáncer puede invadir el tejido circundante y provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Esta enfermedad ocupa el segundo lugar entre las causantes de muerte a nivel mundial; en 2012 se le atribuyeron 8.2 millones de muertes.

Los linfomas son un tipo de cáncer que se desarrollan en el sistema linfático. De manera específica; los linfomas No-Hodgkin (LNH) constituyen un grupo heterogéneo de células indiferenciadas con distintos comportamientos y respuesta al tratamiento. Los diferentes subtipos de LNH están relacionados con la expansión clonal maligna de linfocitos en diferentes estadios.

La identificación de diferentes proteínas y factores de transcripción que participan en el control del desarrollo de progenitores linfoides, han sido de gran interés por su posible asociación con diversos procesos malignos de linfocitos B; incluyendo leucemia linfocítica crónica, linfomas y mieloma, así como por sus posibles implicaciones en la respuesta al tratamiento y en el pronóstico para el paciente.

Dentro de los factores de transcripción involucrados destacan los factores tipo Krüppel (KLF) ya que regulan diversos procesos biológicos en las células incluyendo proliferación, diferenciación, crecimiento, desarrollo, sobrevivencia y respuesta al estrés externo. En mamíferos se han identificado diecisiete KLFs que regulan diversos sistemas fisiológicos; por lo tanto, están involucrados en desordenes como obesidad, enfermedades cardiovasculares y cáncer.

Se ha reportado que los KLFs juegan un papel importante en el cáncer, tal es el caso de KLF4; sin embargo, se sabe muy poco de KLF14, sin embargo, estudios recientes lo han involucrado con la tumorigénesis, pero no se conoce con exactitud su posible papel en cáncer y de manera específica en la patogenia del linfoma. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de KLF14 en diversas líneas celulares de LNH y determinar su posible papel en la malignidad del linfoma evaluado su expresión en un microarreglo de tejidos de pacientes con LNH y su correlación con el subtipo de linfoma.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Definición de cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer como un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células, el cual puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo.<sup>1</sup> El crecimiento descontrolado de células anormales es invasivo y su propagación a través de los tejidos perturba el funcionamiento normal del organismo. El cáncer es una enfermedad multifactorial por lo que puede afectar tanto a niños como a adultos y no hace distinción de raza, nivel socioeconómico o sexo. Actualmente es considerado un problema mundial de salud pública debido a su alta incidencia y a que sus consecuencias impactan no solo al paciente, sino también a la familia y a la comunidad por la demanda de atención médica especializada.<sup>2</sup>

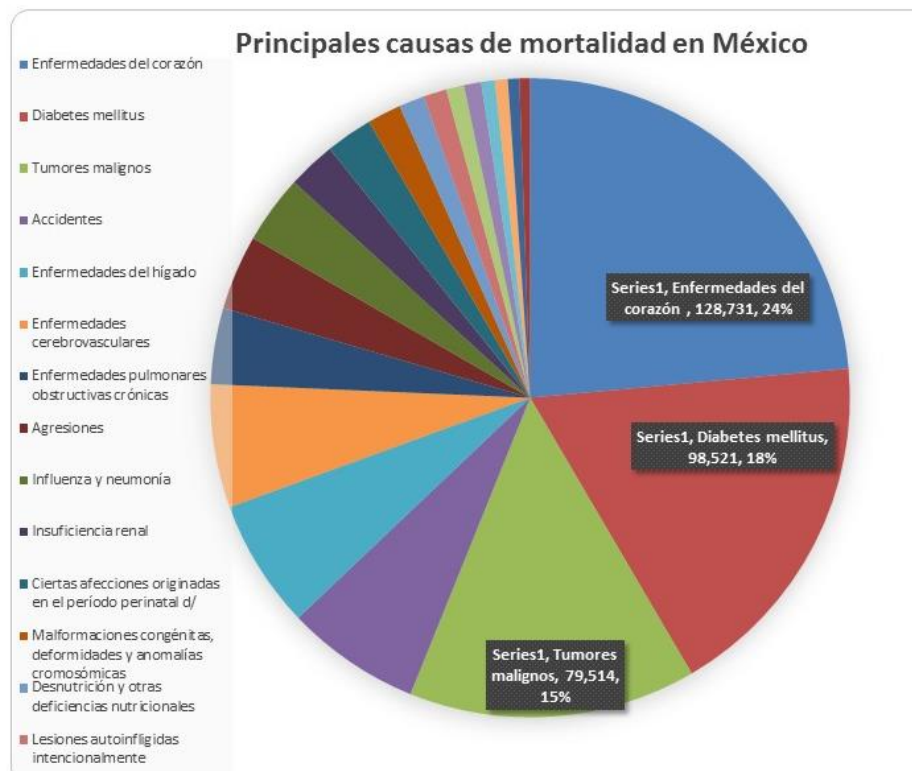
Para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica se requieren mutaciones en varios genes, lo anterior ocurre a través de muchos años de exposición a un agente carcinogénico, factores hereditarios o bien, a la acumulación de errores producidos en cada duplicación celular. Los genes pueden ser alterados si se produce cambio en su secuencia a nivel de ADN. El estilo de vida actual, nos expone a situaciones y agentes capaces de desencadenar la carcinogénesis, de ahí el aumento en el número de casos. Los carcinógenos pueden ser de tipo físico, químico y viral. Los primeros son principalmente fuentes radiantes, los químicos son moléculas que atacan principalmente al nitrógeno de la guanina con lo que provocan mutaciones irreversibles; y los virales actúan introduciendo su genoma en el de la célula afectada, lo cual puede llevar a la activación de oncogenes y el silenciamiento de genes supresores de tumor.<sup>3</sup>

### 1.1.1 Epidemiología

Como ya se mencionó, el cáncer se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad, ya que, a pesar de los avances en investigación y tratamiento, anualmente fallecen millones de personas en el

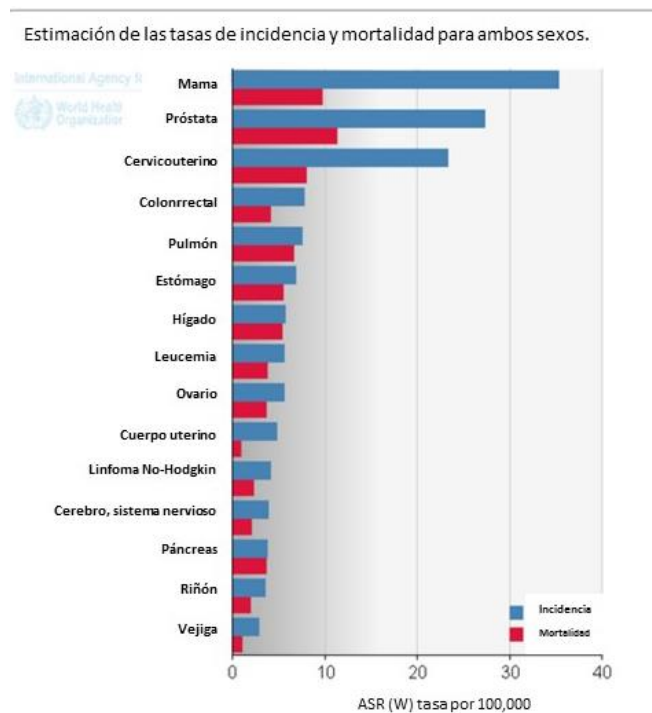
mundo por esta causa. Según la OMS en 2012 murieron 8.2 millones de personas por algún tipo de cáncer, destacando que aproximadamente 70% de dichas muertes se presentan en países de ingresos bajos y medios donde se dificulta su tratamiento y detección.<sup>1</sup> En México el cáncer se ubica en el tercer lugar como causa de mortalidad como se observa en la **Figura 1** .<sup>4</sup>

**Figura 1.** Principales causas de muerte en México, gráfico realizado con datos del INEGI del año 2015.<sup>2</sup>



La incidencia de tumores malignos tiene como primer exponente al cáncer en los pulmones con 13%, seguido del cáncer de mama con 11.9% y en tercer puesto el de colon con 9.7%, dejando en el lugar siete al LNH con 2.7%. En cuanto a mortalidad, el cáncer que ocupa el primer lugar es el cáncer pulmonar, seguido de hígado y en tercer lugar estómago; mientras que el LNH ocupa en el décimo puesto. A nivel nacional el LNH se encuentra en el onceavo lugar tanto en incidencia como en mortalidad; como se muestra en la **Figura 2**.<sup>5</sup> Del año 2008 al 2012, el Instituto Nacional de Cancerología reportó 6,892 nuevos casos de LNH,

ocupando el séptimo lugar de los casos totales y el segundo en mortalidad hospitalaria tomando en cuenta los registros de dicha organización.<sup>6</sup>



**Figura 2.** Tasa de incidencia de mortalidad e incidencia de varios tipos de cáncer. Modificada de información emitida por la OMS en 2012.<sup>5</sup>

## 1.2 Linfoma

Los linfomas son neoplasias malignas de los componentes celulares del sistema inmune; con mayor precisión las neoplasias derivadas de los linfocitos y de sus precursores. Cuando otro tipo de cáncer se propaga a tejido linfático no se considera un linfoma.<sup>7</sup>

Existen dos tipos de linfoma, los LNH y los Hodgkin (LH); los cuales se comportan, propagan y responden al tratamiento de manera distinta.

La diferencia entre el LH y el LNH está en las características de las células malignas. Esa distinción sólo es posible después de la biopsia y evaluación

microscópica de las células cancerígenas. En general, podemos decir que las células malignas del LH sufren muchas alteraciones, tornándose muy diferentes a las células normales de los tejidos linfoides, mientras que las células del LNH sufren transformación maligna, pero preservan algunas características iniciales.<sup>8</sup> Por lo general, los médicos diferencian ambas enfermedades al observar las células al microscopio, en algunos casos es necesario realizar análisis de laboratorio muy específicos para hacer la diferenciación entre ellas pruebas de expresión génica y/o inmunohistoquímica.<sup>7</sup>

### **1.3 Linfoma No Hodgkin**

El LNH se caracteriza por la proliferación neoplásica de las células linfoides en estadios específicos de ontogenia y presentan, al igual que las leucemias, alteraciones cromosómicas características que sirven como apoyo al diagnóstico. Algunos de estos linfomas son de desarrollo lento, mientras que otros se diseminan rápidamente. Los ganglios linfáticos almacenan linfocitos, el cual es el tipo de célula que más comúnmente se encuentra en el tejido linfático. Los linfomas de células B son mucho más frecuentes que los linfomas de células T. Estos dos tipos son responsables, respectivamente, del 90% y 10% de los casos de LNH. Esta información sobre los tipos de linfocitos es útil porque cada tipo de linfoma tiende a parecerse a un subtipo particular de linfocito normal en un cierto nivel de desarrollo. El primer paso para considerar las opciones de tratamiento es determinar el tipo de linfoma que presenta el paciente.<sup>9</sup>

La clasificación de LNH es confusa debido a que existen muchos tipos y a que se han usado varios sistemas. El sistema de clasificación más reciente y más utilizada es el de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés). El sistema de la WHO agrupa a los linfomas según la apariencia de éstos bajo un microscopio, las características cromosómicas de las células del linfoma, y la presencia de ciertas proteínas en la superficie de las células. Entre los linfomas de células B, se encuentran:

- Linfoma difuso de células B grandes. Las células B son bastante grandes, lo cual se aprecia al ser observadas en un microscopio. Por lo general, el tumor comienza como una masa que crece rápidamente en un ganglio linfático, también puede aparecer en otras áreas como en los intestinos, en los huesos, o incluso en el cerebro o en la médula ósea. Una de sus características es que se trata de un linfoma de rápido crecimiento.

-Linfoma folicular. Las células tienden a crecer en un patrón circular en los ganglios linfáticos. Surge en muchas áreas linfáticas del cuerpo, así como en la médula ósea. Son de crecimiento lento y responden bien al tratamiento, pero es uno de los más difíciles de curar.

-Linfoma de células del manto. Las células son de tamaño pequeño o mediano. Cuando este linfoma se diagnostica, generalmente se ha propagado ampliamente a los ganglios linfáticos, la médula ósea y a menudo al bazo. No es un linfoma de crecimiento muy rápido.

-Linfoma de Burkitt. Las células son de tamaño mediano, de muy rápido crecimiento. En su forma endémica, usualmente comienza como tumores de la mandíbula o de otros huesos faciales. Este tipo está asociado con la infección por el virus de Epstein-Barr. En la forma no endémica el linfoma comienza generalmente en el abdomen, donde forma una masa tumoral grande. También puede crecer en los ovarios, los testículos u otros órganos, y se puede propagar al cerebro y al líquido cefalorraquídeo.

En tanto dentro de los linfomas de células T, incluyen:

-Linfoma/leucemia linfoblástica de células T precursoras. Las células cancerosas son células T inmaduras de tamaño pequeño a mediano. A menudo se origina en el timo. Este linfoma se puede convertir en un tumor de gran tamaño en el mediastino. Puede ejercer presión en la tráquea causando dificultades respiratorias. También puede ejercer presión en la vena cava superior o incluso bloquearla, lo que puede causar inflamación de los brazos y el rostro. Además, son de crecimiento rápido.

-Linfoma periférico de células T. Estos tipos de linfomas se originan de formas más maduras de células T. <sup>10</sup>

### **1.3.1 Etiología de LNH**

#### 1.3.1.1 Modulación inmune

Los estados de inmunosupresión congénitos y adquiridos son el factor más importante que aumenta el riesgo de padecer LNH. Estas condiciones incluyen la ataxia-telangiectasia, el síndrome de Wiskott-Aldrich, hipogammaglobulinemia variable común, síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X y la inmunodeficiencia combinada severa.<sup>11</sup> Por ejemplo, el estado de inmunodeficiencia adquirida debido a la infección por VIH se asocia a un aumento del riesgo entre 75 y 100 veces en comparación con la población en general.<sup>12</sup>

En pacientes que son tratados con medicamentos inmunosupresores después de trasplante de órgano sólido o trasplante de células madre hematopoyéticas, aumenta sustancialmente el riesgo (30-50 veces) para desarrollar LNH, especialmente durante el primer año después del trasplante. Se observa proliferación de células B policlonales o monoclonales en pacientes con trasplante, pero por lo general eso se regula cuando se detiene la terapia inmunosupresora. Sin embargo, la proliferación puede persistir y evolucionar en un LNH agresivo. Los pacientes que reciben quimioterapia y / o radiación también están en mayor riesgo de desarrollar posteriormente LNH. <sup>13</sup>

#### 1.3.1.2 Virus

Varios virus han sido ligados con la patogénesis del LNH, incluyendo el virus de Epstein-Barr (VEB), virus del herpes asociado a sarcoma de Kaposi (VHSK) y el virus de hepatitis C (VHC).

- Virus de Epstein-Barr

La infección con este virus es altamente prevalente en la población adulta, si se trata de un individuo sano existe un equilibrio entre la infección latente y el sistema

inmune del huésped. Por el contrario, en pacientes inmunocomprometidos los mecanismos de control se deterioran y pueden conducir a la proliferación de células B y finalmente llevar al desarrollo de LNH.<sup>14</sup>

En los humanos existe una extensa evidencia acerca de la relación entre el VEB y el linfoma de Burkitt, sobre todo en zonas de África donde el virus es endémico. Se han identificado anticuerpos Anti-VEB en el suero de los pacientes y se han encontrado secuencias del ADN del VEB en el genoma de las células del Linfoma de Burkitt. Este virus también se relaciona con LH, linfoma en pacientes inmunocomprometidos y esporádicamente en linfomas de células T. El VEB es ubicuo en todo el mundo y su infección es muy frecuente y suele pasar desapercibida en la infancia. Su expresión clínica más conocida es la mononucleosis infecciosa y se produce en la adolescencia en aquellos sujetos que no han entrado en contacto con el virus en edades más tempranas.<sup>8</sup>

- Virus del herpes asociado a sarcoma de Kaposi (VHSK); también conocido como herpesvirus 8.

Las secuencias de ADN del VHSK se detectan con frecuencia en los linfomas de efusión primaria, en pacientes con sarcoma de Kaposi, y en aquellos con linfoma de la enfermedad de Castleman multicéntrica plasmablástica. Estos herpesvirus relacionados con subtipos de LNH se asocian casi exclusivamente con la infección por VIH en entornos de inmunosupresión profunda.<sup>13</sup>

- Virus de hepatitis C (VHC)

Varios estudios han relacionado el VHC al LNH, pero los resultados no son del todo coherentes. Una asociación positiva entre el VHC y el LNH de células B se encontró en algunos estudios, pero no en otros. Un estudio realizado en el sur de Italia mostró una mayor incidencia de la infección por VHC en LNH de alto grado que en los LNH de bajo grado, mientras que otros estudios informan de una mayor incidencia de LNH de bajo grado.

La variabilidad geográfica de la seroprevalencia de VHC puede ser la razón de las inconsistencias; las asociaciones positivas tienden a ser reportadas en áreas geográficas con alta seroprevalencia de VHC como Italia y Japón, mientras que no

se observó asociación principalmente en los estudios del norte de Europa, el norte de EE.UU., o Canadá donde la seroprevalencia de VHC es baja.<sup>13</sup>

#### 1.3.1.3 Infecciones bacterianas

La infección gástrica crónica por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) se ha relacionado con el desarrollo de linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT). Se han realizado estudios donde existe asociación positiva entre las úlceras peptídicas y el riesgo de linfoma de la zona marginal extraganglionar. La erradicación de *H. pylori* tiene como resultado la reincidencia del linfoma MALT. La infección por *B. burgdorferi*, el agente causante de la enfermedad de Lyme, se ha detectado en 35% de los pacientes con linfoma de zona marginal; si se da tratamiento antibiótico al paciente y se erradica el microorganismo se observa remisión casi completa del linfoma de zona marginal de células B. Las conclusiones sobre los agentes infecciosos son consistentes con la idea de que la estimulación antigénica crónica participa en la patogénesis del LNH.<sup>13</sup>

#### 1.3.1.4 Estilo de vida

##### - Fumar

Un análisis de 50 estudios informó que haber fumado alguna vez se asoció con un mayor riesgo de LNH principalmente de células T. Algunos estudios, sin embargo, han relacionado el tabaquismo con un mayor riesgo de linfoma folicular y LNH de alto grado.<sup>13</sup>

##### - Obesidad

La obesidad se asocia a un proceso de inflamación crónica y modulación inmune específica incluyendo cambios en los niveles de citocinas que pueden predisponer al desarrollo de LNH.<sup>13</sup>

##### - Dieta

El papel de la dieta y el riesgo de LNH han sido ampliamente estudiados reportando que existen asociaciones positivas con la ingesta de carne, especialmente la carne roja. El consumo de pescado se ha asociado con un menor riesgo de LNH, aunque también se reportaron resultados nulos. Existen múltiples vías por las que el consumo de carne podría afectar el riesgo de LNH,



incluyendo la modulación de la respuesta inmune a través de la carne y sus componentes (por ejemplo, grasas y proteínas). Un incremento del riesgo para padecer LNH se ha asociado con una mayor ingesta de grasas en la dieta, incluyendo grasas totales, grasas animales, grasas saturadas y ácidos grasos trans,<sup>13</sup>

- Radiación ultravioleta (UV)

La exposición a la luz solar y otras fuentes de radiación UV tiene posibles efectos inmunosupresores, por lo que se sugiere como factor de riesgo para padecer LNH. Se ha encontrado que existe una asociación entre la exposición al sol y el LNH; se sugiere que es debido al efecto que podría tener la exposición al sol en el sistema inmune o en la producción de vitamina D.<sup>8</sup>

#### 1.3.1.5 Exposición ocupacional

Algunas ocupaciones se han asociado con un mayor riesgo para el desarrollo de la LNH, incluidos los agricultores, aplicadores de plaguicidas, trabajadores del caucho, personas que trabajan en refinerías de petróleo, gente que trabaja en tintorerías, bomberos y químicos.

Los estudios epidemiológicos sugieren que el incremento del riesgo de LNH entre los agricultores se relaciona con el uso de herbicidas de ácido fenoxiacético, insecticidas organofosforados y fertilizantes. Los pesticidas también se han asociado específicamente con LNH folicular y LNH de linfocítico pequeño.<sup>6</sup>

Los solventes se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar LNH, especialmente en estudios ocupacionales de los trabajadores del caucho, los trabajadores de mantenimiento de aeronaves, y tintorerías.<sup>13</sup>

#### 1.3.1.6 Genética

Existen numerosos estudios que reportan que las variantes genéticas juegan un papel importante en promover la supervivencia de las células B y el crecimiento de las mismas, aumentando así el riesgo para padecer LNH.<sup>13</sup>

Las células B se diferencian de las células troncales hematopoyéticas dentro de la médula ósea y su maduración se produce en varias etapas que implican la recombinación genética y la mutación para generar anticuerpos de alta afinidad.

Durante este proceso, son comunes las translocaciones y mutaciones cromosómicas que implican los genes de la cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas que pueden desregular varios oncogenes. Pueden producirse translocaciones y mutaciones adicionales tras la expansión clonal dependiente de antígenos en los ganglios linfáticos que implican hipermutación somática y cambio de clase. Estas translocaciones y mutaciones somáticas pueden alterar la homeostasis de las células B y conducir a la proliferación, la diferenciación descontrolada y la inmortalización de las células B. Los factores genéticos que inhiben la reparación del ADN pueden aumentar la probabilidad de estas lesiones pre-neoplásicas.<sup>13</sup>

Las lesiones genómicas en células B que no son inicialmente letales podrían ser moduladas posteriormente por agentes ambientales, epigenética (hipo o hipermetilación cromosómica), enfermedad y factores genéticos que promueven la supervivencia y proliferación de las células B y pueden conducir al desarrollo y progresión del linfoma.<sup>15</sup>

### **1.3.2 Tratamiento**

Los tratamientos utilizados en el LNH son: quimioterapia, radioterapia, trasplante de médula ósea e inmunoterapia. Actualmente la quimioterapia y la inmunoterapia se emplean de forma combinada, siendo la primera línea de tratamiento para algunos tipos de LNH.

#### **1.3.2.1 Quimioterapia**

La quimioterapia es el uso de medicamentos contra el cáncer que usualmente se inyecta en una vena o se suministran vía oral. Estos medicamentos entran al torrente sanguíneo y llegan a casi todas las áreas del cuerpo, por lo que este tratamiento es muy útil para el linfoma. Dependiendo del tipo y la etapa del linfoma, la quimioterapia puede ser utilizada sola o combinada con radioterapia. Generalmente la quimioterapia se administra en ciclos; un período de tratamiento, seguido de un período de descanso para permitir que el cuerpo se recupere.

El número de medicamentos, sus dosis y la duración del tratamiento dependen del tipo y la etapa del linfoma.<sup>10</sup>

A menudo los fármacos de diferentes grupos se utilizan en combinación; una de las combinaciones más comunes de los medicamentos es el denominado CHOP (Ciclofosfamida, Hidroxi-daunorrubicina o doxorubicina, Oncovin o Vincristina y Prednisona).<sup>16</sup> La ciclofosfamida tiene un efecto alquilante, la doxorubicina es inhibidor de formación del uso cromático, la vincristina bloquea la polimerización de tubulina y la prednisona inhibe la síntesis de proteínas. En conjunto CHOP inducen la muerte de células con un potencial elevado de proliferación; sin embargo, este tratamiento es inespecífico y suele traer muchas reacciones adversas, además de que los pacientes pueden volverse refractarios al tratamiento. La severidad de estos efectos depende del tipo y cantidad de fármaco administrado, así como el tiempo de tratamiento.<sup>17</sup>

La quimioterapia también puede combinarse con inmunoterapia, especialmente el anticuerpo monoclonal humanizado denominado rituximab cuyo antígeno blanco es CD20.<sup>10</sup>

#### 1.3.2.2 Radioterapia

La radioterapia utiliza rayos de alta energía para destruir las células cancerosas. Cuando se utiliza la radiación para tratar el LNH, se realiza con mayor frecuencia con un haz de radiación cuidadosamente enfocado, el procedimiento en sí es indoloro.

La radiación también se puede administrar como una droga en algunos casos; puede ser utilizado como el principal tratamiento para algunos tipos de linfoma si se encuentran temprano (estadio I o II), ya que estos tumores responden muy bien a la radiación. Para linfomas más avanzados y para algunos linfomas que son más agresivos, la radiación se usa en combinación con quimioterapia.<sup>10</sup>

### 1.3.2.3 Trasplante de médula ósea

Los trasplantes de células troncales, incluyendo sangre periférica movilizada, médula ósea y trasplantes de células del cordón umbilical se usan en el tratamiento contra el cáncer. Este tipo de trasplantes se usan con mayor frecuencia para tratar tipos de cáncer que afectan la sangre o el sistema inmunológico; como leucemia, linfoma o mieloma múltiple. Las células troncales son células inmaduras que pueden diferenciarse en todos los tipos de células.<sup>10</sup>

Las células trasplantadas reemplazan las células troncales que son destruidas con la quimioterapia y la radiación por lo que se puede aumentar la dosis del tratamiento y con ello aumentar su eficiencia y disminuir el daño. Existen 3 tipos de trasplante: autólogo (donde las células provienen del paciente), alogénico (las células vienen de un donante) y singénico (las células provienen de un gemelo idéntico).<sup>10</sup>

### 1.3.2.4 Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tratamiento que utiliza componentes del sistema inmune para combatir el cáncer; en general puede actuar de dos maneras, estimulando el sistema inmunológico para que funcione de una mejor manera o dando componentes de dicho sistema. Este tipo de tratamiento sólo funciona en tipos específicos de cáncer.<sup>10</sup>

Los tipos de inmunoterapia que se utilizan actualmente son:

Anticuerpos monoclonales: Son anticuerpos dirigidos específicamente a un antígeno que se encuentra en las células malignas por lo que el sistema inmune sería capaz de reconocer una célula tumoral y así activar vías para la eliminación de las mismas. Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido a la proteína CD20; actúa mediante la participación de los receptores Fc en las células efectoras inmunitarias, como las NK y los macrófagos, e induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y también activa la citotoxicidad dependiente

del complemento. Aunque los resultados terapéuticos han mejorado en la era post-rituximab, hay evidencia de pacientes que exhiben resistencia al rituximab. Actualmente, el tratamiento de primera línea para DLBCL es la combinación de rituximab y quimioterapia CHOP, con tasas esperadas de supervivencia global a 5 y 10 años de 58 y 43,5%, respectivamente. Existen estudios en los que se utiliza una proteína de fusión para sensibilizar las células resistentes al tratamiento.<sup>18</sup>

Inmuno inhibidores de puntos de control: Los puntos de control proteínas en ciertas células del sistema inmune que necesitan ser activadas (o inactivadas) para comenzar una respuesta inmune hacia una célula tumoral. Un ejemplo de este tipo de tratamiento son los fármacos dirigidos a PD-1 o PD-L1 ya que dicha proteína es un ligando de control en los linfocitos T. Cuando PD-1 se une a PD-L1, básicamente induce inhibición de la activación del linfocito T. Algunas células tumorales expresan grandes cantidades de PD-L1, lo que les ayuda a evadir el ataque inmunológico. Los anticuerpos monoclonales que se dirigen a PD-1 o PD-L1 pueden aumentar la respuesta inmune contra las células tumorales y han mostrado una gran promesa en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Ejemplos de fármacos que se dirigen a PD-1 incluyen Pembrolizumab (Keytruda) y Nivolumab (Opdivo).<sup>18</sup>

Vacunas: Estas vacunas intentan conseguir que el sistema inmunológico monte un ataque contra las células tumorales. En lugar de prevenir la enfermedad, están destinados a hacer que el sistema inmunológico ataque una enfermedad que ya existe.

Algunas vacunas de tratamiento contra el cáncer están formadas por células tumorales, partes de células o antígenos puros. A veces las propias células inmunitarias de un paciente son removidas y procesadas para crear la vacuna. Una vez que la vacuna está lista, se inyecta en el cuerpo para aumentar la respuesta inmune contra las células cancerosas. Un ejemplo de vacuna contra el cáncer es Sipuleucel-T (Provenge) que se utiliza contra el cáncer de próstata.<sup>10</sup>

### **1.3.3 Fisiopatología del LNH**

Los linfocitos provienen de las células troncales hematopoyéticas y mediante la expresión de receptores de superficie celular y la adopción de una morfología determinada experimentan diferenciación a un fenotipo específico: linfocitos B o linfocitos T. Las células tumorales de linfoma proceden de las células del linaje linfoide que detienen su diferenciación en una etapa específica. La mutación de estas células se da a través de múltiples etapas que implican la acumulación progresiva de lesiones genéticas que consecuentemente dan lugar a la expansión clonal de células B o T malignas, éstas pueden ser células maduras, intermedias o incluso indiferenciadas. Las translocaciones cromosómicas, recombinaciones recíprocas equilibradas, por lo general son el sello genético de las neoplasias linfoides; su presencia se ha confirmado en hasta el 90% de los casos de LNH.<sup>12</sup>

Muchas de las aberraciones son errores que se producen durante los reordenamientos del gen del receptor de antígeno que afectan a los genes de inmunoglobulina de las células B y los genes del receptor de células T.<sup>19</sup> A un nivel molecular, estos desplazamientos con o sin eliminaciones y mutaciones cromosómicas adicionales pueden precipitar la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumor.<sup>12</sup>

Los virus oncogénicos son otra vía potencial de lesiones genéticas en el LNH; estos virus son capaces de alterar el genoma de la célula linfoide por la introducción de genes exógenos que interfieren con el crecimiento normal de las células, así como en su regulación.<sup>19 20</sup>

La incidencia del LNH ha ido aumentando, sobre todo en ancianos y en personas infectadas por el VIH. Aunque se desconocen las causas del LNH, ciertos indicios sugieren una vinculación con un virus aún no identificado, sin embargo, la enfermedad no parece ser contagiosa. Un tipo de LNH de desarrollo rápido tiene relación con la infección por Virus de Linfocitos T Humanos Tipo 1 (HTLV-1 por sus siglas en inglés), el cual es un retrovirus con función similar a la del VIH, responsable en parte del incremento de nuevos casos. Los hallazgos sobre los virus (Ej. HTLV-1 y EBV), la estrategia para “escapar” de la vigilancia del sistema

inmune, la identificación de oncogenes, de genes supresores, las modificaciones de los mecanismos de regulación del ciclo celular (reproducción, apoptosis, síntesis de citocinas), son los acontecimientos científicos importantes de los últimos años que ayudan a conocer y a comprender mejor los mecanismos de la “linfomagénesis”.<sup>20</sup>

El avance de la biología básica, los análisis anatomopatológicos basados en nuevas tecnologías, como anticuerpos monoclonales, técnicas de inmunohistoquímica, hibridización *in situ* y de amplificación genética, permiten reconocer factores etiológicos, mecanismos fisiopatológicos y designar entidades clínico biológicas a partir de clasificaciones morfológicas descriptivas y anatomoclínicas. Para evidenciar anomalías genéticas específicas se puede hacer uso de técnicas como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); esta herramienta no sólo es útil en el diagnóstico, sino también en la determinación de la enfermedad residual subclínica o de recaída de enfermedad (p.ej PCR para el gen de Bcl2). Los LNH han sido ampliamente estudiados citogenéticamente, de estos el 35% de los pacientes presentan linfoma tipo Burkitt, con translocaciones características t(8;14), t(2;8) y t(8;22); todas ellas afectan la regulación del oncogén c-Myc debido a que se fusiona con secuencias promotoras de la transcripción provenientes de los genes de cadenas de inmunoglobulinas situados en los cromosomas 2, 14 y 22, las cuales permiten que el oncogén se exprese de manera constitutiva.<sup>21</sup>

Oncogenes bien estudiados, involucrados en la patogénesis de los linfomas, incluyen c-myc (regula transcripción de genes), Bcl-1 (su producto, la ciclina D, regula la mitosis), Bcl-2 (regula la apoptosis), Bcl-3 (inhibe la transcripción del factor nuclear -κB) y Bcl-6 (regula la proliferación celular y la diferenciación).<sup>22</sup>

El 85% de los LNH tienen anormalidades citogenéticas, por lo tanto, los defectos cromosomales clonales son obligatorios en la linfomagénesis. Como ejemplos de estas translocaciones, en los linfocitos B la t(9;14)(p13;q32) se observa en los linfomas linfoplasmocitoides, la t(11;14)(q13;q32) en los linfomas del manto, la t(2;18)(p11;q11) en los linfomas difusos de células grandes y la t(2;5)(p23;q35) de los linfomas CD30+ y anaplásicos de células grandes.<sup>22</sup> También se describen

proto-oncogenes y genes supresores involucrados en la patogenia de los LNH, entre ellos, Bcl-2, relacionado con linfomas foliculares y difuso de células grandes, Bcl-1 con el linfoma del Manto<sup>23</sup>, c-Myc en el Linfoma de Burkitt<sup>24</sup>, PAX-5 en el linfoblástico y LYT-10 en los linfomas de células T cutáneos (en estos tres últimos como factores de transcripción).<sup>23 25</sup>

En el LH endémico (de África ecuatorial, Sudamérica y sureste Asiático) relacionado a EBV, aislado desde 1966 en un cultivo del linfoma, se identificó, la translocación del cromosoma 8 relacionado con el gen c-myc, en el 97% de los casos mientras que en el esporádico, que ocurre en el resto del mundo, sólo se identifica entre el 20-30% de los casos.<sup>26</sup> Mutaciones del gen supresor tumoral p53 representa la alteración genética más frecuente en los tipos de cáncer humanos. Se observa sólo en determinados LNH, como en los linfomas foliculares avanzados y de Burkitt. La depleción cromosómica más frecuente es la 6(6q) en su brazo largo, traducándose en la pérdida de los genes supresores tumorales. Esta anomalía está asociada con un mal pronóstico en un LNH. En los linfomas B de células pequeñas y la leucemia linfática crónica la depleción del cromosoma 13q14, se observa en el 50% de los casos.<sup>27</sup>

#### **1.3.4 Patrones de expresión de LNH**

El análisis inmunofenotípico es muy importante para la subclasificación de linfomas, en la nueva clasificación de la OMS de malignidades hematológicas.<sup>28</sup> En la década pasada, algunos anticuerpos nuevos han sido utilizados de manera rutinaria en muestras de tejido linfoide parafinadas.<sup>23</sup> Actualmente es posible hacer una subclasificación correcta de linfomas de células B, en la mayoría de los casos haciendo uso de marcadores relativamente específicos. Sin embargo, en algunos casos es difícil diferenciar mediante estos marcadores células benignas de malignas en proliferación. En estos casos, es de mayor utilidad el análisis clonal basado en la presencia de re-arreglos de inmunoglobulinas (Ig); es importante mencionar que existen excepciones en los patrones de expresión, puesto que los resultados por inmunohistoquímica requieren de una correlación con los datos clínicos y morfológicos.<sup>26</sup>



En 1993, se empezó a utilizar el Índice Pronóstico internacional (IPI),<sup>29</sup> el cual está basado en las características clínicas como edad, estadio, nivel de lactato de deshidrogenasa (LDH), estadio de evolución (PS) y número de sitios extra nodales. El IPI ha mostrado ser un importante instrumento de pronosis para linfomas agresivos.<sup>30</sup> Sin embargo, el IPI no es un instrumento óptimo para la selección de pacientes de alto riesgo para la terapia intensificada. Pacientes definidos como IPI de alto riesgo incluyen pacientes ancianos o pacientes con una bajo PS quienes son incapaces de tolerar un tratamiento agresivo. El pronóstico de los tumores se determina por la combinación de factores del huésped y relacionados al tumor. Factores clínicos tales como el estadio y LDH, reflejan de manera fundamental la biología del tumor. Por lo que es probable que el determinar factores biológicos del tumor se pueda proveer de información adicional que ayudara en la precisión del valor del IPI.<sup>31</sup>

El DLBCL es el más común de los subtipos de LNH, representando entre el 60-70% de los linfomas agresivos, es mucho más heterogéneo en términos de comportamiento clínico y características histomorfológicas, comparado con otros grupos de linfomas, tales como el linfoma de células del manto, linfoma linfocítico pequeño y linfoma de Burkitt.<sup>29 32</sup> El DLBCL se presenta sobre un gran rango de edades con manifestaciones en sitios nodales o extranodales.<sup>33</sup> Aproximadamente el 40% de pacientes adultos con DLBCL responden bien a la terapia y tienen una sobrevivida prolongada, el resto muere por la enfermedad. Histomorfológicamente, el DLBCL consiste de diversas variantes morfológicas incluyendo anaplasias, centroblastia, inmunoblastia y subtipos celulares ricos en histiocitos de células T.<sup>34</sup> Sin embargo, no existen diferencias significativas en el pronóstico que puedan ser correlacionadas con alguna de estas variantes histomorfológicas en sistemas más recientes de clasificación de linfomas.<sup>33</sup>

Últimamente se ha intentado identificar otros factores biológicos en combinación con el valor del IPI. De acuerdo a clasificaciones recientes de la WHO, estas son algunas variantes morfológicas del DLBCL: a) centroblástico; b) inmunoblástico; c) histiocitos ricos en linfocitos T; d) anaplásticos; e) plasmablásticos; f) tipo

granulomatosis linfomatoide y g) una variante que expresa el patrón de un linfoma de células gigantes anaplásico.<sup>34</sup> Pero actualmente la importancia de la subclasificación morfológica en el pronóstico de la enfermedad aún se discute. En la práctica clínica, es de gran interés evaluar y establecer un panel de marcadores por inmunohistoquímica para ser usados en tejidos embebidos en parafina para clasificar y predecir el pronóstico de estos linfomas. Recientemente se establecieron marcadores para la técnica de inmunohistoquímica para distinguir entre los DLBCL de origen de linfocitos B de centros germinales (CG) (CD10, Bcl-6, CD40 y CD23) de los de origen de linfocitos B activados (MUM/IRF4 y CD138); de lo anterior se concluyó que el patrón de expresión de linfocitos B de CG correlaciona con mejor pronóstico que de los que expresan un patrón de linfocitos B activados.<sup>34</sup>

Por otro lado, Cavallin-Stahl y sus colaboradores analizaron por inmunohistoquímica la expresión de Bcl-2, TP53, glicoproteínas fosforiladas y Ki-67. En este estudio no encontraron asociación entre la respuesta al tratamiento y la expresión de glicoproteína fosforilada. Sin embargo la expresión de Bcl-2 fue asociada con baja respuesta al tratamiento<sup>35</sup>, mientras que para los marcadores Ki-67 y TP53 aún son necesarios más estudios.

También existen varios trabajos en la literatura en donde se ha tratado de encontrar marcadores específicos que ayuden en la determinación de la prognosis de estos linfomas, así por ejemplo: Kumer y su equipo de investigadores, establecieron que la expresión del inhibidor de la granzima B P19 está asociado con un alto grado de malignidad de los DLBCL (43%).<sup>36</sup> También en otro estudio se logró establecer que la expresión de la vía de señalización de las caspasas puede predecir la respuesta clínica a la quimioterapia en linfomas DLBCL<sup>37</sup>, en este estudio se estableció que la inhibición de la vía de la caspas 9 está fuertemente asociado con la baja respuesta a la quimioterapia conllevando a la muerte, sin embargo dado al bajo número de muestras, es necesario realizar estos estudios con un número mayor de pacientes.

Konomen en 1998 implementó la nueva tecnología de microarreglos de tejidos (TMA). En ese mismo año se implementó el empleo de esta técnica para diversos tejidos normales o neoplásicos. En el año 2002 Hedvat y colaboradores., fueron los primeros en validar la técnica de TMA en la caracterización de un gran número de casos de LNH y linfomas Hodgkin con una correlación del 86 al 100% para varios marcadores comparados con los resultados obtenidos de inmunohistoquímicas tradicionales.<sup>38</sup> Por lo que haciendo una revisión de la literatura con respecto de la utilidad de TMA (por sus siglas en inglés tissue microarray) en la caracterización de los linfomas se puede decir que las características moleculares de DLBCL pueden identificar categorías de la enfermedad con determinados pronósticos que pueden servir como herramienta para la estratificación terapéutica.<sup>39</sup>

#### **1.4 Biomarcadores en cáncer.**

En los últimos años, el conocimiento sobre los biomarcadores del cáncer ha aumentado enormemente, proporcionando grandes oportunidades para mejorar el tratamiento del paciente. El avance en las técnicas de detección ha permitido el estudio de muchos posibles marcadores biológicos, por lo que hay gran diversidad entre ellos, que pueden incluir una amplia gama de entidades bioquímicas, tales como ácidos nucleicos (ADN, ARN, microARN), proteínas, azúcares, lípidos y pequeños metabolitos. El estudio y conocimiento de biomarcadores es muy importante no sólo para el diagnóstico de la enfermedad, sino que también ayuda en la elección de múltiples alternativas terapéuticas disponibles en la actualidad que se adecuen mejor al paciente.<sup>40</sup>

En LNH de células B los biomarcadores han permitido un cambio significativo en el diagnóstico, lo anterior por el surgimiento de marcadores inmunofenotípicos, subtipos por esquemas de clasificación molecular y el descubrimiento de nuevos biomarcadores. También ha surgido interés por individualizar el tratamiento debido a la heterogeneidad biológica que representa la neoplasia. La utilización de la secuenciación genómica de los linfomas de células B ha dado grandes cantidades de información valiosa; los datos abarcan descubrimientos esenciales para la

comprensión de la patogénesis, la evolución clonal o tumoral y la identificación de los biomarcadores que pueden ser útiles para las consideraciones de pronóstico o terapéuticas.<sup>13</sup>

Convencionalmente el linfoma de células B se diagnostica incorporando morfología, inmunofenotipo y hallazgos genéticos para poder ser clasificada de manera específica. A pesar de esto el comportamiento clínico dentro de cada subtipo de linfoma de células B es variable, lo que significa que existe una heterogeneidad biológica que se reconoce cada vez más con la aplicación de la caracterización molecular. Con la tecnología de secuenciación se han identificado mutaciones recurrentes que afectan vías celulares importantes, lo anterior ha permitido comprender algunos de los mecanismos oncogénicos de muchas neoplasias. Un beneficio adicional de los biomarcadores es que podrían servir para predecir el curso de la enfermedad, con el fin de informar las decisiones de tratamiento individualizado. En la Tabla 1 se presentan las características fenotípicas por subtipo de linfoma.<sup>41</sup>

	Inmunofenotipo esperado
Linfoma folicular	CD19+, CD20+, IgM+, IgD slg+ monotípica, CD10+, bcl 6+, bcl 2+/-, HGAI, LMO2, asociado con
Linfoma linfoplasmático	CD19+, CD20+, slg+ monotípica, IgM, CD22+, CD97a+, CD5+/-, las células del plasma tienen Ig monotípica citoplasmática.
Linfoma de células del manto	CD19+, CD20+, slg+ monotípica, IgM+/- IgD, CD5+, CD23- o raramente +, Ciclina D1+, SOX11+/-, LEF1-
Linfoma difuso de células B grandes	CD19+, CD20+, slg+ monotípica o slg ausente, BCL2+/-, MYC+ en algunos casos típicos de DLBCL.
Tipo B de centro germinal	Hans: (CD10+) o (CD10-/bcl6+/MUM1-) Choi: (GCET+/MUM1-) o (GCET-/CD10+) o (GCET-/CD10-/BCL6+/FOXP1-) Total: El sistema de puntuación favorece CD10, GCET Y LMO2>30%
Tipo B de centro no germinal	Hans: (CD10-/BCL6-) o (cd10-/BCL6+/MUM1+) Choi: (GCET+/MUM1+) o (GCET-/CD10-/BCL6+/FOXP1+) o (GCET-/CD10-/BCL6-) Total: El sistema de puntuación favorece MUM1, FOXP1 Y LMO2<30%
Linfoma primario mediastinal de células B grandes (Timico)	CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, MAL+, cREL+, CD2000, MUM1, CD23, BCL2 +/-, BCL6 +/-, CD30+/-, superficie Ig débil a ausente.
Linfoma de Burkitt	CD19+, CD20+, CD10+, BCL6+, BCL2-, slg monotípica+, MUM1-, MYC+, Ki67>95%. Casos asociados con VEB.

**Tabla 1.** Inmunofenotipo esperado en LNH (Modificado) <sup>41</sup>

## 1.5 Familia de los Factores de Transcripción tipo Krüppel (Krüppel like Factors (KLFs))

Los Factores de transcripción tipo Krüppel (KLF por sus siglas del inglés Krüppel-like factors) son factores de transcripción que regulan diversos procesos biológicos en las células incluyendo proliferación, diferenciación, crecimiento, desarrollo, sobrevivencia, muerte programada y respuesta al estrés externo. Debido al papel de los KLFs en células normales y tejidos, supresión de tumores y en funciones oncogénicas, el número de publicaciones que identifican las funciones de estos

factores de transcripción han aumentado considerablemente en los últimos años. Así, el estudio de las funciones de KLFs en cánceres humanos es un campo emergente.<sup>42</sup>

Hasta este momento, la familia de los KLF's está compuesta por 17 miembros identificados (KLF1-17) con diversas funciones reguladoras en la diferenciación, la supervivencia, la proliferación y el desarrollo.<sup>43</sup> Algunos miembros de la familia Krüppel se expresan de manera ubicua (KLF6, 10 Y 11), mientras que otros sólo en tejidos específicos (KLF2 en pulmón, KLF4 Y 5 en tracto gastrointestinal) lo que explica la gran diversidad de funciones que desempeñan. Por ejemplo, la supresión de KLF2, 5 y 6 es letal en ratones, mientras que la supresión de otros KLFs no lo es; lo cual sugiere que en estos últimos casos existe una compensación funcional por otros factores.<sup>42</sup>

### 1.5.1 Estructura general de los KLF's

Estructuralmente, todos los miembros de la familia KLF tienen un dominio de unión al ADN de triple dedo de zinc en el extremo carboxilo terminal, que permite la unión a sitios ricos en GC en regiones promotoras de los genes que regulan. Otras regiones de los KLFs pueden ser muy divergentes; en el extremo amino se encuentra normalmente un dominio de activación o represión, y un sitio de "splicing" alternativo en algunos KLFs, lo que puede conducir a alteraciones adicionales en la estructura de proteínas.

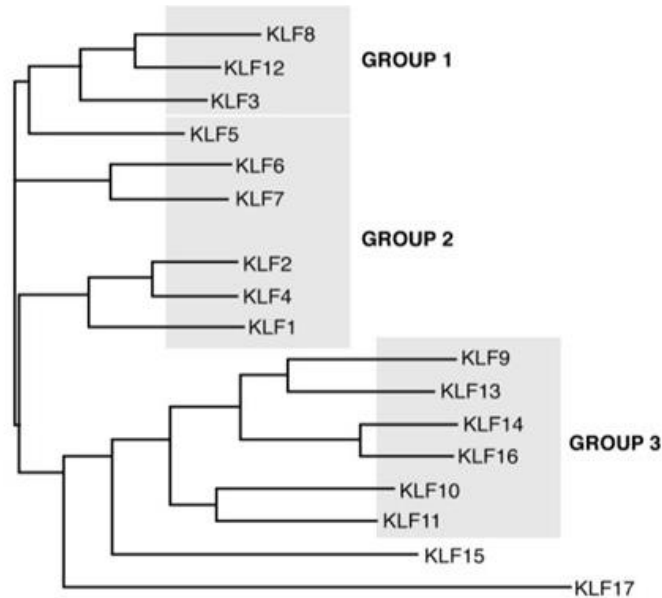
En base a las características funcionales las proteínas KLF pueden dividirse en tres grupos distintos (**Figura 3**):

Grupo 1: Comprende KLF3, 8, y 12. Sirven como represores de la transcripción a través de su interacción con la proteína de unión C-terminal (CtBP).

Grupo 2: Conformado por KLF1, 2, 4, 5, 6, y 7. La función predominantemente de este grupo es activador de la transcripción.

Grupo 3: KLF 9, 10, 11, 13, 14, y 16 los cuales tienen actividad represora a través de su interacción con el co-represor transcripcional, Sin3A.

KLFs 15 y 17 están más alejadas basado en el análisis filogenético y no contienen motivos de interacción de proteínas definidas.<sup>44</sup>

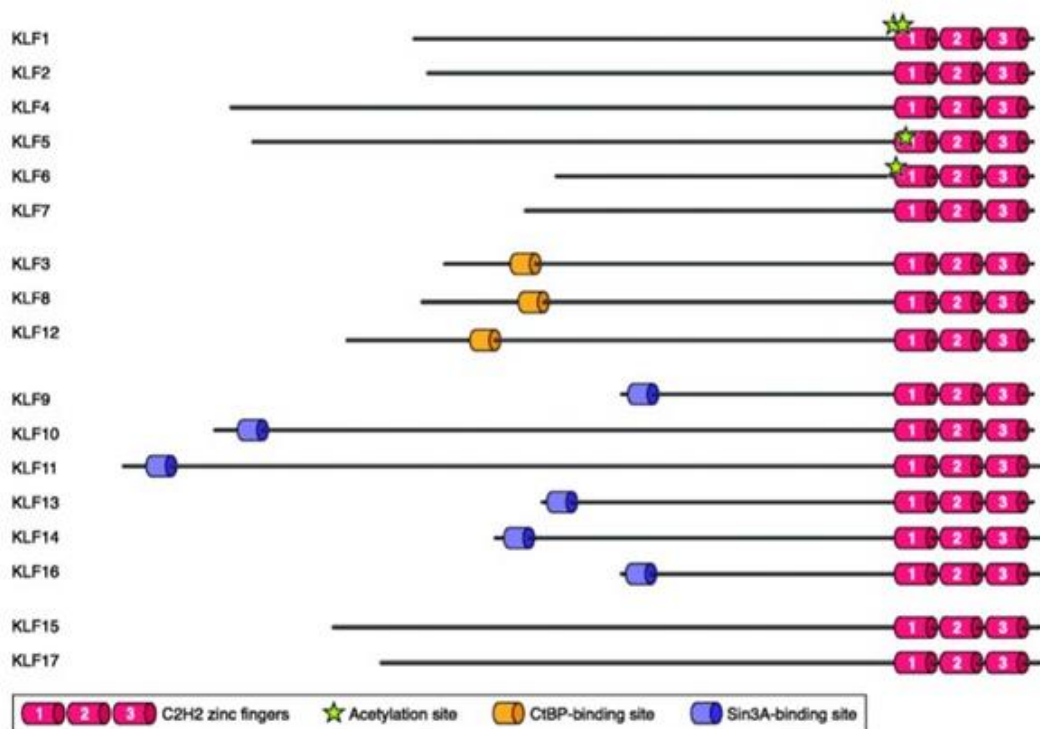


**Figura 3. Árbol filogenético de la familia de KLFs humanos.** Se realizó alineamiento de múltiples secuencias y análisis filogenético. El análisis se realizó en las secuencias completas de las proteínas de los 17 miembros de la familia de KLF's. El análisis estructural corresponde con la división de los KLF's dentro de diferentes grupos que tiene funciones similares (Modificada de McConnell and Yang, 2010)<sup>44</sup>

#### *Dominio de dedo de zinc*

Los dominios de dedo de zinc son motivos comunes en los factores de transcripción, el más frecuente es el tipo C2H2 (presentes en los KLFs), en el que un átomo de zinc está tetraédricamente coordinado con residuos de cisteína e histidina conservados que permiten que el dominio se pliegue en una estructura  $\beta\beta\alpha$ .<sup>45</sup>

La ubicación de los dominios de dedo de zinc dentro de las estructuras de proteínas KLF se muestra en la **Figura 4**. El primer y segundo dedo de zinc contienen 25 aminoácidos y el tercero contiene 23 aminoácidos.



**Figura 4.** Estructura de las proteínas de la familia de los KLFs humanos. Las proteínas KLF's están agrupadas acorde a su estructura común y dominios de funcionales. Los KLF's son altamente homólogos en su región de unión al ADN carboxilo terminal, el cual contiene tres motivos de dedos de zinc C2H2. Los miembros de la familia fueron agrupados basados en: 1) la capacidad de unir acetilasas (KLF's 1, 2, 4, 5, 6 y 7); 2) la presencia de in sitio de unión a CtBP (KLF's 3, 8 y 12); o 3) la presencia de un sitio de unión a Sin3A (KLF's 9, 10, 11, 13, 14 y 16). Los sitios establecidos de acetilación son señalados con asteriscos (Modificada de McConnell and Yang, 2010) <sup>44</sup>

Los sitios de unión de ADN son similares entre las proteínas KLF; incluyen secuencias ricas en GC con una preferencia por 5'CACCC-3'.

#### *Dominios de unión funcionales*

Las regiones amino-terminales de KLFs varían significativamente y permiten la unión de diferentes co-activadores, co-represores, y modificadores, lo que resulta en la diversidad funcional y especificidad. Se han caracterizado dominios de interacción que ayudan a definir la función de cada KLF. La **Figura 4** muestra los dominios de unión a proteínas dentro de las estructuras de las proteínas de los KLFs. <sup>44</sup>



Proteína de unión C-terminal (CtBP): Las CtBPs son proteínas multifuncionales que pueden mediar la represión de genes. Dichas proteínas contienen una hendidura que se une a los motivos Pro-X-Asp-Leu-Ser (PXDLS). Existen motivos PXDLS en numerosos factores de transcripción y en efectores de la represión de genes, tales como ciertas desacetilasas de histonas.<sup>46</sup>

KLF3 se caracterizó inicialmente como un activador transcripcional sin embargo, más tarde se demostró que se trataba de un represor, y se localizó dicha actividad en una secuencia de 74 aminoácidos en el extremo amino-terminal. KLF3, así como KLF 8 y 12, se unen a través de la CtBP a la secuencia PXDLS. Esta interacción media las actividades de represor de KLFs 3 y 8, y la capacidad de KLF12 para reprimir la expresión del gen de la AP-2 $\alpha$ .<sup>44</sup>

Sitio de unión Sin3A: KLFs 10 y 11 también actúan como represores de la transcripción y esta actividad se debe a tres sitios distintos en la región amino-terminal (R1, R2 y R3). Más tarde se demostró que R1 contienen un dominio de interacción con Sin3 (SID), un motivo hidrófobo que forma una estructura  $\alpha$ -helicoidal para apoyar la interacción con las proteínas Sin3. KLFs 9, 10, 11, 13, y 16 comparten una región  $\alpha$ -helicoidal conservada que media su unión a Sin3A y sus actividades como represores de la transcripción.<sup>44</sup>

La secuencia de la proteína de KLF14 contiene un SID putativo, aunque no se ha demostrado la interacción física entre KLF14 y Sin3A.

### **1.5.2 Papel de los KLF's en la biología del tumor**

Como ya se mencionó anteriormente, los KLFs tienen diversas funciones en las células normales. En cuanto a las células malignas su función también es variable, KLF4 se identificó en intestino delgado y colon inicialmente como un gen que detenía el crecimiento ya que suprimía la síntesis de ADN cuando era de manera ectópica. Existen KLFs cuya función es promover la proliferación, tal es el caso de KLF5, en células epiteliales intestinales la expresión de KLF5 coincide con la de Ki67, un marcador de proliferación. *In vivo*, KLF5 media la respuesta

hiperproliferativa del epitelio del colon después de la infección patógena por *Citrobacter rodentium*. El silenciamiento de KLF5 utilizando siRNA induce una actividad antitumoral en células intestinales. Los estudios indican que KLF5 tiene actividad proliferativa o antiproliferativa dependiente del contexto, a veces en el mismo tipo celular. En un sistema *in vitro* de células epiteliales de epidermis, la acción proliferativa de KLF5 se convierte en antiproliferativa en presencia de TGF- $\beta$  (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ ).<sup>44</sup> KLF5 inhibe la expresión de p15 el cual es un inhibidor del ciclo celular en ausencia de TGF- $\beta$ ; pero cuando se añade TGF- $\beta$  a las células, el KLF5 se acetila y co-activa la transcripción de p15.<sup>47</sup>

Otra función dentro del tumor descrita para los KLFs es la supresión del tumor, por ejemplo, KLF6 en cáncer de próstata. En la mayoría de tumores de próstata primarios un alelo de KLF6 se elimina y el restante está mutado. Estudios más recientes han confirmado que la sobreexpresión de KLF6 en células de cáncer de próstata reduce la proliferación e induce la apoptosis.<sup>44</sup>

Los factores de transcripción tipo Krüppel están involucrados en la capacidad invasiva del tumor. Los fenotipos invasivos se adquieren a través de la transición epitelial-mesenquimal (EMT) que está mediada por muchos factores, incluyendo la quinasa de adhesión focal (FAK) la cual, a su vez regula la expresión de KLF8 quien controla el ciclo celular mediante la activación de la expresión de ciclina D1. En las células epiteliales y el cáncer de ovario humano, FAK regula la transcripción de KLF8 mediante la activación de la vía PI3K-AKT. La expresión de KLF8 se incrementa en varios tipos de células y tejidos de cáncer humano y la expresión ectópica de KLF8 induce la transformación. La expresión estable de KLF8 en las células epiteliales de mama humanas normales inmortalizadas induce la EMT, la represión de la transcripción de E-cadherina y aumenta de este modo la motilidad e invasividad de las células cancerosas.<sup>44</sup>

En cáncer en el sistema endócrino de tejidos reproductivos femeninos, por ejemplo, en carcinoma endotelial humano, la expresión estable de KLF9 en la línea HEC-1-A aumenta la síntesis de ADN y la cinética del ciclo celular mediante la inducción de genes implicados en el control del ciclo celular. KLF9 interacciona

físicamente con el receptor de progesterona; juntos co-regular la expresión de los genes blanco de progesterona. KLF9 es un regulador negativo de la señalización de ER (Receptor de Estrógenos) dependiente de ligando en células de carcinoma endometrial. KLF9 podría tener la función de controlar la proliferación de células del endometrio ya que, los niveles de ARNm KLF9 se reducen en tumores de endometrio de grados más altos, en comparación con endometrio normal y tumores de endometrio de bajo grado.<sup>44</sup>

El factor de transcripción tipo Krüppel 12 (KLF12) se identificó inicialmente como un represor del factor de transcripción AP-2 $\alpha$ . KLF12 se encuentra en la región cromosómica 13q21-q22, que alberga un gen de susceptibilidad al cáncer de mama putativo y es el sitio de las supresiones somáticas de diferentes tumores malignos. Los niveles de mRNA de KLF12 se incrementan en 11 de 28 muestras de tumores gástricos de pacientes, en comparación con el epitelio gástrico normal y se correlacionan con el tamaño del tumor. Estos resultados sugieren que KLF12 tiene un papel importante en la progresión del cáncer gástrico.<sup>44</sup>

### **1.5.3 KLF14**

Actualmente los factores de transcripción tipo Krüppel se encuentra bajo una intensa investigación relacionada con procesos fisiológicos y patológicos en el humano. Para varios de los 17 KLF's reportados se han descrito funciones en cáncer, tanto represoras como oncogénicas. Recientemente la atención de varios grupos de investigación se ha situado en KLF14 ya que existen estudios genéticos que demuestran que actúa como un regulador génico en tejido adiposo<sup>48</sup>, lo que llevó a su relación con diabetes tipo 2 e hipercolesterolemia. Las investigaciones realizadas para entender la función de KLF14 en el metabolismo de lípidos llevaron a la conclusión de que KLF14 participa en la señalización lipídica por medio de su acoplamiento a una acetiltransferasa de histonas<sup>49</sup> y otros mecanismos epigenéticos. KLF14 está implicado en la regulación del metabolismo de colesterol HDL y en la capacidad del flujo de colesterol mediante la modulación de la ApoA-I, quien es clave en el eflujo de colesterol y en prevenir el riesgo de enfermedad coronaria.<sup>50</sup>

Se conoce que el factor de transcripción Sp1 es capaz de activar el receptor de TGF $\beta$  (TFG $\beta$ II), dada a la capacidad de los recientemente descritos complejos Sp/KLF en la regulación de diversos genes se logró establecer que KLF14 es una nueva proteína reguladora de la vía no canónica de señalización de TGF $\beta$ , mediante el silenciamiento de TFG $\beta$ II en los sitios Sp/KLF. Lo que sugiere que KLF14 es un regulador negativo del receptor de TGF $\beta$  y promover el mantener la homeostasis y su potencial contribución en estados de enfermedad<sup>51</sup>. Estos mismos complejos Sp/KLF han sido involucrados en la regulación negativa de la transformación neoplásica mediada por KRAS. Donde de manera particular KLF14 en complejo con Sp5 o Sp8 tiene la capacidad de inhibir el crecimiento celular inhibiendo la proliferación celular e induciendo apoptosis.<sup>52</sup> Lo que a nivel molecular involucra a los complejos Sp5/8/KLF14 y su papel en el control de procesos asociados a cáncer, mediante la regulación de la expresión de la ciclina A2.<sup>53</sup>

Recientes estudios en modelos murinos genéticamente modificados han revelado que KLF14 está involucrado en la diferenciación de linfocitos T reguladores. A nivel molecular KLF14 media este fenómeno, en parte, por la regulación transcripcional de FOXP3, mediante la metilación y remodelación de la cromatina del promotor de TSDR (Región demetilación Treg Especifica). A nivel celular, la no activación de KLF14 deja a los linfocitos Treg en un estado anormal de diferenciación marcado por su fenotipo hiper-supresivo tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos hallazgos permiten describir a KLF14 con un importante papel en la diferenciación de células del sistema inmune e inflamación crónica intestinal. Contribuyendo a entender los mecanismos moleculares que regulan la función de los linfocitos Treg, una población que está altamente implicada en el cáncer.<sup>53</sup>

En cuanto al cáncer la información con respecto a KLF14 es limitada. En estudios recientes, la disminución de KLF14 en modelos murinos permite establecer a KLF14 como un nuevo supresor tumoral.<sup>54</sup> La pérdida o silenciamiento de KLF14 provoca inestabilidad en el genoma lo cual se ve reflejado en la inducción de poliploidía en fibroblastos de embrión de ratón. De igual manera se ha demostrado que la reducción de KLF14 también conduce a una amplificación de los

centrosomas; lo cual está asociado con tumorigénesis y con la inestabilidad del genoma, Plk4 ha sido relacionado con la regulación del montaje y duplicación del centriolo; que a su vez controla la duplicación del centrosoma. Como ya se mencionó, KLF14 es un represor de Plk4 por lo que puede causar la disminución de la amplificación del centrosoma y con ello promover la tumorigénesis. Estos resultados sugieren que la reducción de KLF14 puede causar una ilimitada amplificación del centrosoma dirigido por Plk4 y por ende incrementar el riesgo a la formación de tumores, así por ejemplo ratones KO para KLF14, es decir, ratones a los que se le ha inactivado el gen de *KLF14*<sup>55</sup>, desarrollan tumores espontáneos, y la disminución de KLF14 incrementa la formación de tumores inducidos por AOM/DSS en colon *in vivo*. Por otro, lado la sobre-expresión de KLF14 induce una catástrofe mitótica.

La catástrofe mitótica ha sido descrita como un desencadenamiento de la muerte celular por un malfuncionamiento mitótico. En este contexto la sobre-expresión de KLF14 induce arresto mitótico, condensación y fragmentación del ADN y finalmente la muerte celular, lo que conlleva apoptosis, necrosis o senescencia.

La reducción de KLF4 causa inestabilidad genómica y su sobre-expresión induce catástrofe mitótica, por lo que el correcto balance en la expresión de KLF14 o función de este en condiciones normales es esencial en las células para mantener la integridad genómica, sin embargo, bajo condiciones de estrés la célula puede sobre activar KLF14 para evitar la inestabilidad genómica.

Estudios en proceso sobre la regulación de KLF4 pueden proveer nuevas herramientas para la prevención de la inestabilidad genómica. Existen investigaciones que describen que clínicamente la expresión de KLF14 esta disminuida en cáncer, se exploraron los niveles de transcripción de KLF14 en diferentes tipos de malignidades humanas utilizando la base de datos Oncomine® y los resultados revelan que la expresión del RNAm para KLF14 está significativamente reducido en varios tipos de cáncer humano (mama, linfático, cervical, oral, pancreático y colorrectal). Por otro lado, también se ha reportado que la expresión de KLF14 desde el alelo paternal, incrementa el riesgo de

carcinoma en células basales. Se ha descrito que en células con “knockdown” de la expresión de KLF14 se reduce la proliferación celular, así como también el arresto del ciclo celular y apoptosis; lo que propone a KLF14 como un importante gen de supervivencia celular controlando la retención de heterogeneidad en el cromosoma 7 en células de cáncer de tiroides, donde se muestra una expresión alelo específica. Por lo anterior KLF14 es esencial en estas células para la supervivencia tumoral. La transcripción de KLF14 se incrementa en tejidos tumorales comparados con tejidos normales por lo que se sugiere que KLF14 tiene un papel oncogénico en cáncer de tiroides.<sup>54</sup>

Todo lo anterior indica como KLF14 ha sido implicado en la tumorigénesis, pero con un papel no claro, ya que como se mencionó previamente en algunos tipos de cáncer su expresión esta disminuida y en modelos murinos de KLF14 “knockdown” se muestra el desarrollo espontáneo de tumores, pero no en el caso de carcinomas tiroideos. No obstante, un reciente reporte muestra que la disminución inducible de KLF14 induce catástrofe mitótico y apoptosis.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Estudios recientes han demostrado una baja expresión de KLF14 en cáncer, lo cual sugiere que es un supresor tumoral, mientras que otros estudios indican que KLF14 puede tener un papel oncogénico. Sin embargo, no se conoce la participación de KLF14 en malignidades hematológicas, de manera específica para este proyecto en el LNH. Estudios preliminares realizados por nuestro grupo de trabajo demostraron una expresión disminuida de KLF14 en líneas celulares de LNH de mayor malignidad en comparación con las de menor malignidad. Por lo que en este trabajo se evaluó la participación de KLF14 en la malignidad de LNH, con la finalidad de proponer a KLF14 como un posible biomarcador de esta enfermedad.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Evaluar la expresión de KLF14 en diversas líneas celulares de LNH, en tejido proveniente de un modelo xenográfico de LNH y en tejido de pacientes con LNH de diferentes subtipos y correlacionar su expresión con el grado de malignidad.

### **3.2 Objetivos particulares**

- Determinar la expresión de KLF14 en líneas celulares de LNH.
- Correlacionar la expresión de KLF14 con el subtipo de LNH de cada línea celular.
- Determinar la expresión de KLF14 en tejido obtenido de un tumor generado en modelos xenográficos en ratones.
- Determinar la expresión de KLF14 en biopsias de pacientes con diferentes subtipos de LNH.
- Correlacionar la expresión KLF14 con los diferentes subtipos de LNH

## 4. HIPÓTESIS

La expresión de KLF14 en líneas celulares y tejido de LNH se encontrará expresado de manera diferencial en cada subtipos y tendrá una correlación positiva con el grado de malignidad.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Líneas celulares

Se emplearon líneas celulares de LNH con diferentes grados de malignidad y como control una línea celular de Leucemia de células T adquiridas del ATCC (The American Type Culture Collection), cultivadas en medio RPMI Advance (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) con suero fetal bovino 3%.

<b>DHL5</b>	<b>Linfoma difuso de células grandes</b>
<b>DHL4</b>	<b>Linfoma difuso de células grandes</b>
<b>Raji</b>	Linfoma de Burkitt
<b>Ramos</b>	Linfoma de Burkitt
<b>Daudi</b>	Linfoma de Burkitt
<b>Toledo</b>	Linfoma difuso de células grandes
<b>Jurkat</b>	Leucemia de células T



## 5.2 Electroforesis

Se cultivaron las líneas celulares en cajas TPP® de 270 mL hasta observar morfología adecuada descrita por el distribuidor. A continuación, se lisaron las células; para ello se colocaron en tubos de plástico con fondo cónico de 15mL y se centrifugaron a 1500rpm por 5 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga Hermle Z36HK (Hermle, Wehingen Alemania); se desechó el medio y se conservó el botón. Se agregó 1mL de PBS frío al tubo que contenía el botón y se disgregó utilizando la micropipeta; se trasladó el PBS con las células suspendidas a un microtubo de 1.5mL.

El tubo que contiene las células se centrifugó a 10,000rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se eliminó el exceso de líquido lo más posible. Se agregaron entre 20-40 µl de Buffer de lisis Mper de Thermo scientific y entre 2 y 4 µl de inhibidor de proteasas (Complete 25X). Se sometió a agitación cada tubo en vortex por 10 minutos y después se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 minutos.

Posteriormente, las proteínas de los lisados se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro empleando el método de Lowry, después se adicionó regulador de carga, Laemmil buffer de Bio-rad y se hirvieron los lisados por 10 min en un baño maría. Se prepararon geles de acrilamida para el corrimiento electroforético en una cámara mini-blot de Bio-rad, con un regulador de tris-glicina-SDS de la misma marca; en el primer pozo se cargó el marcador de peso molecular para continuar cargando el volumen equivalente a 40µg de proteína para cada línea celular. A continuación, se inició el corrimiento a 90 volts por 15 minutos y posteriormente a 110 volts hasta que el frente de corrida llega al final del gel.

## 5.3 Western Blot

Después de la separación de proteínas mediante electroforesis el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa utilizando Trans-Blot Turbo de Bio-rad a condiciones 25V por 10 minutos. La membrana fue bloqueada utilizando Odyssey blocking buffer de Li-cor por una hora en agitación constante. Posteriormente se

realizó una dilución 1:500 del anticuerpo Anti-KLF14 (ab85476 abcam) y se incubó la membrana durante toda la noche en agitación constante a 4°C.

Después de la incubación se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-Tween 20 0.1% y se incubó con un anticuerpo secundario Anti-rabbit de Li-cor por una hora, se hicieron dos lavados con TBS-Tween 20 0.1% y uno con PBS al 10%. Se reveló utilizando el equipo Odyssey CLx de Li-cor.

## 5.4 Citometría de flujo

La expresión de KLF14 en líneas celulares de LNH también se determinó utilizando citometría de flujo, para lo cual se colocaron 500,000 células de cada línea en una placa de 96 pozos de fondo cónico y se agregaron 200µL de buffer de citometría (PBS1X, SFB3%, EDTA 1µM) a cada línea celular. Se centrifugó la placa a 1500rpm por 5 minutos en una centrifuga Universal 320R Hettich Zentrifugen y se eliminó el sobrenadante empleando vacío. A continuación, se permeabilizaron las células utilizando 200µL de BD Cytotfix/Cytoperm Fixation and permeabilization solution (BD Biosciences) y se incubó 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó la placa a 1500rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante con vacío. Después se realizó un lavado agregando 200µL de una solución 1X de BD Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) y homogeneizando para lograr la suspensión de las células. El siguiente paso fue separar 100µL de cada suspensión de células en pozos previamente marcados a fin de tener células para evaluar la autofluorescencia. Se volvió a centrifugar la placa a 1500rpm 5 minutos y se eliminó nuevamente el sobrenadante. Se colocaron 400µL de Perm/Wash en un microtubo y se agregaron 20µl de anticuerpo Anti-KLF14 (ab170225 abcam) y se homogeneizó. Se agregaron 50µL de esta dilución a cada pozo que no fuera autofluorescencia y se completó con 50µL de Perm/wash para obtener un volumen final de 100µL y agregar ese volumen a los pozos de autofluorescencia; se incubó una hora a 4°C. Transcurrida la hora de incubación se realizó un lavado igual al mencionado anteriormente con Perm/Wash. Se agregó 400µL de perm/Wash en un microtubo y se agregaron

16 $\mu$ L de Anticuerpo secundario Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 680); se homogeneizó y se agregó 50 $\mu$ L a los pozos con anticuerpo primario. Se incubó 30 minutos a 4°C en la oscuridad y posteriormente se realizó otro lavado con Perm/Wash; se agregó a cada pozo 300 $\mu$ L de Perm/Wash y se colocaron en tubos para citometría. El experimento se analizó en un citómetro CytoFLEX de Beckman Coulter.

## 5.5 Inmunocitoquímica

Se empleó la técnica de inmunocitoquímica para evaluar la expresión de KLF14 en las líneas celulares de LNH antes mencionadas, teniendo como control positivo las células Jurkat. Se utilizó Anticuerpo policlonal hecho en ratón anti-KLF14 de Novus Biologicals diluido 1:1500 y como control de isotipo se utilizó IgG normal de ratón de Santa Cruz Biotechnology. Se emplearon laminillas con aproximadamente 10,000 células por spot. Las laminillas se colocaron en una solución reguladora de citrato de sodio 0.01M y se dejaron en baño maría durante 20 minutos para recuperar la estructura antigénica, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X pH7.4 y se eliminó la peroxidasa endógena haciendo dos lavados de 15 minutos con una solución 10% metanol/ peróxido de hidrógeno. Después se lavó dos veces; una con agua destilada 5 minutos y otra con PBS 5 minutos. Se bloquearon los receptores Fc con suero normal de cerdo al 2% durante 1 hora y se agregó el anticuerpo a la concentración mencionada. Las preparaciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda con el anticuerpo primario. Se utilizó el anticuerpo secundario del kit DB detection kit - rabbit / mouse dual, HRP/DAB de DB Biotech. Por último, el color fue generado mediante la adición del sustrato DAB (diamino benzidina) durante 1 minuto 40 segundos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina. Las células fueron deshidratadas bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

## **5.6 Microarreglo de biopsias de pacientes con LNH**

La construcción de un microarreglo de tejidos, permite evaluar una mayor cantidad de muestras en una sola laminilla, disminuyendo el error experimental desde el inicio de la tinción hasta el revelado de la misma, se disminuye el tiempo experimental, así como también una disminución en el gasto de reactivos. Por lo anterior se utilizó un microarreglo con biopsias de pacientes con distintos subtipos de LNH; dentro del microarreglo por paciente existe un spot de tejido normal, tejido adyacente al tumor y del tumor.

El microarreglo de tejidos que se empleó, contiene muestras de 74 pacientes con diferentes tipos de linfoma relacionados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y VIH7. El microarreglo de tejidos fue proporcionado por el AIDS and Cancer Specimen Resource (Fuente de especímenes de cáncer asociados a SIDA) (ACSR) del Instituto Nacional de Cáncer (NCI), el microarreglo de tejido se identificó como TA00-001<sup>56</sup>

## **5.7 Inmunohistoquímica**

Se realizó inmunohistoquímica en un microarreglo de tejido de biopsias de pacientes con LNH y en tejido de tumores primarios, secundarios y terciarios generados en ratón.

- Microarreglo de tejido de biopsias de pacientes

Se comenzó desparafinando el microarreglo de tejido dejándolo a 60°C en un horno por una noche; al otro día se hidrataron los tejidos colocándolo en 2 baños en xileno, un baño en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 5 minutos.

Se realizó la recuperación antigénica sumergiendo las laminillas en citrato de sodio (0.01 M pH 7.4) y calentando a ebullición en baño maría durante 20 minutos.

La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos. La unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido fue bloqueada con suero normal de cerdo al 2%. El microarreglo se incubó con anti-KLF14 (NBP1-92058 Novus Biologicals) a una concentración 1:500 toda la noche. Pasado el tiempo de incubación se lavó el microarreglo y se colocó el anticuerpo secundario del kit DB detection kit - rabbit / mouse dual, HRP/DAB de DB Biotech. Por último, el color fue generado mediante la adición del sustrato DAB (diamino benzidina) durante 4 minutos 30 segundos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina. El tejido fue deshidratado bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente, se cubrió con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

El análisis de la expresión de cada una de las proteínas en el microarreglo se evaluó mediante patología digital con el escaneador Scanscope CS (Aperio, San Diego, CA.USA). La cuantificación se realiza utilizando el algoritmo del fabricante. Brevemente, el equipo cuantifica la intensidad de expresión total por célula y le asigna un valor numérico de acuerdo al grado de intensidad, intensidad alta, intensidad moderada, intensidad baja o intensidad nula. Se promediaron las intensidades descartando el valor de la intensidad nula y baja.

- Preparaciones de tejidos de tumores generados en ratones

Primero se desparafinó cada corte colocándolos a 60°C por una hora, para posteriormente se hidrataron los tejidos colocándolo en 2 baños en xileno, un baño en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 5 minutos.

Se realizó la recuperación antigénica sumergiendo las laminillas en citrato de sodio (0.01 M pH 7.4) y calentando a ebullición en baño maría (90 °C) durante 20 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos. La unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido fue bloqueada con suero normal de cerdo al 2%. Al otro día se lavaron las preparaciones y se incubaron con el anticuerpo universal Link conjugado a Biotina de Dako y posteriormente con streptavidina conjugada a HRP,

por último, el color fue generado mediante la adición del substrato DAB durante 4 minutos 30 segundos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contra tiñó con hematoxilina. El tejido fue deshidratado bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se realizó el mismo análisis de la expresión de KLF14, de la misma manera que para el TMA.

## **5.8 Análisis estadístico**

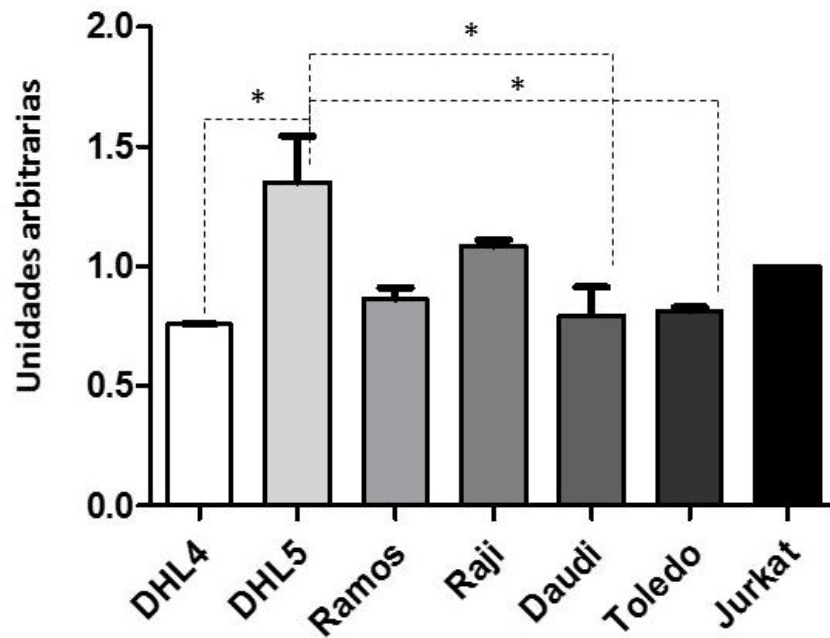
Los datos fueron procesados mediante el programa de análisis estadístico GraphPad Software, Inc. Los valores experimentales que se obtuvieron en el análisis de la expresión de KLF14 en tejido de ratón y en microarreglo de tejidos de biopsias de pacientes se analizaron utilizando prueba de t de Student considerando como diferencia significativa las pruebas en las que  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Análisis de la expresión de KLF14 en líneas celulares de LNH

Con el propósito de evaluar si existe una expresión KLF14 diferencial en las seis diferentes líneas celulares de LNH ya mencionadas realizamos un ensayo de western blot, utilizando como control positivo una línea celular de linfoma de T (Jurkat) la cual está reportado expresa de manera constitutiva esta proteína<sup>57</sup>; para realizar lo anterior se cultivaron dichas líneas celulares al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones de humedad, temperatura y nutrientes hasta que su morfología y cantidad eran las óptimas de acuerdo a lo reportado por el proveedor (ATCC). Se llevó a cabo la lisis de las células para obtener los extractos totales de las mismas y poder proceder a la realización de una electroforesis SDS-PAGE en donde las proteínas fueron separadas<sup>58</sup> bajo la influencia de un campo eléctrico, migrando distinto dependiendo de su carga y peso molecular. Posteriormente, se realizó el western blot mediante la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, utilizando un anticuerpo primario específico para KLF14 y un segundo anticuerpo acoplado a el fluorocromo Alexa Fluor 680; el cual permitió el escaneo y posterior análisis en el equipo Odyssey CLx de Li-cor con ayuda del software del mismo.

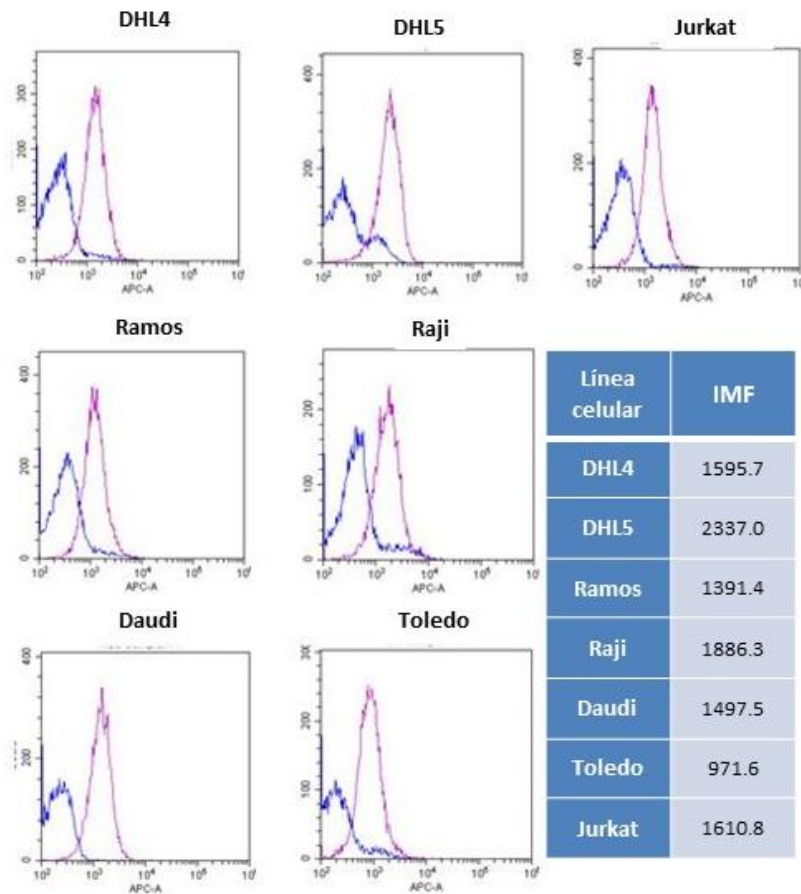
En la **Figura 5A** se muestra el resultado obtenido, las bandas rojas corresponden a la expresión de KLF14 para cada línea celular; y en bandas verdes muestran el control de carga, que en este caso fue la proteína  $\beta$ -actina el cual se utilizó para asegurar que se colocó la misma cantidad de proteínas en cada pozo del gel. Se aprecia que si existe una diferencia en la expresión del factor de transcripción dependiendo de la línea celular de la que se trata. Lo anterior se observa con mayor claridad en el gráfico (**Figura 5B**) en donde previamente se hizo un análisis de densitometría de píxeles con su correspondiente normalización de acuerdo al control de carga. De manera interesante observamos que la línea celular de LNH DHL5 fue la que expresó mayor cantidad de KLF4, la cual fue estadísticamente significativa en el caso de Daudi, DHL4 y Toledo.

**A****B**

**Figura 5. Análisis de la expresión de KLF14 en líneas celulares mediante Western blot. A)** Se realizó electroforesis de extractos totales de las líneas celulares y posteriormente WB, en rojo se muestra la expresión de KLF14 y en verde el control de carga ( $\beta$ -Actina). **B)** A partir de los datos arrojados de la densitometría de píxeles realizada en el equipo Odyssey CLx de Li-cor se realizó la gráfica mostrada normalizando el resultado de la expresión de KLF14 respecto a actina y se calculó el valor arbitrario en cada una de las líneas celulares utilizadas. Los resultados de análisis estadístico demostraron que las células DHL5 son las que más expresan KLF4, cuando se comparó con DHL5, Daudi y Toledo se observa un claro aumento. El cual es significativo DHL5 vs DHL4, Daudi y Toledo  $p < 0.05$ . No existió diferencia entre las otras líneas celulares utilizadas. (ANOVA, con Tukey). La figura es representativa de dos experimentos independientes.



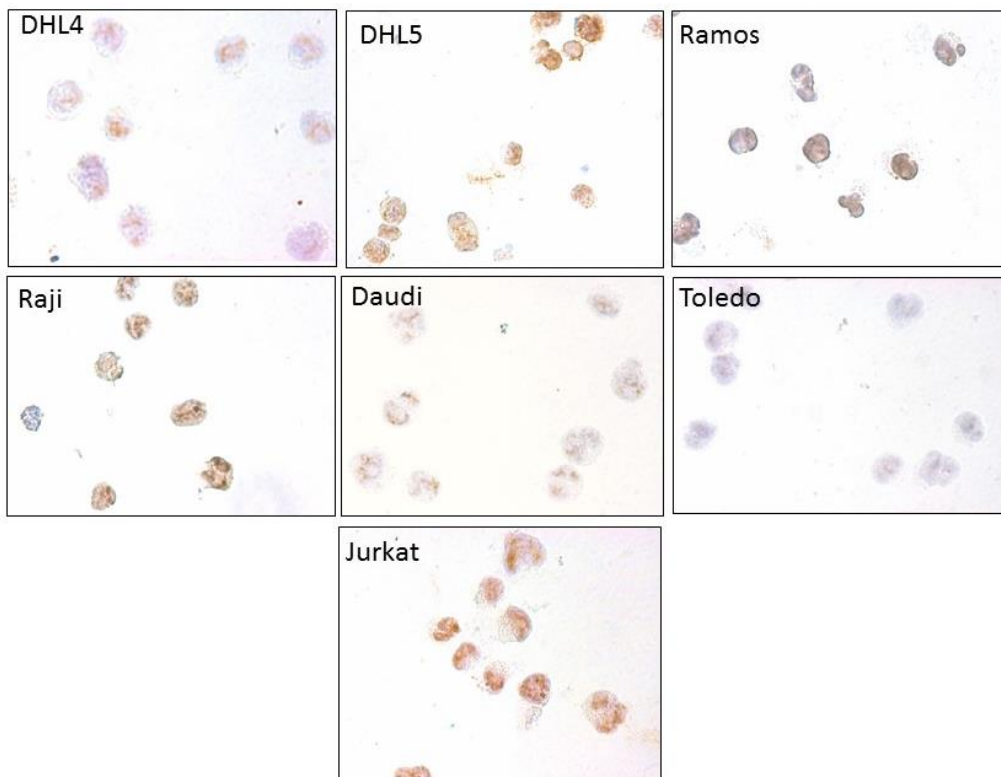
Para corroborar los resultados obtenidos por western blot, acerca de la expresión de KLF14. Realizamos ensayos de citometría para evaluar por este otro método la expresión de esta proteína en las seis diferentes líneas celulares ya mencionadas. Se utilizaron 500,000 células de cada una de las líneas para autofluorescencia y la misma cantidad para evaluar la expresión de KLF14, utilizando un anti-KLF14 acoplado a Alexa fluor 680. Al tratarse de un factor de transcripción, se requirió realizar la permeabilización de las células con un kit de BD Biosciences. En la **Figura 6** se presentan los histogramas obtenidos en el análisis; la línea azul representa la autofluorescencia, mientras que la línea rosa señala las células tratadas con el anticuerpo anti-KLF14. También se muestra una tabla con el valor de IMF (Intensidad Media de Fluorescencia) para cada línea. Los histogramas muestran que si existe una diferencia en la expresión de KLF14 según sea la línea de la que se trata, lo cual se corrobora al comparar los valores de IMF. Los resultados obtenidos son consistentes con los resultados obtenidos mediante western blot, en donde observa que las células DHL5, Ramos, DHL4 y Jurkat (control positivo de expresión de KLF14), son las que más expresan KLF14. Mientras que se observa una baja expresión en las células Daudi y Toledo.



**Figura 6. Análisis de la expresión de KLF14 en líneas celulares por citometría de flujo.** Se muestran los histogramas correspondientes a los datos obtenidos de la citometría de flujo de todas las líneas celulares para la expresión de KLF14, en color azul se muestra la IMF (intensidad media de fluorescencia) para el control de autofluorescencia para cada línea celular; en morado se muestra la IMF para cada línea celular con el anti-KLF14. En la tabla se presentan los valores numéricos de IMF para cada línea celular.

Después de analizar la expresión de KLF14 en las diferentes líneas celulares de LNH. Era de nuestro interés conocer la ubicación de la expresión de esta proteína en estas mismas líneas de celulares. Para lo cual realizamos ensayos de inmunocitoquímica en donde las líneas celulares de LNH se cultivaron bajo las mismas condiciones hasta que la morfología fue la deseada de acuerdo a lo reportado por el proveedor (ATCC). Se prepararon laminillas con células fijas en ellas y se realizó la incubación con los anticuerpos necesarios para observar la expresión deseada, revelando con el kit DB detection kit - rabbit / mouse dual, HRP/DAB de DB Biotech y contratiñendo con hematoxilina.

Se observó cada laminilla al microscopio y se tomaron las microfotografías representativas que se muestran en la **Figura 7**; donde se puede observar la diferencia en tamaño y morfología que existe entre cada línea celular. En cuanto a la expresión del factor de transcripción de interés, se puede apreciar por intensidad en el color café el cual denota la expresión de KLF14 y la ubicación celular del mismo. Los resultados demostraron nuevamente que las células DHL5 expresan mayor cantidad de KLF14, así también como las células Jurkat que como ya se mencionó son nuestro control positivo. De manera importante la expresión fue predominantemente en el núcleo en las células DHL5, Jurkat, Ramos y Raji, lo cual resulta interesante pues KLF14 como factor de transcripción que se localice en núcleo sugiere que está activo. Mientras que en el caso de las células Daudi y Toledo la expresión fue principalmente a nivel citoplasmico.

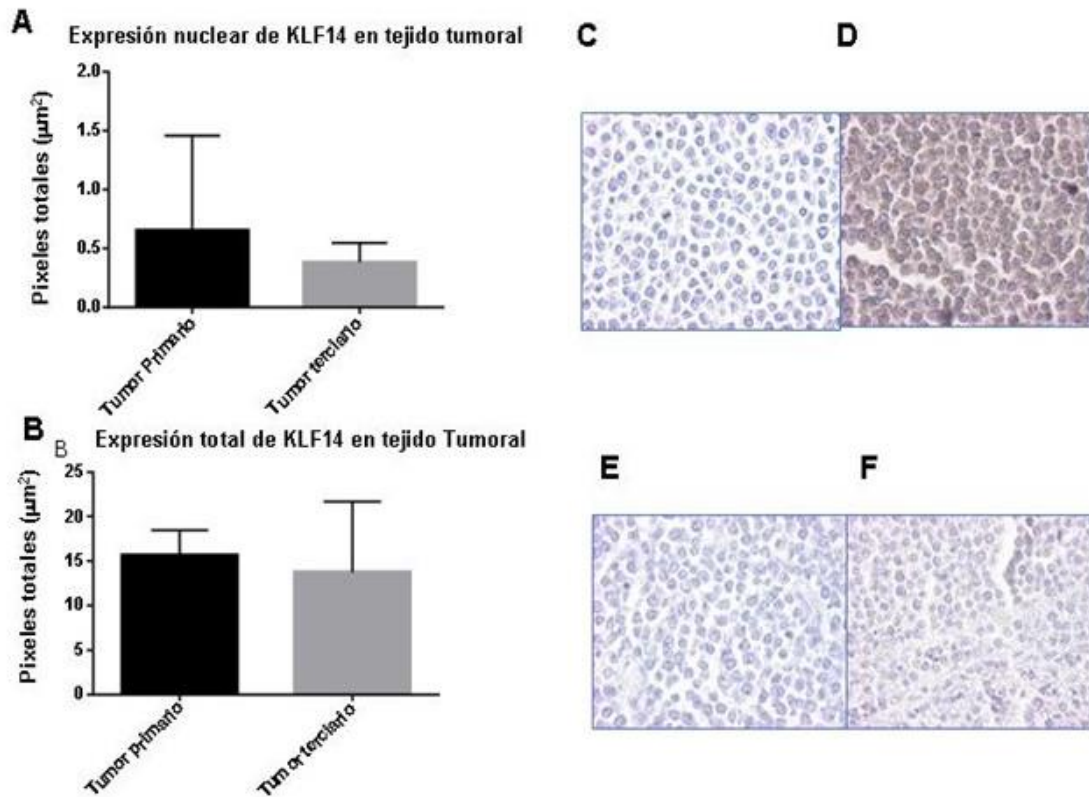


**Figura 7. Expresión de KLF14 en líneas celulares de LNH empleando inmunocitoquímica.** Líneas celulares de linfoma, fueron fijadas en laminillas y teñidas por inmunocitoquímica para evaluar la expresión de KLF14. En las seis diferentes líneas celulares de LNH utilizadas y Jurkat como control positivo. Se observa claramente expresión de KLF14 a nivel citoplasmico en células Toledo y Daudi. A nivel citoplasma núcleo en las células DHL4 y primordialmente nuclear en DHL5, Raji, Ramos y Jurkat. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

## 6.2 Análisis de expresión de KLF14 en tejido de ratón

Con el propósito de conocer si la expresión de KLF14 se podía evaluar también en tejido tumoral de LNH en un modelo murino. Utilizamos tejido de ratón obtenido por el grupo de investigación en experimentos previos. En dicho experimento se utilizaron ratones desnudos (nu/nu) a los que se les inocularon células de LNH (Ramos) en el dorso derecho y se esperó al desarrollo del tumor; después de tres semana los animales fueron sacrificados los y se extrajo el tumor. Parte del tumor se utilizó para hacer preparaciones para inmunohistoquímica y otra parte se disgregó y se introdujo nuevamente a otro ratón. Lo anterior se repitió una vez más, teniendo así tumores primarios (tumor resultante de introducir células de LNH cultivadas a condiciones específicas y controladas), tumores secundarios (resultado de introducir células provenientes de la disgregación de un tumor primario) y tumores terciarios (aquel que creció como resultado de introducir células de la disgregación de un tumor secundario).

Para el análisis de la expresión de KLF14 en los tejidos de tumor primario y terciario de ratón se incubaron con anticuerpo específico para KLF14 después de haberse sometido al proceso de preparación anteriormente mencionado; se reveló y se llevó a cabo un análisis de patología digital con el escaneador ScansScope CS (Aperio, San Diego, CA.USA); éste equipo utiliza un algoritmo de cuantificación particular basado en intensidad en la tinción y permite hacer análisis nuclear y total. En la **Figura 8D** y **8F** se muestran fotografías representativas de la tinción y en la **Figura 8A** y **8B** se presentan las gráficas obtenidas.

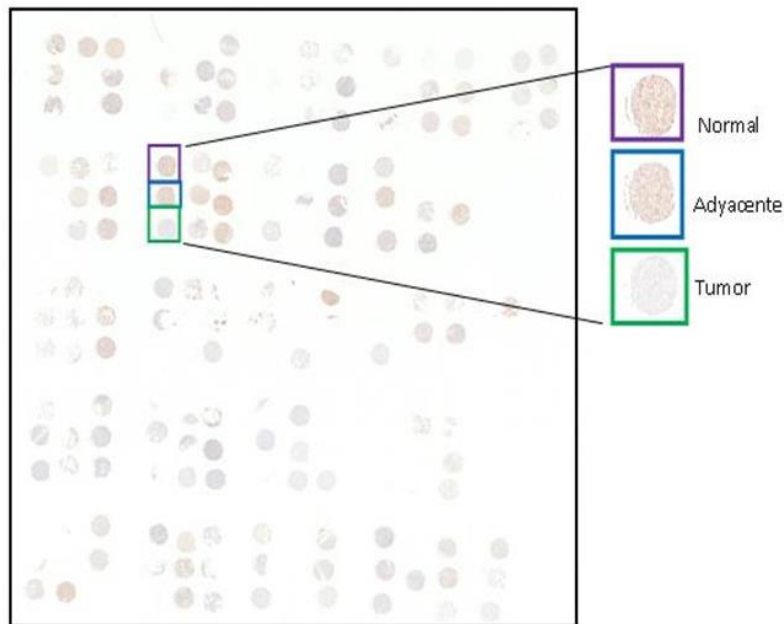


**Figura 8. Análisis de la expresión total y nuclear de KLF14 en tejido de ratón.** A) y B) Se graficaron los datos obtenidos del análisis de patología digital en tejido obtenido de la inoculación de la línea celular Ramos en Ratones. No muestran significancia estadística. C) Control de isotipo de un tumor primario. D) Inmunohistoquímica de un tumor primario. E) Control de isotipo de un tumor terciario. F) Inmunohistoquímica de un tumor terciario.

### 6.3 Análisis de la expresión de KLF14 en microarreglo de tejidos de biopsias de pacientes con linfoma

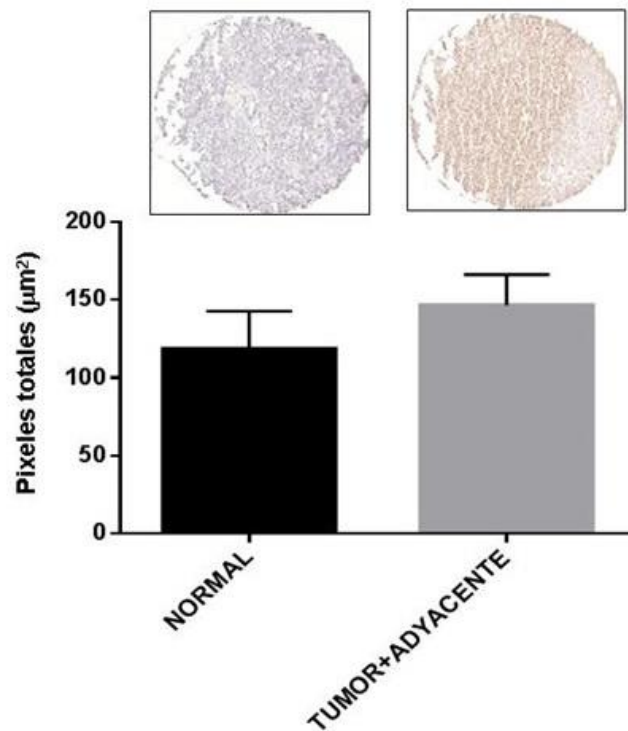
Finalmente, con el propósito de conocer cómo se encontraba la expresión de KLF14 en tejido tumoral proveniente de pacientes con LNH, utilizamos un microarreglo de tejidos (MAT) que contenía 78 biopsias de pacientes adultos. De manera importante cada paciente incluido en el MAT se incluyó tejido proveniente del tumor, tejido adyacente a tumor y tejido normal, tal y como se presenta en la **Figura 9**. Posteriormente, el MAT se sometió a tinción de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de KLF14, el análisis de la expresión se realizó en el Scanscope CS (Aperio, San Diego, CA.USA) y el equipo arrojó datos sobre la intensidad de cada spot. Para el análisis se seleccionaron únicamente los pacientes con LNH cuyos spots estuvieran en buenas condiciones para el análisis.

Se analizó tanto la expresión nuclear, como la total, para el análisis de los datos se tomaron los tejidos adyacentes y tumorales como un mismo grupo ya que mostraron comportamiento similar.



**Figura 9.** Microarreglo de tejidos de biopsias de 78 pacientes con diferentes tipos de LNH. Fotografía digital obtenida del sistema ScanScope (CS- Aperio). Magnificación 4x

En la **Figura 10** se muestran los resultados de la expresión total de KLF14 en todos los spots elegidos sin importar el tipo de LNH del que se trataba, también se presenta un ejemplo de la tinción que se realizó al microarreglo de tejidos.



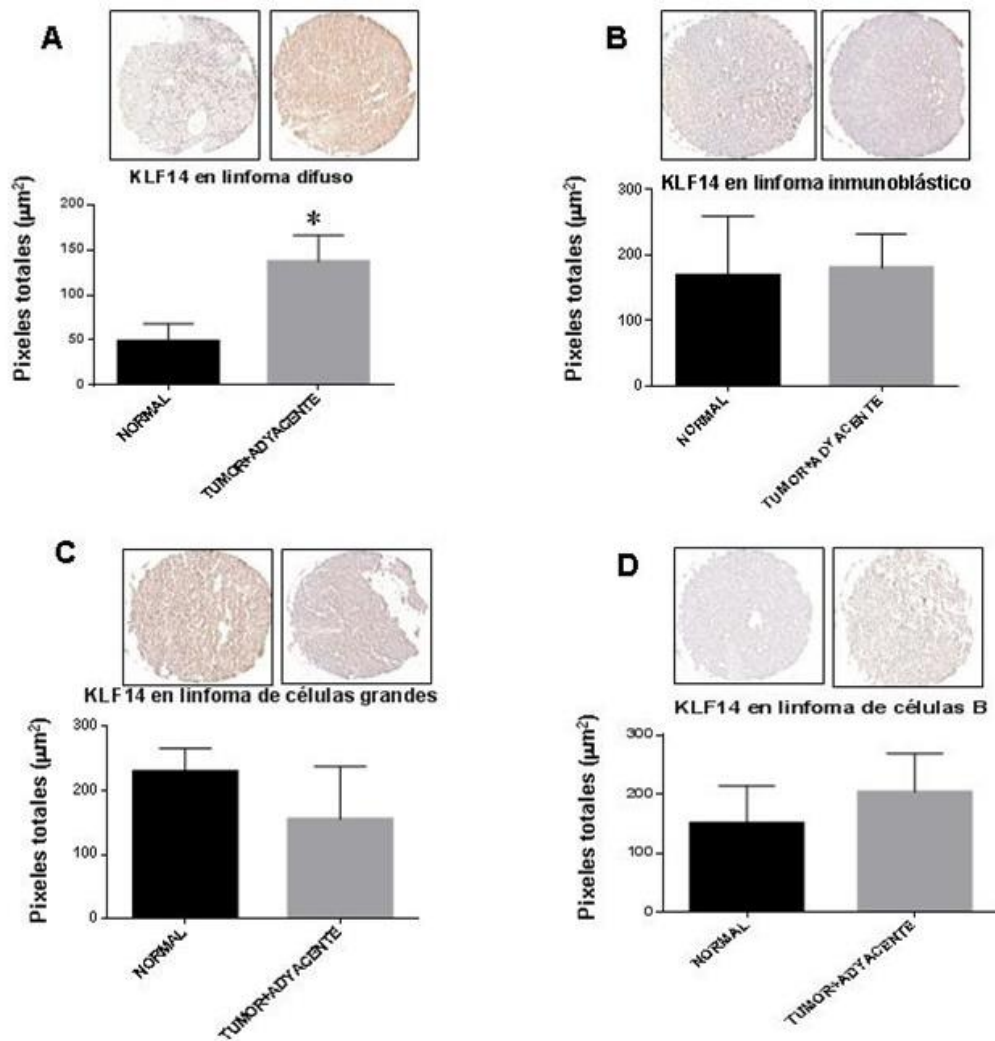
**Figura 10. Análisis de la expresión total de KLF14 en microarreglo.** Se presentan los datos obtenidos del análisis de patología digital de un microarreglo de tejido de pacientes con LNH. No se observó diferencia estadística significativa entre la expresión en tejido normal y tumoral/adyacente ( $p < 0.05$ ). A) Ejemplo de spot correspondiente a un tejido normal en el TMA. B) Ejemplo de spot de tejido tumoral/adyacente en el TMA. 33 tejidos normales y 57 tejido tumoral y adyacente. Magnificación 10X

En la **Figura 11 y 12** se presentan los resultados obtenidos del análisis de expresión total y nuclear de los tipos de linfoma especificados en la información del microarreglo, acompañado de una imagen representativa de la tinción. En la **Tabla 2** se presenta el número y tipo de LNH incluido en el TMA, que se tomó en cuenta para el análisis debido a la calidad del tejido. Los resultados demostraron que solo existe diferencia estadísticamente significativa entre el tejido normal y tumoral en el caso de los pacientes con Linfoma difuso cuando se cuantifico la expresión total.

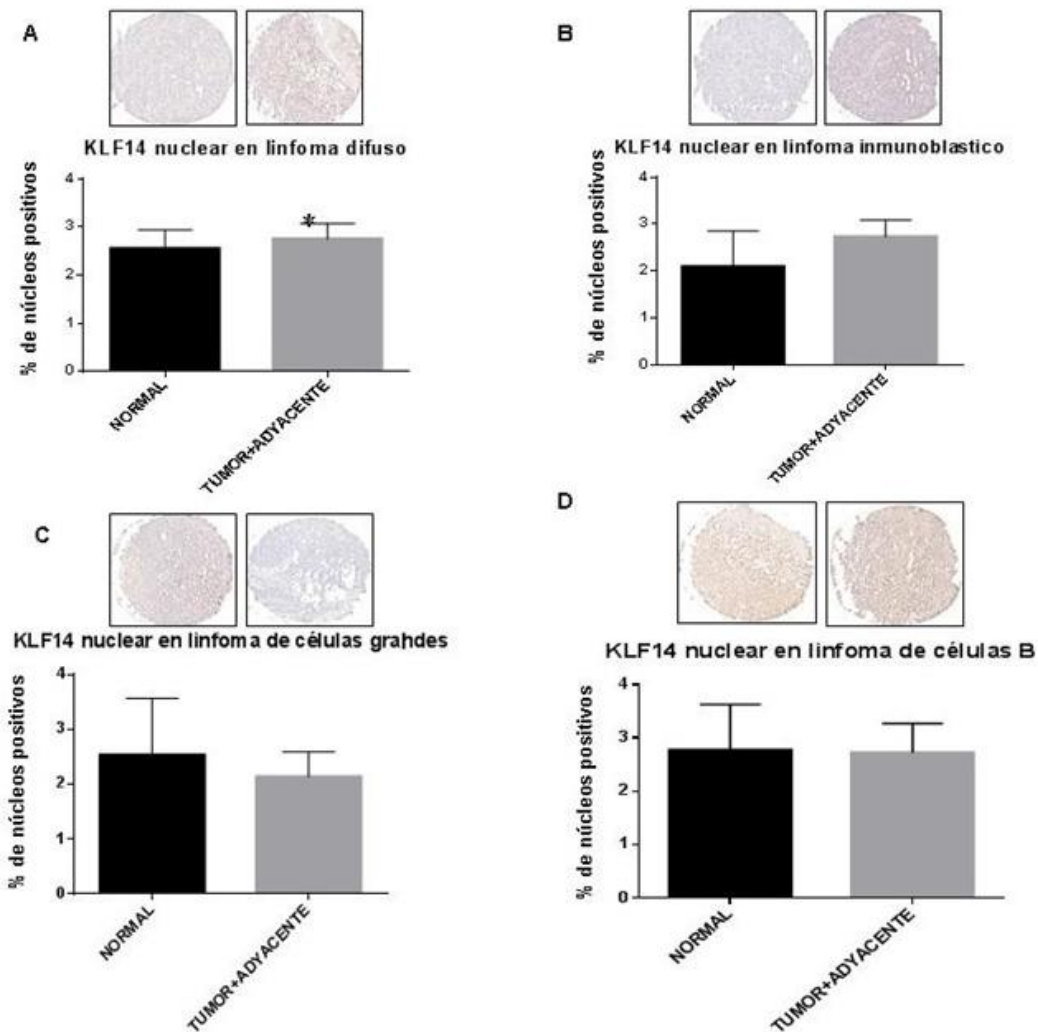
	n tejido normal	n tejido adyacente + tumoral
Linfoma difuso	6	26
Linfoma inmunoblastico	5	9
Linfoma de células B	3	6
Linfoma de células grandes	2	7

**Tabla 2.** Número de muestras que se tomaron en cuenta para el análisis estadístico de los resultados de la inmunohistoquímica realizada en el MAT.





**Figura 11. Análisis de la expresión total de KLF14 en los diferentes tipos de LNH incluidos en el MAT.** Se presentan los datos obtenidos del análisis de patología digital del MAT de pacientes con LNH. A) Gráfica que muestra la diferencia de expresión de KLF14 en Linfoma difuso; si existe diferencia significativa  $p=0.05$ . Spot del TMA que representa tejido normal de un paciente con linfoma difuso (izquierda). Spot del TMA que representa tejido tumoral/adyacente de un paciente con linfoma difuso (derecha). B) Gráfico que representa la expresión de KLF14 en linfoma inmunoblástico, no hay diferencia significativa. Spot del TMA que representa tejido normal de un paciente con linfoma inmublástico (izquierda). Spot del TMA que representa tejido adyacente/tumoral de un paciente con linfoma inmunoblástico(derecha). C) Gráfico en el que se observa la diferencia de expresión de KLF14 en linfoma de células B grandes analizado en TMA, no existe diferencia significativa  $p<0.05$ . Spot del TMA que representa tejido normal de un paciente con linfoma de células grandes (izquierda). Spot del TMA que representa tejido adyacente/tumoral de un paciente con linfoma de células grandes (derecha). D) Gráfica correspondiente a la expresión de KL14 en linfoma de células B, no se encontró diferencia significativa. Spot del TMA que representa tejido normal de un paciente con linfoma de células B (izquierda). Spot del TMA que representa tejido adyacente/tumoral de un paciente con linfoma de células B (derecha). Magnificación 10X.



**Figura 12. Análisis de la expresión nuclear de KLF14 en los diferentes tipos de LNH incluido en el MAT.** Se presentan los datos obtenidos del análisis de patología digital del MAT de tejido de pacientes con LNH. A) Gráfica que muestra la diferencia de expresión nuclear de KLF14 en Linfoma difuso; si existe diferencia significativa  $p=0.05$ . Spot del TMA que representa tejido normal de un paciente con linfoma difuso (izquierda). Spot del TMA que representa tejido tumoral/adyacente de un paciente con linfoma difuso (derecha). B) Gráfico que muestra la diferencia de expresión nuclear de KLF14 en Linfoma inmunoblástico; no existe diferencia significativa. Spot del TMA que representa tejido normal de un paciente con linfoma inmunoblástico (izquierda). Spot del TMA que representa tejido tumoral/adyacente de un paciente con linfoma inmunoblástico (derecha). C) Gráfico que muestra la diferencia de expresión nuclear de KLF14 en Linfoma de células grandes; no existe diferencia significativa. Spot del TMA que representa tejido normal de un paciente con linfoma de células grandes (izquierda). Spot del TMA que representa tejido tumoral/adyacente de un paciente con linfoma de células grandes (derecha). D) Gráfico que muestra la diferencia de expresión nuclear de KLF14 en Linfoma de células B; no existe diferencia significativa. Spot del TMA que representa tejido normal de un paciente con linfoma de células B (izquierda). Spot del TMA que representa tejido tumoral/adyacente de un paciente con linfoma de células B (derecha). Magnificación 10X

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los factores de transcripción pueden ser utilizados como biomarcadores del cáncer, por esa razón actualmente son blanco de diversas investigaciones en muchos países a nivel mundial. Los factores de transcripción tipo Krüppel tienen gran relevancia debido a que están relacionados con muchos de los procesos biológicos importantes en el cáncer (proliferación, muerte programada, diferenciación, etc.).<sup>42</sup>

En este trabajo de investigación tuvo como principal objetivo evaluar la expresión del factor de transcripción KLF14 y su posible relación con el LNH.

Como primer paso, realizamos un análisis de la expresión de KLF14 mediante tres diferentes métodos los cuales consideramos nos dan resultados complementarios de nivel de expresión de la proteína, así como su localización celular. Esto en seis diferentes líneas de LNH y control positivo Jurkat utilizadas durante gran parte del desarrollo de este trabajo, lo anterior con la intención de observar las diferencias en la expresión y tratar de ver si existe una correlación entre la expresión de KLF14 y la malignidad en de dichas líneas celulares.

En la **Figura 5A** se puede ver que las líneas celulares utilizadas si expresan el factor de transcripción ya que se observó una banda en el peso de la proteína al utilizar un anticuerpo específico (en color rojo). Posteriormente, se realizó un análisis densitométrico en donde se graficó la intensidad de fluorescencia de las bandas obtenidas (**Figura 5B**) normalizando con una proteína de expresión constitutiva, en este caso  $\beta$ -actina. Con el resultado del western blot se logró ver que DHL5 muestra una expresión mayor de la proteína, mientras que las demás líneas celulares la expresan de manera similar pero menor a DHL5. En el caso de las células Toledo, Daudi y DHL4 se observa una disminución significativa cuando se compara con DHL5. En las líneas restantes no se observó diferencia significativa. Lo anterior resulta interesante si se toma en cuenta que las células Toledo y Daudi, ha sido reportado son muy agresivas (REF). Resultados muy

parecidos fueron obtenidos cuando realizamos la evaluación de la expresión de KLF14, por el método de criometría de flujo, el cual es altamente sensible. Por otro lado, en el caso de la evaluación de la localización celular de KLF14, fue también consistente con los resultados de expresión en donde se observó que las células Daudi presentan mayor expresión de KLF14 a nivel nuclear, seguido por la células Jurkat y Raji, lo cual resulta muy interesante pues al tratarse de un factor de transcripción que se encuentre en núcleo sugiere fuertemente que se encuentra activado.<sup>59</sup>

Tomando en cuenta que sólo se observó tinción en el núcleo de las células de LNH inferimos que KLF14 es un factor que no necesita de la unión a ningún ligando para ubicarse en el núcleo y que ingresa al núcleo después de su traducción. Sin embargo, puede suceder que dentro del núcleo su acción sobre el ADN sea directa o necesite de la unión de alguna molécula para actuar, para evaluar lo anterior experimentos adicionales son requeridos.

Dentro de las líneas celulares utilizadas hay dos subtipos de LNH; linfoma de Burkitt (Ramos, Raji y Daudi) y Linfoma difuso de células grandes (DHL4, DHL5 y Toledo). DHL5 pertenece al subtipo de linfoma difuso de células grandes y fue la línea que expresó KLF14 en mayor cantidad y este resultado es consistente en ambas técnicas. El linfoma difuso de células B grandes (DLBCL, por sus siglas en inglés) es un linfoma agresivo, caracterizado histológicamente por la proliferación difusa de las células neoplásicas con un tamaño nuclear igual o superior a las células normales. Representa del 30-40% del LNH en adultos en todo el mundo, lo que lo convierte en el más común; los DLBCLs son clínicamente y patológicamente diversos, reflejando parcialmente la diversidad del sistema de células B.<sup>60</sup> Pese a lo anterior, Toledo resultó expresar la menor cantidad de proteína tomando en cuenta todas las líneas y está clasificada como DLBCL; ésta diferencia en la expresión dentro del mismo subtipo puede ser explicada por las características de Toledo, pues es una línea muy compleja desde lograr su proliferación hasta obtener la morfología adecuada para las determinaciones, sin embargo es necesario realizar más repeticiones de la citometría de flujo para

observar si la tendencia se mantiene y con ello poder asegurar que el subtipo de linfoma es un factor importante en la expresión de KLF14. Existe una clasificación extensa de este subtipo de LNH y esto refleja heterogeneidad dentro del DLBCL por lo que la expresión de biomarcadores varía y por lo tanto las características.<sup>61</sup> Los resultados para las líneas celulares identificadas como Linfoma de Burkitt posicionan a Raji en el segundo lugar de expresión tanto por WB como por citometría de flujo, Ramos y Daudi también muestran una expresión importante de KLF14 y es consistente en los resultados. El Linfoma de Burkitt es una enfermedad altamente maligna con tendencia demostrada a un rápido crecimiento y diseminación, sin embargo, si se identifica y se trata correctamente, es el subgrupo de linfoma agresivo asociado con la mayor tasa de curación tanto en adultos como en niños.<sup>62</sup>

Sin embargo, no se puede afirmar que la expresión de KLF14 se correlacione con la malignidad de las diferentes líneas celulares de LNH utilizadas, para ello se requiere realizar experimentos más dirigidos como ensayos de migración e invasión de células tumorales utilizando o no un anticuerpo que bloquee la función de KLF14 por ejemplo. Lo cual ya se está planeando por el grupo de investigación como continuación de este trabajo que fundo las bases para continuar con esta línea de investigación.

Como ya mencionamos, los resultados obtenidos en WB y citometría de flujo e inmunohistoquímica, no pueden indicarnos que existe una correlación entre la malignidad y la expresión de KLF14, si pueden funcionar como herramienta para el diagnóstico en un futuro. Pues se sabe que distinguir entre el linfoma de Burkitt y el linfoma difuso de células B grandes es crítico porque el manejo de estas dos enfermedades es diferente. Los regímenes de quimioterapia con ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP) son relativamente bajos en el caso del DLBCL; mientras que para el linfoma de Burkitt se requieren regímenes quimioterapéuticos intensivos. El diagnóstico del linfoma de Burkitt se basa en hallazgos morfológicos, resultados de inmunofenotipificación y características citogenéticas. Sin embargo, el linfoma difuso de células B grandes y el linfoma de Burkitt pueden tener características morfológicas e inmunofenotípicas

superpuestas, y la translocación característica del linfoma de Burkitt también ocurre en el 5 al 10 por ciento de los casos de DLBCL.

Debido a que el linfoma difuso de células B grandes es más de 20 veces más común que el linfoma de Burkitt, un linfoma con una translocación t(8; 14) puede presentar un problema de diagnóstico.<sup>63</sup> Para que KLF14 pueda funcionar para el diagnóstico de LNH implicaría realizar otro tipo de determinaciones, sin embargo, el presente trabajo, deja claro que este factor de transcripción está presente en ambos subtipos y por lo tanto puede funcionar para comparar los LNH y así encontrar la relación precisa que ayude al diagnóstico.

De la misma forma, se realizó un análisis de la expresión de KLF14 en tejido de ratón (**Figura 8**) que se obtuvo de un experimento previo del grupo de investigación, éste consistió en la inoculación de células Ramos en ratones desnudos (nu/nu) para lograr el crecimiento de un tumor. Los tumores obtenidos se disgregaron y se inocularon nuevamente y se hizo una tercera inoculación con el tumor secundario. Se realizó inmunohistoquímica de un corte de 9 tumores primarios y 5 terciarios; se hizo un análisis total de expresión y a nivel nuclear. En la **Figura 8A** se muestra la gráfica correspondiente a la expresión total, se podría pensar que un tumor primario expresa en mayor medida a KLF14 que uno terciario, sin embargo, los resultados no tienen significancia estadística; en la gráfica que corresponde al análisis de expresión nuclear se observa la misma tendencia sin significancia de igual modo. Lo anterior se ve reflejado en las imágenes **8D** y **8F** donde la diferencia en la tinción es muy marcada. Para tener un resultado significativo es necesario aumentar el número de tumores examinados y someterlos al mismo procedimiento. Puesto que no está documentado el papel de KLF14 no podemos especular sobre el resultado que esperamos ver en este ensayo, sin embargo, las tinciones si denotan expresión de la proteína si se compara con el control de isotipo. Lo cual es muy valioso para este trabajo de investigación, pues como ya se mencionó representa las bases para continuar con una línea de investigación de interés para el grupo.

Por último, para validar nuestros hallazgos en las líneas celulares, se analizó KLF14 por inmunocitoquímica en un microarreglo de tejido conformado por biopsias de tejidos normal, tumoral y adyacente al tumor de pacientes con diversos tipos de LNH. Primero se compararon el total de spots para cada tipo de tejido dentro del MAT, cabe mencionar que se agruparon los spots de tejido adyacente con los de tejido tumoral en parte con propósito de mejorar el análisis estadístico pero lo más importante es que se observó un comportamiento similar entre estos dos tipos de tejido.

En la **Figura 11 y 12** se muestra que el análisis de expresión total y nuclear no tiene significado estadístico; en experimentos realizados con microarreglos se disminuye el error que podría existir entre cada muestra, pero al ver la laminilla al microscopio nos encontramos con que el color de los spots no es uniforme, es decir, entre cortes de tumores existe diferente coloración.

Tomando en cuenta que el análisis se basa en intensidad de color la diferencia antes mencionada podría afectar los resultados finales. Pensando en que el MAT está conformado por varios subtipos de LNH se analizó por separado cada uno, se obtuvo significancia en el linfoma difuso, tanto nuclear como total. La tendencia que se presentó es que el tejido tumoral/adyacente muestra una expresión aumentada de KLF14 en comparación con el tejido normal; Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos mediante WB y citometría en los que la expresión depende del subtipo de LNH del que se trate. Para obtener resultados más adecuados, es necesario aumentar el número de pacientes en el MAT, lo cual se está planeando realizar muy pronto por nuestro grupo de investigación.

## 8. CONCLUSIÓN

El trabajo presentado representa los estudios iniciales, que sienta las bases para continuar con un proyecto más extenso, el cual implica mayor número de muestras y experimentos; al ser un tema poco estudiado no se contaba con información acerca de la expresión de KLF14 en LNH. Los resultados obtenidos muestran que es viable estudiar KLF14 como posible biomarcador en LNH debido a que se demostró por diferentes técnicas la expresión de la proteína en líneas celulares y en tejido observando diferencia dentro de los subtipos de LNH estudiados.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- (1) *WHO* 2017.
- (2) Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI)  
<http://www.inegi.org.mx/> (accessed Jun 21, 2017).
- (3) Civetta, T. M.; De, M.; Civetta, J. D. *Salud Publica Mex.* 2011, 53 (5), 405–414.
- (4) INEGI, I. N. de E. y G. *Mujeres y Hombres en México* 2013; 2014.
- (5) International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012 - Home  
<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (accessed Jun 21, 2017).
- (6) Instituto Nacional de Cancerología. Instituto Nacional de Cancerología  
<http://www.incan.salud.gob.mx/> (accessed Jun 21, 2017).
- (7) American Cancer Society. 2014.
- (8) Gómez, J. *Linfomas B y T: Biología, clínica y tratamiento*, Segunda.; Madrid,



2002.

- (9) Conor, G. O.; Percy, C.; Jaffe, E. **1984**.
- (10) La Sociedad Americana Contra El Cancer. La Sociedad Americana Contra El Cancer | Información sobre cáncer de seno, colon, pulmón, piel, y otros <https://www.cancer.org/es.html> (accessed Jun 21, 2017).
- (11) Filipovich, a H.; Mathur, A.; Kamat, D.; Shapiro, R. S. *Cancer Res.* **1992**, No. 6, 5465–5467.
- (12) Kirsner, R. S.; Federman, D. G. *Conn. Med.* **1996**, 60 (10), 579–582.
- (13) A, K.; Sharma, J.; Evens, A. *Current therapeutic strategies and new treatment paradigms for follicular lymphoma.*; 2015; Vol. 165.
- (14) Ekström-Smedby, K. *Acta Oncol. (Madr).* **2006**, 45 (3), 258–271.
- (15) Skibola, C. F.; Curry, J. D.; Nieters, A. *Haematologica* **2007**, 92 (7), 960–969.
- (16) American Cancer Society. Quimioterapia para linfoma no Hodgkin <https://www.cancer.org/es/cancer/linfoma-no-hodgkin/tratamiento/quimioterapia.html> (accessed Jun 21, 2017).
- (17) Musolino, A.; Boggiani, D.; Panebianco, M.; Vasini, G.; Salvagni, S.; Franciosi, V.; Ardizzoni, A. *Cancer* **2011**, 117 (5), 964–973.
- (18) Vega, G. G.; Franco-Cea, L. A.; Huerta-Yepez, S.; Mayani, H.; Morison, S. L.; Bonavida, B.; Vega, M. I. *Int. J. Oncol.* **2015**, 47 (5), 1735–1748.
- (19) Mueller, N. E.; Mohar, A.; Evans, A. *Cancer Res.* **1992**, No. 22, 5479–5482.
- (20) Hashemi, S. H.; Abbasi, M.; Hajilooi, M.; Poorolajal, J.; Lakzadeh, L. *Avicenna J. Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, 2 (1), 2013–2015.
- (21) Look, A. T. *Science (80-. )*. **2011**, 1059 (1997).
- (22) Ohno, H. *J. Clin. Exp. Hematop.* **2006**, 46 (2), 43–53.

- (23) Falini B, M. D. Y.; B, M. D. Y. F. *Blood* **2002**, 99 (2), 409–426.
- (24) Kapur, U.; Wojcik, E. M. *Diagn. Cytopathol.* **2007**, 35 (8), 525–528.
- (25) Swerdlow, A. J.; Schoemaker, M. J.; Higgins, C. D.; Wright, A. F.; Jacobs, P. A. *Br. J. Cancer* **2008**, 98 (12), 1929–1933.
- (26) Oudejans, J. J.; van der Valk, P. *J. Clin. Pathol.* **2003**, 56 (3), 193.
- (27) Beà, S.; Colomo, L.; López-Guillermo, A.; Salaverria, I.; Puig, X.; Pinyol, M.; Rives, S.; Montserrat, E.; Campo, E. *J. Clin. Oncol.* **2004**, 22 (17), 3498–3506.
- (28) Jaffe, E. S. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2009**, 523–531.
- (29) **2014**.
- (30) Armitage, B. J. O.; Weisenburger, D. D.; Lymphoma, N. *Clinical* **2016**, 16 (8), 2780–2795.
- (31) Campo, E.; Swerdlow, S. H.; Harris, N. L.; Pileri, S.; Stein, H.; Jaffe, E. S. **2017**, 117 (19), 5019–5033.
- (32) The American Society of Hematology. *Blood* **2013**, 89 (11), 3909–3918.
- (33) Nancy, B.; Harris, L.; Jaffe, E. S.; Stein, H.; Banks, P. M.; Chan, J. K. C.; Cleary, M. L.; Delsol, G.; Wolf-peeters, C. De; Falini, B.; Gatter, K. C.; Grogan, T. M.; Isaacson, P. G.; Knowles, D. M.; Mason, D. Y.; Pileri, S. A.; Piris, M. A.; Ralfkiaer, E.; Warnke, R. A. **2015**, 1361–1392.
- (34) Berard, C. W.; Cossman, J.; Jaffe, E. S. *Br. J. Cancer* **1980**, 42 (1), 1–20.
- (35) Jerkeman, M.; Anderson, H.; Dictor, M.; Kvaløy, S.; Akerman, M.; Cavallin-Ståhl, E. *Ann. Hematol.* **2004**, 83 (7), 414–419.
- (36) Bladergroen, B. A.; Meijer, C. J. L. M.; Ten Berge, R. L.; Hack, C. E.; Muris, J. J. F.; Dukers, D. F.; Chott, A.; Kazama, Y.; Oudejans, J. J.; Van Berkum, O.; Kummer, J. A. *Blood* **2002**, 99 (1), 232–237.
- (37) Muris, J.; Cillessen, S.; van Houdt, [No Value]; Kluin-Nelemans, H.;

- Ossenkoppele, G.; van Krieken, H.; Meijer, C.; Oudejans, J. *Ann. Oncol.* **2005**, *16* (7), 73.
- (38) Hedvat, C. V.; Hegde, A.; Chaganti, R. S. K.; Chen, B.; Qin, J.; Filippa, D. A.; Nimer, S. D.; Teruya-Feldstein, J. *Hum. Pathol.* **2002**, *33* (10), 968–974.
- (39) Rossi, D.; Gaidano, G. *Hematology* **2002**, *7* (4), 239–252.
- (40) Bhatt, A. N.; Mathur, R.; Farooque, A.; Verma, A.; Dwarakanath, B. S. *Indian J. Med. Res.* **2010**, *132* (August), 129–149.
- (41) Ondrejka, S.; Hsi, E. **2015**, 1–42.
- (42) Tetreault, M. P.; Yang, Y.; Katz, J. P. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (10), 701–713.
- (43) Limame, R.; Op de Beeck, K.; Lardon, F.; De Wever, O.; Pauwels, P. *Oncotarget* **2014**, *5* (1), 29–48.
- (44) Mcconnell, B. B.; Yang, V. W. *Mammalian Krueppel-Like Factors in Health and Diseases*; 2010; Vol. 90.
- (45) Brayer, K. J.; Segal, D. J. *Cell Biochem. Biophys.* **2008**, *50* (3), 111–131.
- (46) Quinlan, K. G. R.; Verger, A.; Kwok, A.; Lee, S. H. Y.; Perdomo, J.; Nardini, M.; Bolognesi, M.; Crossley, M. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26* (21), 8202–8213.
- (47) Guo, P.; Dong, X. Y.; Zhang, X.; Zhao, K. W.; Sun, X.; Li, Q.; Dong, J. T. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (10), 6071–6078.
- (48) Small, K. S.; Hedman, A. K.; Grundberg, E.; Nica, A. C.; Thorleifsson, G.; Kong, A.; Thorsteindottir, U.; Shin, S.-Y.; Richards, H. B.; Soranzo, N.; Ahmadi, K. R.; Lindgren, C. M.; Stefansson, K.; Dermitzakis, E. T.; Deloukas, P.; Spector, T. D.; McCarthy, M. I. *Nat. Genet.* **2011**, *43* (6), 561–564.
- (49) De Assuncao, T. M.; Lomberk, G.; Cao, S.; Yaqoob, U.; Mathison, A.; Simonetto, D. A.; Huebert, R. C.; Urrutia, R. A.; Shah, V. H. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (22), 15798–15809.

- (50) Guo, Y.; Fan, Y.; Zhang, J.; Lomberk, G. A.; Zhou, Z.; Sun, L.; Mathison, A. J.; Garcia-barrio, M. T.; Zhang, J.; Zeng, L.; Li, L.; Pennathur, S.; Willer, C. J.; Rader, D. J.; Urrutia, R.; Chen, Y. E. *J. Clin. Invest.* **2015**, *d* (10), 3819–3830.
- (51) Truty, M. J.; Lomberk, G.; Fernandez-Zapico, M. E.; Urrutia, R. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (10), 6291–6300.
- (52) Fernandez-Zapico, M. E.; Lomberk, G. A.; Tsuji, S.; DeMars, C. J.; Bardsley, M. R.; Lin, Y.-H.; Almada, L. L.; Han, J.-J.; Mukhopadhyay, D.; Ordog, T.; Buttar, N. S.; Urrutia, R. *Biochem. J.* **2011**, *435* (2), 529–537.
- (53) Smyrk, T. C.; Papadakis, K. A.; Urrutia, R. A. **2016**, *1* (2), 188–202.
- (54) Fan, G.; Sun, L.; Shan, P.; Zhang, X.; Huan, J.; Zhang, X.; Li, D.; Wang, T.; Wei, T.; Gu, X.; Yao, L.; Xuan, Y.; Hou, Z.; Cui, Y.; Cao, L.; Li, X.; Zhang, S.; Wang, C. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8450.
- (55) National Human Genome Research Institute. Knockout Mice Fact Sheet - National Human Genome Research Institute (NHGRI)  
<https://www.genome.gov/12514551/> (accessed Jun 21, 2017).
- (56) AIDS and Cancer Specimen Resource | Research in the field of HIV/AIDS  
<https://acsr.ucsf.edu/> (accessed Jun 21, 2017).
- (57) abcam. Anti-KLF14 antibody - C-terminal (ab170225) | Abcam  
<http://www.abcam.com/klf14-antibody-c-terminal-ab170225.html> (accessed Jun 21, 2017).
- (58) Hilda, G. **2000**, *1* (2), 31–41.
- (59) Hunter, C. C.; Siebert, K. S.; Downes, D. J.; Wong, H.; Kreutzberger, S. D.; Fraser, J. A.; Clarke, D. F.; Hynes, M. J.; Davis, M. A.; Todd, B. *Journals ASM* **2014**, *13* (4), 527–538.
- (60) Xie, Y.; Pittaluga, S. *Semin Haematol.* **2016**, *52* (2), 57–66.
- (61) Amin, A. D.; Peters, T. L.; Li, L.; Rajan, S. S.; Choudhari, R.; Puvvada, S. D.;

Schatz, J. H. **2017**, 1–23.

- (62) Dozzo M, Carobolante F, Donisi PM, Scattolin A, Maino E, Sancetta R, Viero P, B. R. *Adolesc Heal. Med Ther.* **2016**, 11–29.
- (63) Lam, L. T.; Ph, D.; Kluin, P.; Boerma, E.; Greiner, T. C.; Weisenburger, D. D.; Rosenwald, A.; Ott, G.; Gascoyne, R. D.; Delabie, J.; Rimsza, L. M.; Braziel, R. M.; Grogan, T. M.; Campo, E.; Jaffe, E. S.; Dave, B. J.; Ph, D.; Sanger, W.; Ph, D.; Bast, M.; Vose, J. M.; Miller, T. P.; Wilson, W. H.; Ph, D.; Bahl, M.; Zhao, H.; Yang, L.; Ph, D.; Powell, J.; Simon, R.; Sc, D.; Chan, W. C.; Staudt, L. M.; Ph, D. **2006**, 2431–2442.