



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Expresión proteica de los factores de transcripción,
Krüppel-like factors 5 y 6, en cáncer de pene”

TESIS

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

PRESENTA

SERGIO DANIEL ANDONEGUI ELGUERA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Jesús Fernando Montiel Aguirre
VOCAL: Francisco Javier Plascencia de la Parra
SECRETARIO: Daniel Marrero Rodríguez
1er. SUPLENTE: Julio César Martínez Álvarez
2° SUPLENTE: Luz María Mora Velandia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE ONCOLOGÍA GENÓMICA, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS, HOSPITAL DE ONCOLOGÍA, CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Daniel Marrero Rodríguez

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Keiko Taniguchi Ponciano

SUSTENTANTE (S):

Sergio Daniel Andonegui Elguera

Contenido

| | |
|--|----|
| Índice de figuras:..... | iv |
| Índice de tablas:..... | iv |
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Introducción..... | 2 |
| 3. Antecedentes..... | 3 |
| 3.1. Cáncer | 4 |
| 3.1.1. Proceso molecular del cáncer | 5 |
| 3.2. Cáncer de pene | 6 |
| 3.2.1. Epidemiología del cáncer de pene | 8 |
| 3.2.2. Factores de riesgo del cáncer de pene | 8 |
| 3.2.3. Biología celular y molecular del cáncer de pene | 9 |
| 3.3. Factores de transcripción..... | 10 |
| 3.3.1. Krüppel-like factors (KLF) | 11 |
| 3.3.2. Estructura proteica general de KLFs | 12 |
| 3.3.3. Modificaciones Postraduccionales de KLFs..... | 14 |
| 3.3.4. KLF5 | 16 |
| 3.3.5. KLF5 en neoplasias..... | 17 |
| 3.3.6. KLF6..... | 19 |
| 3.3.7. KLF6 en neoplasias | 20 |
| 4. Justificación | 22 |
| 5. Hipótesis..... | 23 |
| 6. Objetivos | 23 |
| 7. Materiales y métodos | 24 |
| 7.1. Recolección de tejido, análisis histológicos y preparación de laminillas histológicas | 24 |
| 7.2. Construcción del arreglo de tejidos | 25 |
| 7.3. Detección de las proteínas KLF5 y KLF6 por IHQ | 26 |
| 8. Resultados y discusión de resultados | 27 |
| 8.1. Inmudetección de KLF5 en CaPe y lesiones benignas de prepucio | 27 |
| 3.1. Inmudetección de KLF6 en CaPe y lesiones benignas de prepucio | 32 |
| 9. Conclusiones | 39 |
| 10. Bibliografía | 39 |
| 11. Apéndice | 46 |

Índice de figuras:

Pag.

| | |
|--|----|
| 1. Figura 1. Anatomía del pene. Recuperado de www.vigrxplus-review.com , 2016..... | 3 |
| 2. Figura 2. <i>Gerard J. Tortora</i> (2006). Principales capas de la epidermis. Recuperado de <i>Principios de Anatomía y Fisiología</i> | 4 |
| 3. Figura 3. Subclasificación del cáncer de pene según el origen celular y lesiones precursoras..... | 7 |
| 4. Figura 4. Dos vías moleculares alteradas en CaPe. Modificado de M. Bleeker y C. Meijer (2008)..... | 9 |
| 5. Figura 5. Representación de la estructura proteica de la familia KLF. Modificado de B. McConnell (2010)..... | 12 |
| 6. Figura 6. Nagashima, T. (2008). Representación de los dominios de dedos de zinc de KLF5, muestra el rango de 363 a 457 de los residuos. Recuperado de http://www.rcsb.org/pdb | 16 |
| 7. Figura 7. Nagashima, T. (2008). Representación de los dominios de dedos de zinc de KLF6, muestra el rango de 178 a 282 de los residuos. Recuperado de http://www.proteinmodelportal.org | 19 |
| 8. Figura 8. Grado de diferenciación en CaPe..... | 27 |
| 9. Figura 9. Inmudetección de KLF5 en lesiones benignas y tejido normal de cérvix..... | 29 |
| 10. Figura 10. Inmunodetección de KLF5 en carcinomas de baja diferenciación..... | 30 |
| 11. Figura 11. Inmunodetección de KLF5 en carcinomas de pene bien diferenciados..... | 31 |
| 12. Figura 12. Inmudetección de KLF6 en lesiones benignas y tejido normal de mucosa oral..... | 33 |
| 13. Figura 13. Inmunoseñal de KLF6 en diferentes muestras de CaPe..... | 34 |
| 14. Figura 14. Carcinomas negativos a la proteína KLF6..... | 35 |

Índice de tablas:

Pag.

| | |
|--|----|
| 1. Tabla 1. Resumen de resultados obtenidos por inmunodetección de KLF5 en Cape y lesiones benignas..... | 27 |
| 2. Tabla 2. Resumen de resultados obtenidos por inmunodetección de KLF6 en Cape y lesiones benignas..... | 32 |

1. Resumen

El cáncer de pene representa el 8% de los tumores andrológicos en México, la literatura reporta una sobrevida máxima de tres años si no se tiene un diagnóstico y tratamiento adecuado. Generalmente del tipo epitelial, el cáncer de pene tiene baja incidencia en países desarrollados, pero ésta aumenta en los países en vías de desarrollo. La aparición de células transformadas converge con alteraciones genéticas como la alteración de la expresión y silenciamiento de genes, labor que puede ser regulada por factores de transcripción. Krüppel-like factors, es una familia de 17 factores de transcripción con amplia gama de genes regulados, y con repercusiones en actividades tales como angiogénesis, proliferación, maduración, entre otras. En particular KLF5 y KLF6 han sido estudiados en varios tipos de cáncer donde sobresalen los tumores malignos de tejido epitelial como cáncer de colon, cabeza y cuello, cervix, entre otros, mostrando un patrón diferente con respecto a tejidos normales e incluso asociando mutaciones de los genes. En el presente trabajo se evaluó el patrón de expresión de KLF5 y KLF6 en cáncer de pene. Se evaluaron un total de 64 muestras clínicas, de los cuales, 57 corresponden a cáncer de pene y 7 a lesiones benignas, con las cuales se construyeron microarreglos de tejidos, éstos fueron sometidos a inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales contra KLF5 y KLF6, finalmente los tejidos fueron evaluados mediante un microscopio óptico. KLF5 presenta inmuno señal en las células basales del epitelio en lesiones benignas, los estratos superiores sólo expresión nuclear. En contraste, los tumores tuvieron expresión nuclear y citoplásmica en todas las células transformadas. Por otro lado, KLF6 tuvo una expresión nuclear en estratos superiores del epitelio en lesiones benignas, los tumores malignos, en cambio, presentaron inmunoseñal nuclear y citoplásmica en el 64% de las muestras, el 36% restante tuvo poca o nula expresión de KLF6. El presente trabajo aporta evidencias iniciales que demuestran alteraciones de KLF5 y KLF6 en CaPe, las

observaciones revelan cambios de expresión a nivel proteico en C aPe generando diferentes patrones de localización de las proteínas estudiadas.

2. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, los tumores malignos epiteliales son el tipo de cáncer más común. El cáncer de pene representa el 8% de los tumores malignos andrológicos en México. Es un tumor poco estudiado por su baja incidencia pero que comparte factores de riesgo y eventos celulares y moleculares con otros tipos de cancer, como la exposición al virus del papiloma humano. La transformación celular maligna conlleva, entre otros procesos, cambios en la regulación génica por parte de los factores de transcripción. Los factores de transcripción pueden silenciar o promover la expresión de diversos genes. Los factores de transcripción Krüppel-like factors (KLF), han sido estudiados en cáncer con una amplia gama de actividades como proliferación, angiogénesis, arresto celular, diferenciación, migración, entre otros. KLF comprende una familia de 17 miembros que comparten un dominio de unión a DNA a través de una triada de dedos de zinc en el carbonilo terminal. El amino terminal es variable y concede la vasta actividad de sus miembros. De esta familia, los miembros KLF5 y KLF6 son los más estudiados en procesos de transformación. Capaces de regular la transcripción de CDKN1A, CDKN1B, NOTCH1, CDK4, MAPK1, VEGF entre otros, que culminan en la regulación de procesos como apoptosis y angiogénesis (Andreoli, Gehrau, & Bocco, 2010; Gao, Ding, Chen, Chen, & Zhou, 2015). La expresión de KLF5 y KLF6 ha sido ampliamente estudiada en cáncer de mama, pulmón, esófago, colon, entre otros, mostrando una sobreexpresión (Tetreault, Yang, & Katz, 2013). Es por ello que se tiene como objetivo el realizar un perfil de expresión proteica de los factores de transcripción KLF5 y KLF6 en cáncer de pene y lesiones benignas.

3. Antecedentes

El pene es un órgano genital externo ubicado en la zona pélvica conformado por tres regiones: proximal, cuerpo cilíndrico y extremidad distal. En particular el cuerpo cilíndrico está conformado por el cuerpo cavernoso, el cuerpo esponjoso y recubiertos por el prepucio. Por otro lado, la extremidad distal está formada por el glande que se limita por la corona que forma un surco alrededor del mismo, finalmente la uretra es el conducto que atraviesa todo el pene. Varias capas envuelven el pene, en la zona más externa se encuentra la piel del pene, seguida de la fascia superficial, el tejido subcutáneo y la fascia profunda del pene que tiene contacto con el cuerpo cavernoso y esponjoso que rodean la uretra. El tejido epitelial externo es de especial importancia en el cáncer de pene por lo que se describe brevemente.

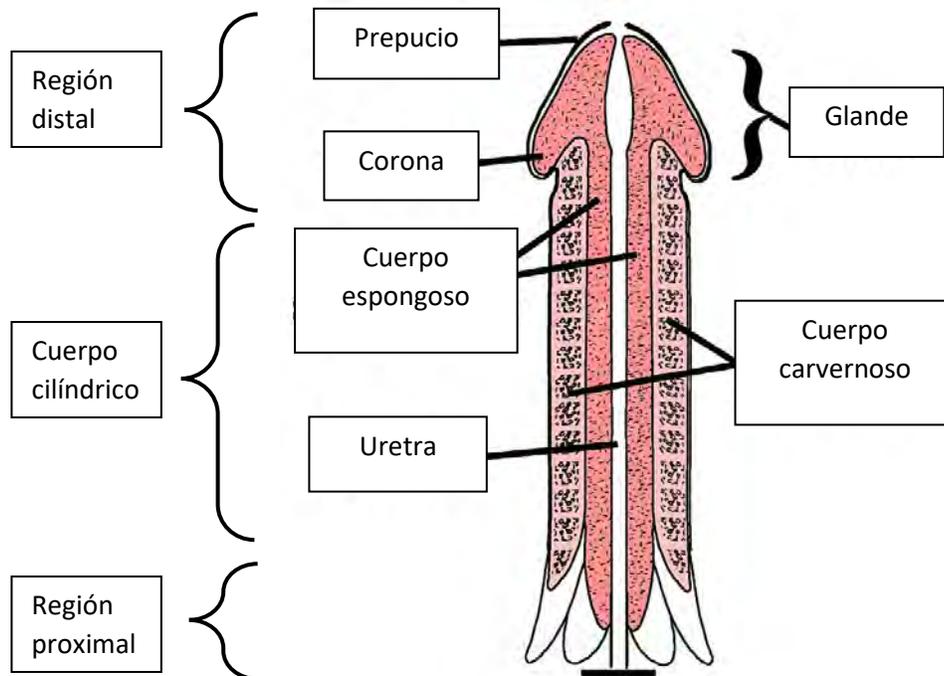


Figura 1. Anatomía del pene. Recuperado de www.vigrxplus-review.com, 2016.

La piel está conformada por dos estratos, la epidermis (estrato superior) que consiste en tejido epitelial escamoso (queratinizado en el caso de las regiones expuestas secas y no queratinizado en regiones húmedas como el

revestimiento de la boca) y la dermis (estrato inferior) que es tejido conectivo. La epidermis se caracteriza por los siguientes segmentos: a) basal, es un estrato germinativo encargado de mantener el epitelio plano estratificado, b) espinoso, contiene queratinocitos que se aplanan en la sección más superficial y c) granuloso, formado por queratinocitos aplanados que experimentan apoptosis. (ver figura 2).

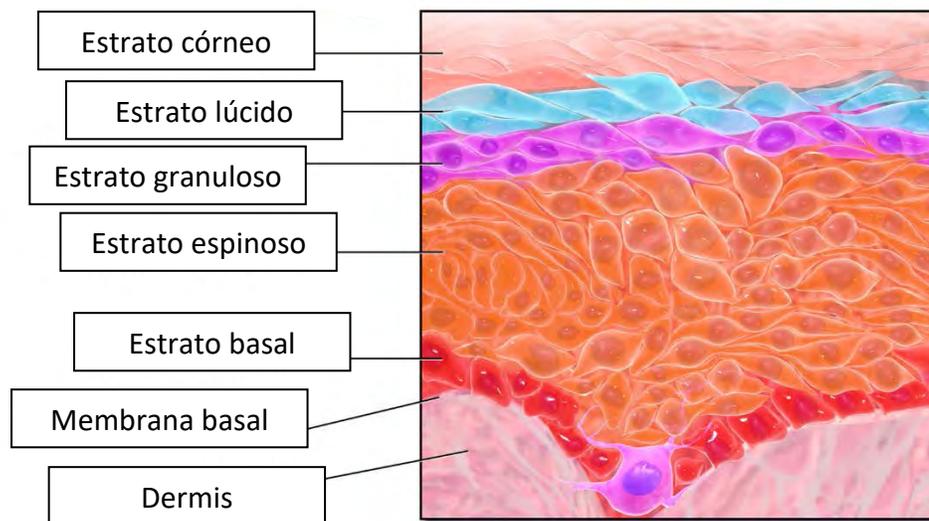


Figura 2. Principales capas de la epidermis. Las células del estrato espinoso son las afectadas en el CCE, este estrato está formado por ocho a 10 capas de células poliédricas. Gerard J. Tortora. Recuperado de Principios de Anatomía y Fisiología. 2006.

3.1. Cáncer

Al conjunto de eventos producidos por un daño genético no letal que se origina por la expansión clonal, que prolifera de forma anormal y que puede infiltrarse a tejidos próximos o alejados es conocido como cáncer. Se puede presentar en cualquier órgano. Los tumores son heterogéneos entre los diferentes tipos, e incluso intratumoralmente, a pesar de ello, es posible generalizar varias características resumidas por Hanahan y Weinberg (2011).

3.1.1. Proceso molecular del cáncer

Según Hanahan y Weinberg (2011) la célula debe adquirir por lo menos las siguientes características para poder convertirse en una célula maligna:

1. El primero de los eventos es la adquisición de señales de crecimiento, es decir que produzca autoestimulación del crecimiento y no depender de señalización externa, como ejemplo tenemos la sobreexpresión de receptores como EGFR/erbB/Her2/neu (Epidermal Growth Factor Receptor).

2. El segundo evento es la insensibilidad a señales que inhiban el crecimiento, esto está dado por la pérdida de la función de proteínas reguladoras de ciclo como la proteína de Rb (Retinoblastoma).

3. El tercer evento involucra la resistencia a apoptosis, esto mediado por la depleción y/o insensibilidad de la célula a proteínas como p53.

4. La adquisición de los tres eventos anteriores y la replicación completa de los telómeros conlleva a la cuarta característica que es el potencial de replicarse sin límites.

5. El quinto de los eventos es la neo angiogénesis por la expresión de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) y su receptor, entre otros.

6. Por otro lado, otra característica importante es la capacidad de invadir otros tejidos o metástasis derivado de una interferencia en la función de caderinas y CAM's (Cell Adhesion Molecules).

7. La evasión del sistema inmune, en la cual las células de respuesta inmune fallan en la identificación, resistencia y erradicación de las células tumorales en etapas iniciales, así como en etapas avanzadas.

8. La inflamación promovida por el tumor que genera la acumulación de factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores proangiogénicos entre otras moléculas que aportan características oncogénicas.

Así mismo se describen como características de la célula maligna, la inestabilidad genómica, la cual hace referencia a la presencia de mutaciones inactivantes en genes supresores de tumor así como las mutaciones de

ganancia de actividad en oncogenes. La alteración del metabolismo energético de la célula, la cual se refiere a la alteración en el metabolismo de carbohidratos y moléculas involucradas en la producción de energía celular.

3.2. Cáncer de pene

Los tumores malignos de pene, en su mayoría son carcinomas, es decir que se producen en el tejido epitelial. La principal estirpe de CaPe es el carcinoma de células escamosas (CCE) presente en el 95% de los casos, afectando principalmente al surco coronal, el glande y el prepucio. Otras estirpes que se han reportado son melanomas (cáncer de melanocitos), sarcomas (cáncer de tejido conectivo) y carcinomas de células basales, que en conjunto representan menos del 5% de los casos. El CCE de pene comparte una patología similar con los CCEs orofaríngeos, cervicales, vaginales, de vulva, y ano, por lo que se puede deducir que comparten al menos parte de su historia natural. El cáncer de pene se clasifica como se muestra en la figura 3, macroscópicamente forman desde una úlcera enrojecida hasta crecimientos tipo "coliflor" de hasta 14 centímetros, generalmente con una coloración de blanca a gris. Los CCE de tipo basaloides, verrucoso y papilar han sido asociados con VPH, destacando VPH16 y VPH18. Se han descrito al menos 30 variantes a las que están expuestos los hombres asociadas a infecciones transitorias, siendo VPH6 y VPH11 los más frecuentes, estos genotipos clasificados de bajo riesgo.

En el cáncer de pene se han descrito lesiones precursoras, como lo son las neoplasias de bajo grado que en general suelen terminar en un CCE:

☒ Neoplasia intraepitelial grado III. Caracterizado por cambios en el tamaño, forma y polaridad celular en todo el espesor epitelial.

⊖ Enfermedad de Bowen. Además de la alteración de la morfología normal, presencia de acantosis y queratinocitos atípicos caracterizan esta lesión precursora.

⊖ Eritroplasia de Queyrat. Esta denominación se otorga a la enfermedad de Bowen cuando se presenta en el glande, carcinoma epidermoide *in situ* con características histológicas particulares y que puede desencadenar un carcinoma invasivo.

⊖ Enfermedad de Paget. Es una lesión más agresiva, con células atípicas, citoplasma granuloso, nucléolo prominente y núcleo vesicular.

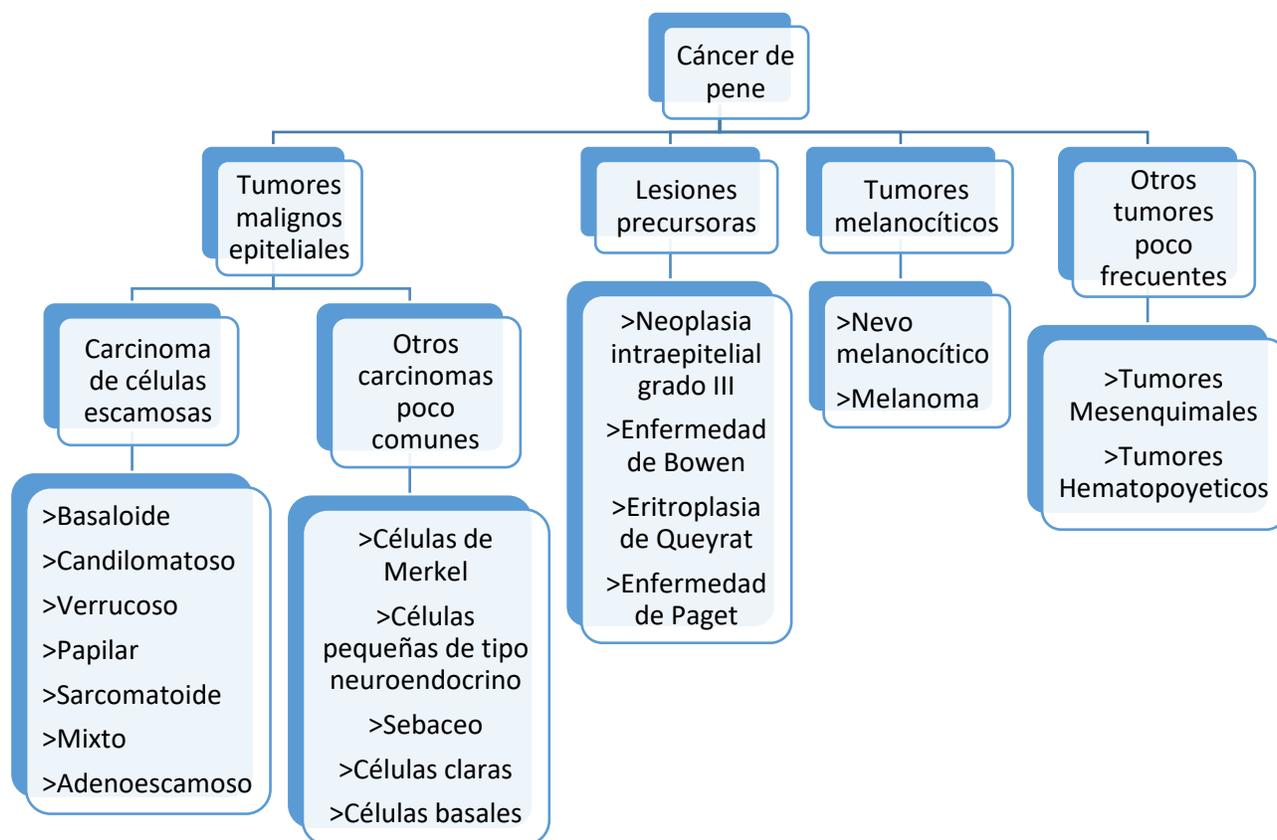


Figura 3. Subclasificación del cáncer de pene según el origen celular y lesiones precursoras.

Finalmente, los tumores de tejido conectivo son escasos, pero más agresivos que CCE y suelen tener características similares a sarcomas de otras regiones del cuerpo, en los cuales destacan angiosarcomas, que suelen generarse cerca del tejido endotelial, sarcoma de Kaposi, relacionado con

herpes virus humano 8, y leiomioma, que puede alcanzar hasta dos tercios de la porción distal del pene.

3.2.1. Epidemiología del cáncer de pene

En Europa y Estados Unidos de Norteamérica, el cáncer de pene representa el 1% de los tumores malignos en hombres, en Sudamérica este porcentaje se eleva a alrededor de 18-20% afectando principalmente a países como Brasil y regiones donde el virus del papiloma humano, tiene mayor incidencia.

En 2006, se reportaron en México 344 casos nuevos, ese mismo año, hubo al menos 106 fallecimientos por este padecimiento, es decir una incidencia de 0.67 y una mortalidad 0.21 por cada 100,000 hombres respectivamente.

3.2.2. Factores de riesgo del cáncer de pene

Los principales factores etiológicos incluyen hábitos socio-culturales y factores biológicos. Dentro de los cuales se encuentra la fimosis, que consiste en un prepucio no retráctil que lleva a la presencia de inflamación y la acumulación de bacterias. Se ha reportado que la circuncisión en los recién nacidos disminuye la probabilidad de contraer cáncer de pene, debido a que facilita la higiene disminuyendo considerablemente la población bacteriana, además reduce la humedad, la mucosa y la presencia de células de Langerhans (células blanco del VIH), finalmente la capa queratinizada es más delgada en el interior del prepucio para hombres no circuncidados. La falta de higiene puede llevar a la inflamación crónica a través de la acumulación de esmegma e infección de virus y bacterias. La balanitis y postitis son inflamaciones de glándula y prepucio respectivamente que en casos crónicos

pueden ser pro-oncogénicos por la presencia de moléculas de señalización que contribuyen a la proliferación, supervivencia celular y angiogénesis. El tabaquismo, los metabolitos producidos y absorbidos tras el consumo de tabaco pueden generar daño genético y ha sido asociado epidemiológicamente con el desarrollo del cáncer de pene. La infección por VPH puede alterar las vías supresoras de tumores de Rb y p53 por acción de las proteínas virales E6 y E7.

Biología celular y molecular del cáncer de pene

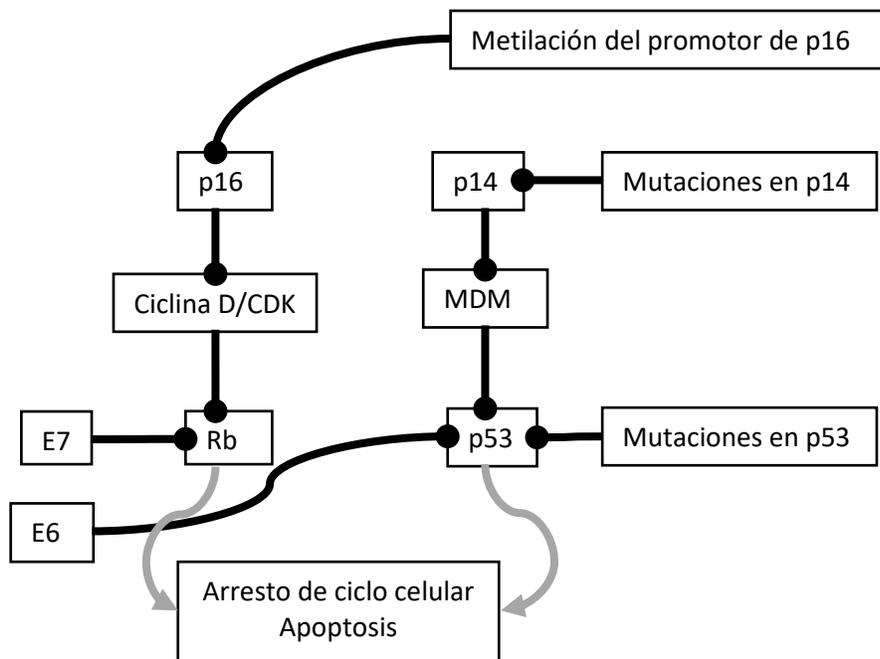


Figura 4. Dos vías moleculares alteradas en CaPe. Modificado de M. Bleeker y C. Meijer (2008).

La patogénesis molecular del cáncer de pene se ha estudiado de manera separada, un grupo de CaPe con la presencia de VPH y otro grupo donde no se ha identificado este virus. Primeramente, para los tumores asociados con la infección de VPH, se

ha propuesto que siguen un desarrollo similar al cáncer cervical, donde las oncoproteínas E6 y E7 se unen a los supresores p53 y Rb respectivamente, generando una perturbación en las vías p14^{ARF}/MDM2/p53 y p16^{INK4a}/ciclina D/Rb, en consecuencia, una desregulación de la división celular y apoptosis. Finalmente, también se han reportado asociaciones inversas entre la presencia de VPH de alto riesgo y la estabilización de p53. Para los tumores

no dependientes de la infección por VPH, se ha reportado la sobreexpresión de BMI-1 que puede inhibir la expresión de p14^{ARF} y p16^{INK4a}. La vía p16^{INK4a}/ciclina D/Rb puede ser silenciada por la hipermetilación del promotor de p16^{INK4a}, particularidad que ha sido ubicada en al menos 15% de los casos. Mutaciones somáticas de p53, sobreexpresión de MDM2 y la mutación de p14^{ARF} han sido reportados en cáncer de pene. Genes como Myc, TWIST, ZEB1, SOX2, entre otros, son factores de transcripción que se han reportado con expresiones alteradas en cáncer de pene, aunque no se ha dilucidado totalmente el papel que juegan en la génesis y el desarrollo del cáncer, en general los factores de transcripción han producido interés en todo tipo de tumor.

3.3. Factores de transcripción

Son un grupo de proteínas que junto a la ARN polimerasa II producen el complejo de pre-iniciación de la transcripción, este conjunto indica el inicio de transcripción para los genes en general, por lo que los factores de transcripción generales: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF y TFIIH son indispensables para la transcripción de los genes (Thomas & Chiang, 2006).

Existen muchos otros factores de transcripción que tienen un fuerte efecto en la regulación transcripcional de sus genes blanco, también, pueden tener varios blancos y un gen puede ser regulado por diferentes factores de transcripción. Para llevar a cabo sus actividades (T. Will, 2015), los factores de transcripción tienen varios dominios como son:

1. Dominio de unión a DNA. Facilita la capacidad de unirse a su región blanco. A algunos factores de transcripción tienen dos diferentes regiones de unión a DNA.
2. Dominios de activación. Capacitan al factor de transcripción para llevar a cabo sus funciones reclutando a otras proteínas.

3. Dominios de unión a ligando. Permiten que los factores de transcripción sean susceptibles al estímulo externo y poder llevar a cabo sus funciones cuando es requerido.
4. Dominios de transporte. Para alcanzar su forma activa los factores de transcripción deben ser transportados al núcleo, este dominio les esta actividad.

Los factores de transcripción son usualmente clasificados por su dominio de unión de DNA. Aproximadamente 13 familias han sido identificadas en células eucariontes. Dentro de estas familias podemos encontrar a los Factores de Transcripción Tipo Krüppel (KLF por sus siglas en ingles).

Krüppel-like factors (KLF)

Los Krüppel-like factors (KLF) son una familia de factores de transcripción, inicialmente descritos por su función en el desarrollo y diferenciación de *Drosophila* spp (Schuh et al., 1986). La familia en mamíferos está caracterizada por tres dedos de zinc que se encargan de la unión a DNA. La familia está conformada por 17 miembros con una amplia gama de genes blanco que repercuten en actividades de diferenciación, proliferación, control de ciclo celular, entre otras. Los miembros son enumerados en orden ascendente con números arábigos y con las siglas KLF, desde KLF1 hasta KLF17 (T. Will 2015).

Estructura proteica general de KLFs

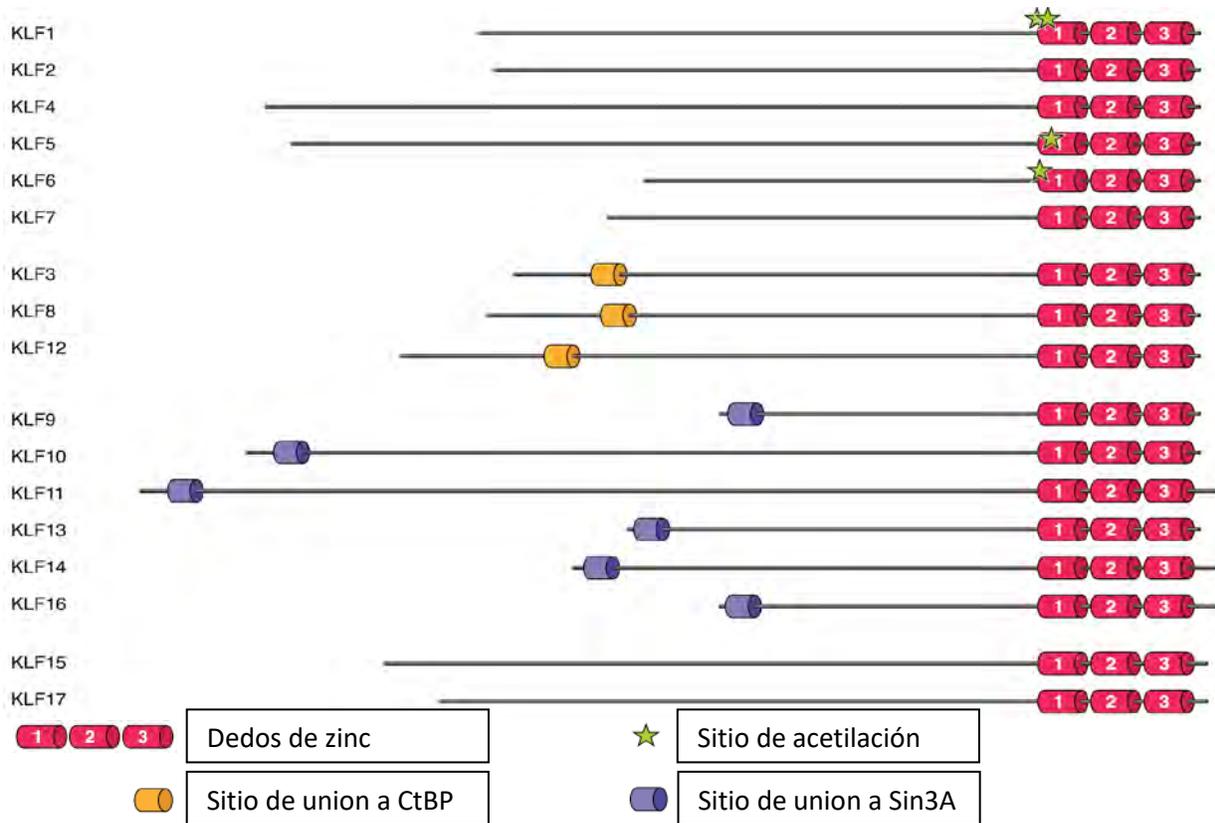


Figura 5. Representación de la estructura proteica de la familia KLF. Modificado de B. McConnell (2010).

Los KLF's se caracterizan por un dominio de unión a ADN altamente conservado, que está conformado por tres "dedos de zinc - Cys₂/His₂" que le permite plegarse en su estructura ββα, cada dedo de zinc coordina un ion zinc, los dos primeros dedos de zinc contienen 25 residuos mientras el último sólo 23, y cada uno de ellos es capaz de reconocer tres pares de bases por lo que los miembros de KLF interactúan con nueve pares de bases en total (Nagai, Friedman, & Kasuga, 2009). Este dominio está localizado en el carboxilo terminal y cada dedo de zinc está interconectado por una secuencia, altamente conservada en la familia, formada por siete aminoácidos: TGEKP(Y/F)X. Este dominio de dedos de zinc, contiene también señales de localización nuclear de los KLF's 1, 4, 6, 8 y 11, específicamente para KLF4

una región inmediatamente adyacente a los dedos de zinc es la encargada de la localización nuclear.

La familia de KLF's comparte similitud en los dedos de zinc con la familia Specificity proteins (SP) por lo que algunos autores agrupan ambas familias como SP/KLF siendo todos factores de transcripción. La familia SP contiene en la región aminoterminal una caja llamada "Bottomhead (BTD)" con la secuencia consenso: CXCPXC y la cual es la principal distinción entre KLF y SP. En general, fuera de los dedos de zinc, hay poca similitud entre estas dos familias de factores de transcripción (Suske, Bruford, & Philipsen, 2005).

Fuera de la región de los dedos de zinc existe una menor similitud entre los miembros de la familia KLF, es decir, la región del amino terminal produce las diferencias entre los miembros. Este mismo dominio brinda la posibilidad de reclutar co-activadores, co-represores y modificadores que se reflejan en una variedad funcional y especificidad de los KLF's. A través de la identificación de los patrones donde puede haber unión a otras proteínas se han caracterizado subgrupos de KLF's y se ha auxiliado en la identificación de la función particular de cada miembro de la familia. Por ejemplo, KLF3 y KLF8, comparten un dominio en el amino terminal con una secuencia de 74 aminoácidos, dentro de la cual hay una secuencia consenso: PXDLS, que es capaz de unirse a "C-terminal amino binding protein (CtBP)", que es un co-represor transcripcional. Esta interacción le da a los KLF's 3, 8 y 12 su actividad como potenciales represores transcripcionales (McConnell & Yang, 2010).

Existe otro dominio que también ha auxiliado en la clasificación de los KLF's, el dominio de interacción a Sin3A (SID) cuya secuencia consenso es AA/VXXL y produce un plegamiento tipo α -hélice altamente hidrofóbico donde se da la interacción con Sin3A que es un co-represor. De este modo se han agrupado KLF's 9, 10, 11, 13, 14, y 16. KLF1 también recluta a Sin3A, pero

no tiene SID, lo hace a través de un dominio en el carboxilo terminal en los dedos de zinc (McConnell & Yang, 2010).

Ya se han mencionado, un dominio para unirse específicamente a secuencias de ADN y un dominio que ayuda a regular la expresión de genes, algunos miembros de la familia de KLF's también son capaces de reclutar modificadores de cromatina, cofactores, maquinaria de transcripción para los promotores de los genes específicos a los que se unen y sufrir modificaciones postraduccionales.

Modificaciones Postraduccionales de KLFs

Existen varias modificaciones postraduccionales para KLF, estas modificaciones permiten que los factores de transcripción lleven a cabo sus actividades, a continuación, se describen algunas modificaciones que repercuten en las actividades de la familia de los KLF.

KLF1 puede reclutar la maquinaria p300/CBP, que tiene actividad de acetiltransferasa, produciendo modificaciones en K288 y K302 de KLF1, mientras la acetilación de K288 está asociada a su transactivación, la acetilación en K302, es necesaria para la interacción de KLF1 con el represor transcripcional Sin3A, este último tiene capacidad de reclutar metiltransferasas, demetilasas, acetilasas, entre otras, que a través de la remodelación de la cromatina pueden reprimir o promover la expresión de un gen (McConnell & Yang, 2010).

La fosforilación juega un papel como regulador de la actividad transcripcional de algunos KLF's. Se sabe que la fosforilación de ciertos residuos de serina y treonina en KLF1 aumentan la transcripción de los genes asociados a este factor. En KLF5 la fosforilación/desfosforilación proporciona cambios estructurales que afectan la unión a las proteínas efectoras que suele

reclutar. En KLF13 la fosforilación incrementa su localización nuclear y activa la transcripción del gen *CCCL5*, en contraste, KLF11 sufre fosforilación por señalización extracelular y esta rompe la unión con Sin3A reprimiendo el gen *Smad7* (McConnell & Yang, 2010).

Otra modificación posttraduccional, la ubiquitinación de algunos miembros de KLF's señaliza para degradar proteínas cuando están poliubiquitinadas o se altera la función de las proteínas cuando están monoubiquitinadas. La ubiquitinación de KLF1 produce su acumulación por la inhibición del complejo que la degrada. Los niveles de KLF4 y KLF6 también son regulados por ubiquitinación, KLF4 produce arresto del ciclo celular y es inhibido vía ubiquitinación para que el ciclo celular continúe, por otro lado KLF6 auxilia para decidir entre arresto del ciclo celular o muerte, dependiendo del daño en ADN (Banck et al., 2006; Sun et al., 2014). Estos son sólo algunos eventos de la ubiquitinación en KLF's para demostrar los papeles que puede llevar a cabo. Existe también un rol de la ubiquitinación en otros miembros como KLF2, 5 y 10 (Xie et al., 2011).

Existe un proceso conocido como sumoilación, que es una modificación en las proteínas llevada a cabo por "Small ubiquitin-like modifier (SUMO)", una pequeña proteína de unos 12 kDa la cual se une covalentemente a otras proteínas para modificarlas. La sumoilación de KLF3 compromete su capacidad represora, mientras en KLF8 evita que éste regule positivamente al promotor *CDN1*, disminuyendo la ciclina D1 y produciendo como consecuencia el arresto celular. KLF1 es regulado por sumoilación durante la diferenciación de los megacariocitos, ya que KLF1 está encargado de bloquear la señalización para esta diferenciación, la sumoilación de KLF1 inhibe su actividad represora en la megacariopoesis. KLF5 tiene una función de interruptor de la transcripción de genes encargados de la oxidación de lípidos, forma parte del complejo de

represión cuando esta sumoilado y en caso de perder esta marca, permite la transcripción de estos genes (Du, Bialkowska, McConnell, & Yang, 2008).

Con lo anterior mencionado se puede observar la variedad de funciones en las que están involucrados a nivel molecular los miembros de la familia de KLF's así como sus distintas funciones en base a modificaciones postraduccionales.

A nivel celular estos factores de transcripción participan en proliferación, crecimiento, apoptosis, metabolismo, su pervivencia, respuesta a estrés externo, diferenciación celular, entre otras.

De vital importancia en estados homeostáticos, y por consecuencia, es punto clave entender que pasa con estos factores en estados de enfermedad. Se han descrito algunas características de los miembros de KLF en enfermedades de tipo cardíaco, del sistema digestivo, en patologías de tejido muscular, en el sistema hematopoyético, en el sistema respiratorio, en el sistema inmune, y entre otras, el cáncer. El presente estudio se centró en los miembros KLF5 y KLF6 en cáncer de pene, a continuación, se muestra un contexto de estos factores de transcripción en cáncer.

KLF5

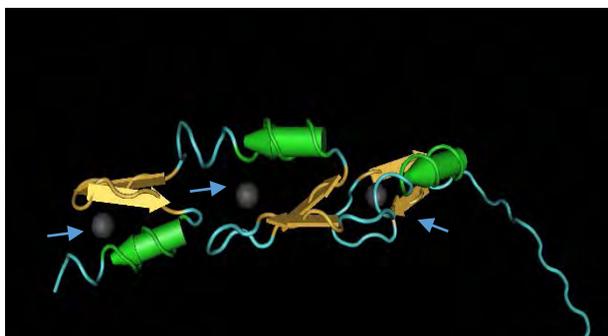


Figura 6. Nagashima, T. (2008). Representación de los dominios de dedos de zinc de KLF5 (flechas azules), muestra el rango de 363 a 457 de los residuos. Recuperado de <http://www.rcsb.org/pdb>.

En ocasiones la literatura utiliza los sinónimos BTEB2, IKLF o CKLF, aunque el título estandarizado es KLF5. Este gen se encuentra en el cromosoma 13 en el locus q21 (Kaczynski *et al.*, 2003), comprende 18.5 kb y está compuesto por 4 exones (Dong y Cheng, 2009).

Codifica para un transcrito de 3350 nts, con 324 de 5'-UTR, 1652 pb 3'-UTR y un marco de lectura abierto de 1374 pb, se transcribe a un polipéptido de ~466 aa conteniendo 3 dominios dedos de zinc hacia su C-terminal (Figura 6). Tiene afinidad por la secuencia CACCC 2 (Dang, Pevsner, & Yang, 2000). Sus mayores niveles de expresión se encuentran en el intestino, a diferencia de KLF4/GKLF que tiene una expresión en células lumbinales de epitelio intestinal, este se expresa primordialmente en las células de la cripta, siendo su expresión complementaria con KLF4 en este epitelio (Dang *et al.*, 2000), estando también presente en distintos tejidos como lo son la epidermis, endotelio vascular, tejido adiposo blanco (McConnell & Yang, 2010). Se ha propuesto como un mediador de la respuesta a estímulos mitóticos (Dang *et al.*, 2000). Teniendo como blanco distintos genes relacionados a la proliferación celular como la ciclina D1, ciclina B1, factor de crecimiento derivado de plaquetas α (PDGF α) y proteína de unión al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-BP), a su vez puede reprimir la expresión de genes como p27 y p15 (McConnell & Yang, 2010) promoviendo la proliferación, involucrado al igual que KLF4 en la regulación de inmunomoduladores como lo son miembros de la familia PSG entre otros.

KLF5 en neoplasias.

En cáncer el estudio ha sido amplio y diferentes patrones de expresión han sido descritos, teniendo diferencias según el tipo de cáncer y el estadio.

Estas alteraciones han sido escritas en cáncer de mama, cérvix, esófago, intestino, pulmón, nasofaríngeo, estómago, páncreas, próstata, tumor estromal gastrointestinal, leucemia y melanoma, para algunos de ellos se ha explorado la actividad a nivel molecular descubriendo variadas vías de intervención para este factor de transcripción (Limame, Op de Beeck, Lardon, De Wever, & Pauwels, 2013; Tetreault *et al.*, 2013).

En tumores gastrointestinales las mutaciones más frecuentes se encuentran en HRAS y KRAS, estos a su vez tienen como blanco final a KLF5, se ha reportado que, otra de las rutas que se ve alterada, es la ruta WNT, activando a KLF5, y este a su vez regula la expresión de β -Catenina (Bialkowska, Crisp, Bannister, & Screening, 2011), en biopsias se encuentra mayor expresión en tejido malignizado que en aquellos normales (Kwak et al., 2008).

En tejido normal del colon se aprecia la expresión de KLF5 en la parte correspondiente a las células de la cripta, mientras que en cáncer de colon se puede observar la expresión en todo el epitelio, esto soportando que KLF5 actúa como un inductor de la proliferación celular. De las vías reportadas de KLF5 en cáncer de colon es la relacionada con β -Catenina, la sobre expresión de ácido lipofosfatídico estimula la expresión de KLF5 que interactúa con β -Catenina activándola y localizándola en núcleo promoviendo la transcripción de genes como c-MYC y ciclina D1 (Lin, Wani, Whitsett, & Wells, 2010).

En cáncer de mama se ha observado que aquellos que son positivos a receptor de progesterona (PR) muestran también una mayor expresión de KLF5, y se ha reportado que KLF5 es una molécula blanco en la vía del PR. KLF5 promueve el ciclo celular en cáncer de mama PR+ a través de la regulación de genes como ciclina A, CDT1 y E2F3 (Liu, Zhou, Zhao, & Chen, 2011), también se ha reportado promueve la expresión de factor de crecimiento de fibroblastos (Zheng et al., 2009). Además, se ha demostrado que en general mantiene una alta tasa de expresión en comparación con su contraparte normal.

En cáncer pancreático (CaPa) se ha reportado una sobre expresión de KLF5, sin embargo, esta neoplasia no se encuentra regulada por la vía KRAS/RAF/MAPK/ERK, que es una de las rutas alteradas más frecuentemente, en este tejido KLF5 se vio regulado directamente por IL-1 β , p38 y por el factor

inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α) y se encontró regulando genes como la survivina (BIRC5) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)(A. Mori et al., 2009).

En cáncer de endometrio se pudo observar en datos de microarreglos de expresión que KLF5 aumenta su expresión en tejido malignizado con respecto al tejido normal (Simmen et al., 2010).

KLF5 ha sido identificado con sobreexpresión tanto en tejido tumoral como en líneas celulares de pulmón, además un knockdown generó una disminución de la proliferación celular, es decir que KLF5 actúa como oncogén en cáncer de pulmón (Q. Li et al., 2014).

En cáncer cervical KLF5 fue reportado con sobreexpresión, proponiéndolo como marcador de diagnóstico y pronóstico por su comportamiento homogéneo en los tumores malignos del epitelio cervical, el mismo trabajo propone que no hay una relación entre la alteración de KLF5 y el VPH (Marrero-Rodríguez et al., 2014).

KLF6



Figura 7. Nagashima, T. (2008). Representación de los dominios de dedos de zinc de KLF6, muestra el rango de 178 a 282 de los residuos. Recuperado de <http://www.proteinmodelportal.org>

Aunque el nombre oficial por la HUGO es KLF6 es posible encontrar los siguientes sinónimos: ZF9 (Zinc-finger transcription factor-9), CPBP (Core promoter binding protein), GBF (G-box binding factor), entre otros.

Este gen se encuentra en el cromosoma 10 en el locus p15 (Kaczynski, Cook, & Urrutia, 2003a), el gen se compone por 4 exones separados

por tres intrones (Andreoli et al., 2010). Puede dar lugar a 9 isoformas de las cuales solo 3 se han aislado *in vivo*.

La isoforma normal o "wild type" (wtKLF6) codifica para un péptido de ~283 aa, las isoformas 1 (KLF6-SV1) y 2 (KLF6-SV2) pierden una porción del exón 2, KLF6-SV1 codifica un péptido de 195 aa, KLF6-SV2 codifica para 241 aa mientras que la isoforma 3 (KLF6-SV3) pierde el exón 3 por completo y codifica un péptido de 237 aa. El polimorfismo de nucleótido único (SNP) IVS1 -27G/A se ha relacionado con el aumento en el corte y empalme alternativo y generación de KLF6-SV1, también se ha asociado la presencia de este polimorfismo con la generación de un sitio blanco para SRp40 que es un factor de splicing en cáncer de próstata (G. Narla, 2005).

Su estructura se encuentra altamente relacionada con KLF7 (Dang et al., 2000). Tiene afinidad hacia las secuencias ricas en GT/GC y CACCC (D. Li et al., 2005). Se encuentra presente en una variedad de tejidos como lo son placenta, corazón, pulmón, hígado y páncreas. Se encuentra estrechamente relacionado a la expresión de distintos genes como lo son pregnancy-specific glycoprotein 5 (PSG5), colágeno α -1, el inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas p21^{CIP1} y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF β) así como sus receptores I y II entre otros (Andreoli et al., 2010; Dang et al., 2000).

KLF6 en neoplasias

KLF6 ha sido estudiado en varios tipos de cáncer: hueso, cerebro, mama, cabeza y cuello, intestino, hígado, pulmón, ovario, páncreas, próstata y estómago. KLF6 está involucrado en un amplio espectro de procesos, por lo que presenta un comportamiento heterogéneo en distintos tipos de cáncer

En cáncer hepático se reportó que disminuye la expresión de KLF6 con respecto al tejido normal, a su vez se observó la disminución en la expresión

de genes como p21^{CIP1} que es un inhibidor de quinasas de pendiente de ciclinas, y así también se observó un aumento en la expresión del antígeno de proliferación nuclear (PCNA) que promueve el ciclo celular de G1/S, así como la presencia de mutaciones inactivantes (Kremer-Tal et al., 2007).

En cáncer de próstata se reporta la disminución en general de la expresión de KLF6, su forma wtKLF6 presentaba una disminución en comparación de KLF6-SV1, la cual aumenta y aún más claro es este fenómeno en tejido metastásico (Goutham Narla et al., 2008), presenta también mutaciones que introducen un codón de paro en las regiones codificantes para el dominio de transactivación, por lo que la proteína queda trunca (G Narla et al., 2001), la pérdida de heterocigocidad es otro de los eventos frecuentes que inactiva a KLF6 en cáncer de próstata (Bureau et al., 2009). El polimorfismo de nucleótido único (SNP) IVS1 -27G/A se ha relacionado con el aumento en el corte y empalme alternativo y generación de KLF6-SV1 aumentando así el riesgo de contraer cáncer de próstata (Goutham Narla et al., 2008), así mismo se ha asociado la presencia de este SNP con cáncer de pulmón (Spinola et al., 2007) entre otros. Se ha propuesto que la presencia de este SNP en el intrón 1 del gen, promueve la utilización de sitios críticos de corte y empalme alternativo en el exón 2, promoviendo así la generación del transcrito KLF6-SV1 preferentemente en comparación del KLF6wt (DiFeo et al., 2006).

Por su lado en cáncer gástrico se han identificado 4 mutaciones que afectan la función de KLF6, estas mutaciones (S155R, P172T, S180K y R198K) las cuales se encuentran en el dominio de transactivación posiblemente afectando sitios de fosforilación mediados por GSK3 β (Y. G. Cho et al., 2005). Por su parte Sangodkar y col (2009) reporta a su vez 4 mutaciones (T179I, R198G, R71Q y S180L) de igual manera en el dominio de transactivación, LOH y disminución de la expresión de KLF6 en cáncer gástrico, teniendo como

consecuencia la disminución de p21^{CIP1} y el aumento de cMYC contribuyendo a la proliferación celular y carcinogénesis.

En cáncer de células no pequeñas de pulmón (NSCLC) se ha observado que wtKLF6 disminuye su expresión con respecto a tejido sano, sugiriendo que esto es un evento común en esta neoplasia, mientras que el aumento en la expresión de KLF6-SV1 se relaciona con una menor sobrevida y una resistencia a quimioterapia en los pacientes que la presentan (Sangodkar et al., 2009)

En cáncer de ovario disminuyó hasta en un 75% la expresión de KLF6 en comparación de su tejido normal, siendo en su mayoría por LOH, de igual manera se observó que wtKLF6 es la que sufre la drástica reducción mientras que KLF6-SV1 aumenta su expresión y muestra asociación con una pobre diferenciación del tejido, así como una resistencia a cis-platino (DiFeo et al., 2006).

4. Justificación

El cáncer es un problema de salud de alto impacto en la sociedad, desde todas las perspectivas representa una afectación severa. El CaPe, según el registro histopatológico de neoplasias malignas del año 2006, hubo en México 344 nuevos casos y 106 decesos. Estudios han demostrado que más del 90% de las personas afectadas con CaPe fallecen en los próximos 3 años si no tienen el tratamiento adecuado. Su estudio es relevante cuando se toman en cuenta las similitudes con otros tipos de cáncer de origen epitelial estratificado (cervico-uterino, cabeza y cuello), donde la neoplasia de células escamosas es el principal tipo generado y potencialmente son tejidos blanco para VPH.

El cáncer tiene un origen multifactorial, en los últimos años, amplios esfuerzos en investigaciones se han realizado en la búsqueda de aquellos

elementos biológicos involucrados en la transformación celular, como la infección por VPH de alto riesgo y la alteración de expresión de genes que puedan representar marcadores moleculares, resaltando entre estos los factores de transcripción, capaces de controlar el silenciamiento y la expresión de genes específicos. Krüppel-like factor (KLF) es una familia de factores de transcripción involucrados en diversos procesos celulares como proliferación, diferenciación, migración, inflamación y pluripotencialidad. La literatura reporta alteraciones de varios miembros de KLF en diferentes tipos de cáncer, pero hasta ahora no se han documentado alteraciones de KLF en cáncer de pene, por lo que es importante la caracterización molecular y celular de esta neoplasia.

El presente estudio generará conocimiento sobre la expresión proteica de KLF5 y KLF6, y potencialmente arrojará los indicios para marcadores que servirán para evaluar su diagnóstico y dilucidar si existe una desregulación de la expresión la cual influya en el desarrollo de la patología que pueda conducir a una personalización y optimización de los métodos de diagnóstico y las terapias de los pacientes.

5. Hipótesis

≡ Las células malignas de epitelio transformado de pene, mostrarán un patrón de expresión proteica diferente para KLF5 y KLF6, en comparación con lesiones benignas de prepucio.

6. Objetivos

Objetivo general

≡ Determinar el patrón de expresión a nivel proteico de los factores de transcripción Krüppel-like factors 5 y 6 en muestras de CaPe y en lesiones benignas de prepucio.

Objetivos particulares

- ≡ Analizar localización, morfología y diferenciación celular con respecto a la expresión de KLF5 y KLF6
- ≡ Comparar el patrón de expresión entre CaPe y lesiones benignas de prepucio para evaluar una posible alteración de KLF5 y KLF6 en la transformación celular.

7. Materiales y métodos

7.1. Recolección de tejido, análisis histológicos y preparación de laminillas histológicas

Se presenta un estudio descriptivo, experimental, transversal, y retrospectivo de la expresión proteica de KLF5 y KLF6 donde se colectaron en total 64 muestras de pene, los cuales se utilizaron para conformar el grupo problema (CaPe) y nuestro grupo control (lesiones benignas). Para el primer grupo se recolectaron 57 muestras de CaPe del banco de tejidos del Departamento de Patología del Hospital de Oncología, CMN, SX XI-IMSS. Mientras que nuestro grupo control se conformó de 7 tejidos de lesiones benignas de prepucio. Posteriormente se realizó la tinción hematoxilina-eosina para la confirmación histopatológica y selección de áreas representativas de la lesión, realizado por la Dra. Alejandra Mantilla, patóloga del Hospital de Oncología del CMN SXXI.

Todos los casos cuentan con confirmación y diagnóstico clínico-histopatológico.

En ambos casos los tejidos se encontraban embebidos en parafina para su conservación y se construyó un microarreglo de tejidos con las zonas representativas de las lesiones.

7.2. Construcción del arreglo de tejidos

La construcción del arreglo de tejidos fue realizada con los tejidos previamente embebidos en parafina. El arreglo de tejido fue realizado mediante el empleo del *Tissue-Arrayer ATA 100* de *chemicon*, siguiendo las instrucciones del equipo.

Fue preparado el *Tissue Arrayer* colocando dos agujas de punción, la donante y la receptora con una sección de 2 mm en la torreta. Fue localizada el área de interés en el bloque de tejido donante en parafina y fue construido un bloque de parafina en blanco, que fue utilizado como bloque receptor del arreglo de tejido. Fue colocado el bloque receptor en su receptáculo y fue seleccionado el punto de inicio en la posición cero para los dos micrómetros X y Y. Posteriormente fue realizada una perforación en el bloque receptor y retirado el cilindro blanco de parafina sobrante de la aguja receptora.

Así mismo, fue colocado el bloque donante en su receptáculo y fue perforada el área seleccionada, con la aguja del donante. Fue deslizado el receptáculo receptor hasta la posición de la aguja donante y fue colocado el cilindro de tejido donante en el orificio previo que fue efectuado en el bloque receptor. Se avanzó la torreta del *Tissue Arrayer* a una distancia de 3mm del orificio anterior haciendo una nueva perforación con la aguja de punción receptora y fueron repetidos los pasos anteriores sucesivamente, hasta completar la primera fila de orificios y oclusión con cilindros tisulares donantes en el bloque receptor. Fueron repetidos los pasos descritos para la segunda y siguientes filas. Hasta completar los arreglos de tejidos. Al terminar el arreglo este fue incubado en una estufa a 60°C durante 10 min. Para homogeneizar los posibles espacios creados en la parafina de los bloques receptores de los arreglos tisulares entre orificio receptor y orificio de tejido donante. Una vez terminado los arreglos fueron realizados los cortes histológicos de 4 micras, para realizar la inmunohistoquímica (IHQ).

7.3. Detección de las proteínas KLF5 y KLF6 por IHQ

La detección de la expresión de las proteínas KLF5 y KLF6 fue realizada mediante la técnica de inmunohistoquímica. Al arreglo de tejidos se le realizaron cortes de 4 μm , fueron incubados a 37°C toda la noche, posteriormente fue desparafinado y re-hidratado mediante una incubación a 60°C por 20 minutos seguido de dos baños de xilol 100% por 10 min. cada uno y baños en soluciones graduales de etanol 100% hasta agua. La exposición del antígeno fue realizada en una olla de presión utilizando un amortiguador de Tris-EDTA a pH 9, seguida de un lavado con agua bidestilada por 3 min. La detección de la proteína fue realizada mediante la técnica de Biotina/Estreptavidina amplificada (BSA), utilizando el protocolo de tinción de *DAKO Envision*. Para la detección de las proteínas KLF5 y KLF6, fueron utilizados los anticuerpos policlonales primarios anti-KLF5 y KLF6 (GTX103289, GTX81821; Genetex, CA, USA), a una dilución de 1:100 y 1:200 respectivamente. La incubación con el anticuerpo primario fue realizada por 12 hrs a 4°C, posteriormente fue realizada la contratinción con hematoxilina y finalmente fue colocado el cubre objetos con la resina Permount (Fischer). Como control positivo fue utilizado testículo con alta expresión para la proteína KLF5 y KLF6, así como fueron llevados a cabo los controles de reacción negativa, a estos tejidos fue dado el tratamiento previamente descrito, pero en vez de incubarse con el anticuerpo primario fueron incubados con albumina, esto para evitar falsos positivos (véase Apéndice). Las reacciones fueron evaluadas por 3 observadores independientes en distintos momentos, fueron considerados como negativos y positivos. Esto fue analizado utilizando un microscopio óptico a una amplificación de 20X.

8. Resultados y discusión de resultados

Se realizó la inmunodetección de KLF5 y KLF6 utilizando anticuerpos policlonales; ésta se llevó a cabo en el arreglo de tejidos conteniendo las muestras de los 2 grupos formados según el diagnóstico, CaPe y lesiones benignas de pene. Las muestras de CaPe se clasificaron por su grado de diferenciación para su estudio.

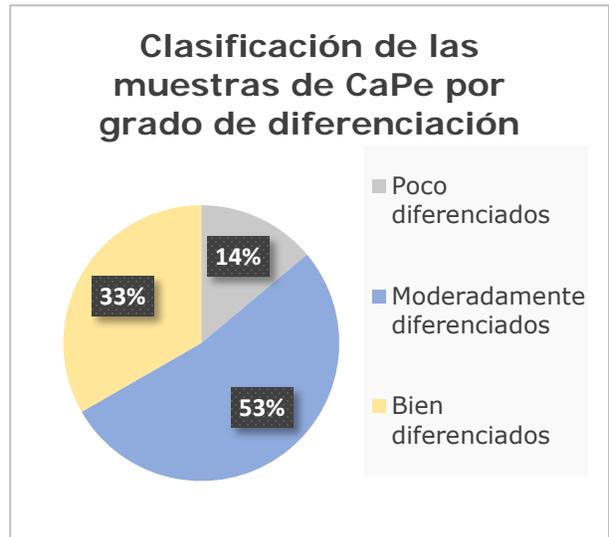


Figura 8. Grado de diferenciación en CaPe.

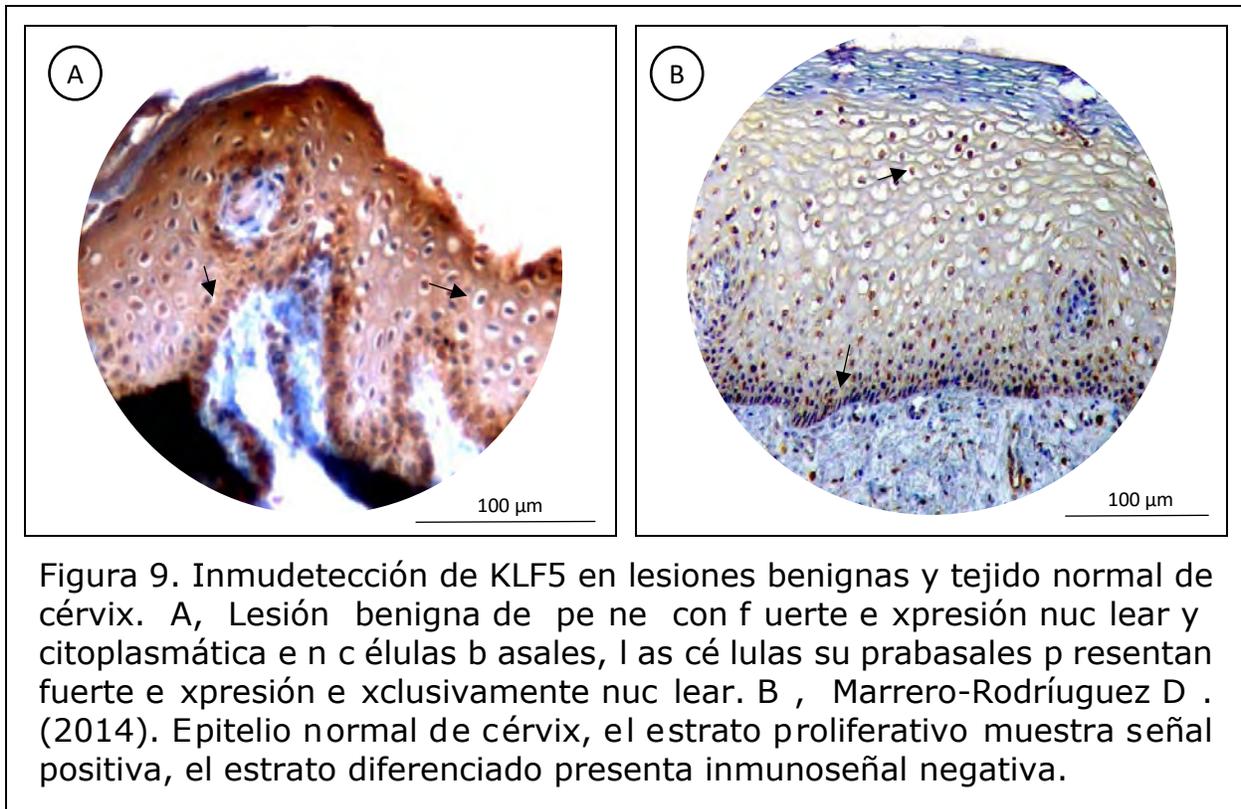
8.1. Inmudetección de KLF5 en CaPe y lesiones benignas de prepucio

El total de las muestras de CaPe correspondieron a carcinomas de células escamosas. En los carcinomas poco y moderadamente diferenciados (66.7% de total de muestras), todas las células epiteliales mostraron inmunoseñal positiva para KLF5 en núcleo y citoplasma. Por otro lado, los carcinomas bien diferenciados (33.3%) mostraron una mezcla con células inmunopositivas e inmunonegativas. El grupo de lesiones benignas presentaron un patrón homogéneo, donde el estrato basal tuvo una inmunoseñal fuerte, positiva en citoplasma y núcleo, los estratos superiores mostraron una señal positiva principalmente nuclear con citoplasmas visiblemente claros. A continuación, se muestra una tabla con el resumen de los resultados obtenidos.

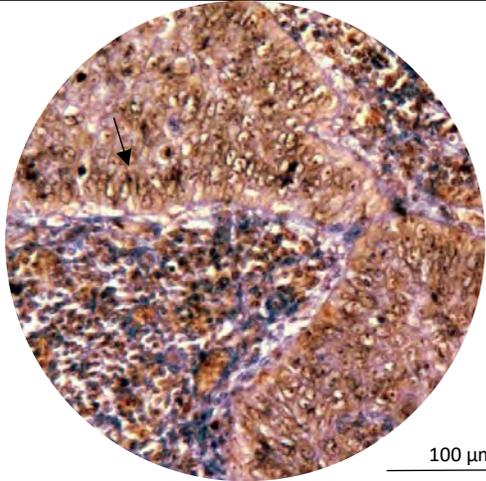
| Grado de diferenciación | Cantidad de muestras | | Expresión de KLF5 | |
|-----------------------------|--|-----------------------|-------------------|------------|
| | | | Núcleo | Citoplasma |
| Bien diferenciados | 12 CCE con mezcla de células con dos patrones de expresión | Patrón de expresión 1 | (+) | (+) |
| | | Patrón de expresión 2 | (-) | (-) |
| Moderadamente diferenciados | 19 CCE | | (+) | (+) |
| | 0 CCE | | x | x |
| Poco diferenciados | 5 CCE | | (+) | (+) |
| | 0 CCE | | x | X |
| Lesiones benignas | 7 Lesiones benignas de prepucio | | (+) | (-) |

Tabla 2. Resumen de resultados obtenidos por inmunodetección de KLF5 en Cape y lesiones benignas.

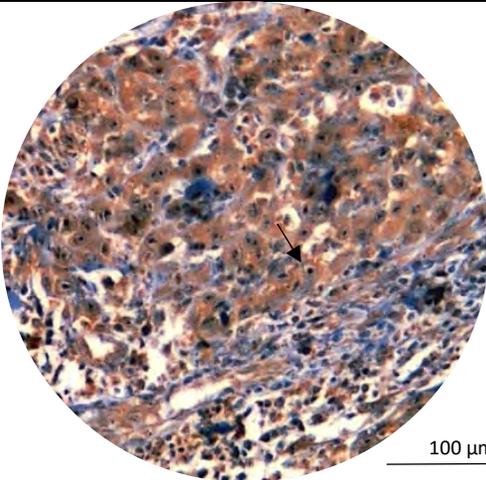
El epitelio cervical normal, tiene intensa expresión proteica de KLF5 en las células que se encuentran en constante división, el estrato parabasal tiene una expresión nuclear, mientras el estrato superficial con células más diferenciadas son negativas a KLF5. Las lesiones benignas analizadas en el presente estudio tienen un patrón de expresión proteica parecida al cérvix normal, las regiones basales que contienen células proliferativas, presentan una fuerte inmunoseñal positiva, las células en el estrato parabasal tienen una expresión exclusivamente nuclear.



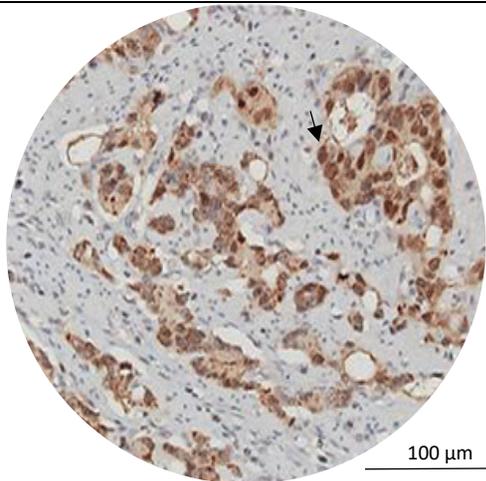
En cáncer el nivel de diferenciación en las células del parénquima es considerado un marcador de malignidad, así aquellos tumores poco diferenciados están asociados a mayor malignidad. El 66.7% de los tumores malignos de pene estudiados se clasificaron como poco o moderadamente diferenciados. Todos ellos mostraron un patrón homogéneo, donde se observó una considerable inmunoseñal positiva a KLF5 en citoplasma y una fuerte señal positiva en el núcleo, en todo el epitelio maligno. El cáncer epitelial glandular es el principal tipo en cáncer gástrico. Un estudio de la expresión de KLF5 realizado en Taiwan con 74 muestras, correlacionó una menor supervivencia con la expresión nuclear de KLF5 (Soon et al., 2011). CaPe y cáncer gástrico compartieron parte del patrón de expresión.



Micrografía de un carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado invasor de fascia. Las células conservan moderadamente la arquitectura del epitelio con una señal positiva nuclear y citoplásmica.



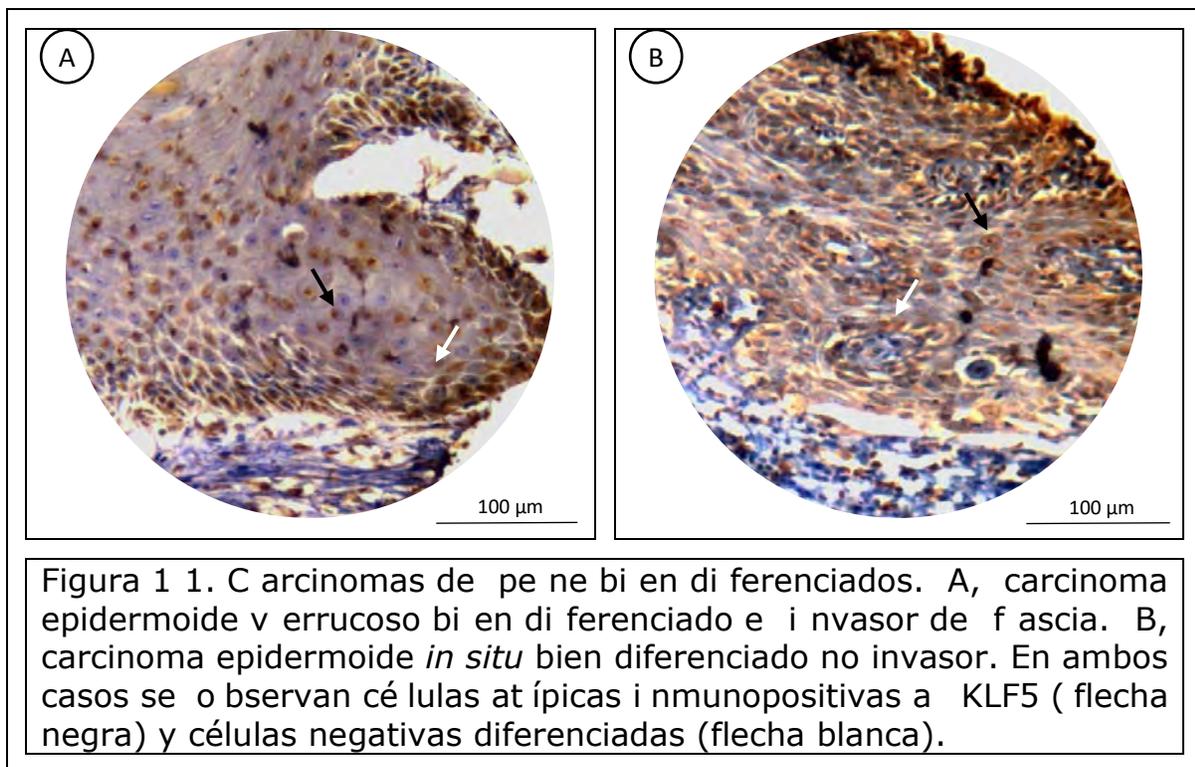
Carcinoma escamoso poco diferenciado. Los límites y arquitectura del epitelio se han perdido y la estructura celular es totalmente anaplásica. Las células tienen fuerte inmunoseñal positiva en núcleo y en menor proporción en citoplasma.



Adenocarcinoma gástrico. La inmunoseñal es nuclear y citoplásmica. La arquitectura difiere con CaPe ya que es un tumor epitelial glandular. Soon M. (2011).

Figura 10. Inmunodetección de KLF5 en carcinomas de baja diferenciación. Se presentan carcinomas poco y moderadamente diferenciados representativos de CaPe, y se compara con la expresión en adenocarcinoma gástrico PARA KLF5.

La literatura define a los tumores bien diferenciados por presentar células más parecidas a aquellas del tejido normal. Los tumores de CaPe más diferenciados mostraron un patrón celular, intratumoralmente, heterogéneo de expresión proteica de KLF5. Células atípicas con núcleos pleomórficos manifiestan una señal positiva a KLF5 en citoplasma y una fuerte señal positiva en núcleo. Por otro lado, a algunas células atípicas y otras más con morfología normal con conservada arquitectura y polaridad mostraron inmunoseñal negativa a la proteína.

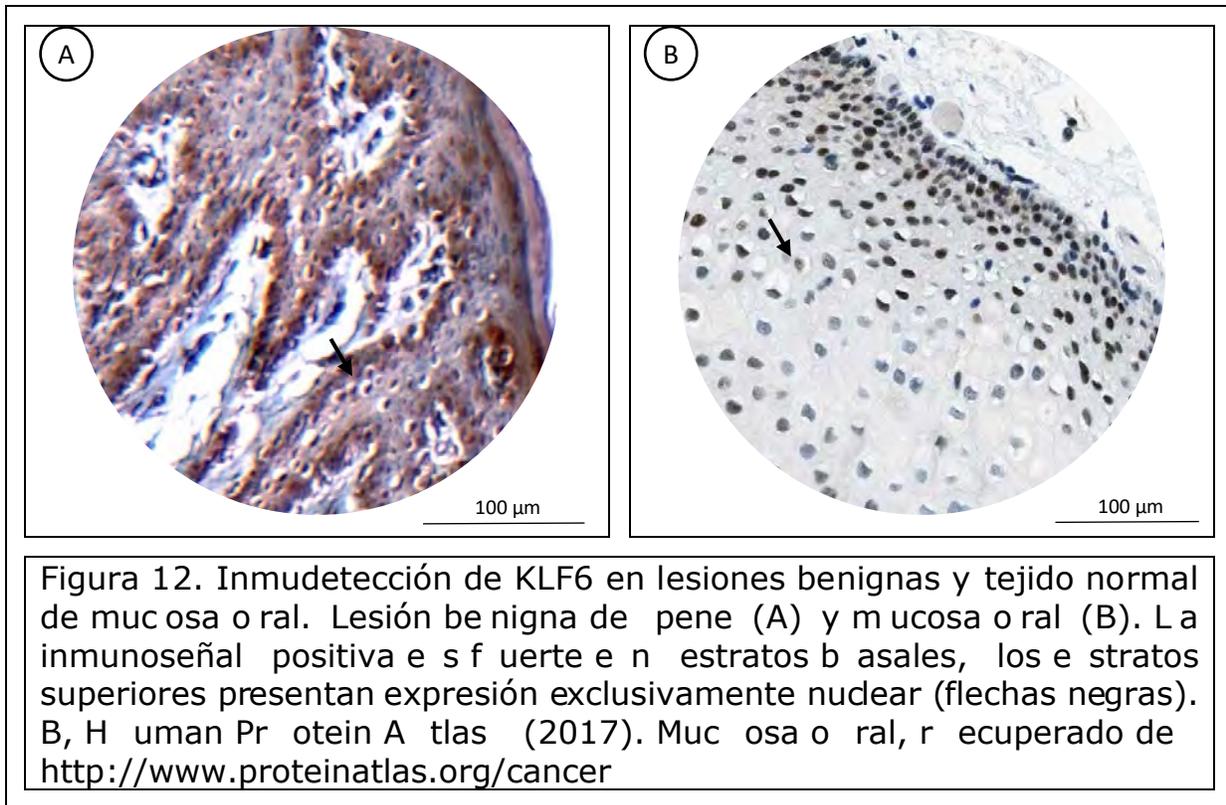


3.1. Inmudetección de KLF6 en CaPe y lesiones benignas de prepucio

KLF6 se expresa ubicuamente en los tejidos del ser humano, siendo un factor de transcripción, su localización es nuclear. Las lesiones benignas mostraron un comportamiento parecido a epitelios normales como mucosa oral y cérvix. Inmuseñal fuertemente positiva se muestra en las células basales del epitelio, por otro lado, la expresión exclusivamente nuclear está presente en estratos parabasales. A continuación, se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

| Grado de diferenciación | Cantidad de muestras | KLF6 | |
|-----------------------------|--|--------|------------|
| | | Núcleo | Citoplasma |
| Bien diferenciados | 4 CCE con mezcla de células mayoritariamente negativas | (-) | (-) |
| | 5 CCE | (+) | (+) |
| | 3 CCE | (+) | (-) |
| Moderadamente diferenciados | 6 CCE | (-) | (-) |
| | 13 CCE | (+) | (+) |
| Poco diferenciados | 2 CCE | (-) | (-) |
| | 3 CCE | (+) | (+) |
| Lesiones benignas | 7 Lesiones benignas de prepucio | (+) | (-) |

Tabla 3. Resumen de resultados obtenidos por inmunodetección de KLF6 en CaPe y lesiones benignas



En CaPe la inmunoseñal contra KLF6 fue heterogénea. Se observaron tumores con expresión principalmente nuclear, inmunoseñal positiva en núcleo y citoplasma, y tumores negativos a lo largo de los estratos con malignidad. Las muestras de CaPe presentaron en un 64% una inmunoseñal positiva principalmente nuclear y un 36% fueron negativas o mezcla de células mayoritariamente negativas. En otros tipos de cáncer epitelial como cáncer de piel y gástrico se han observado ambos casos, positivos y negativos a expresión proteica de KLF6 (Human Protein Atlas 2017).

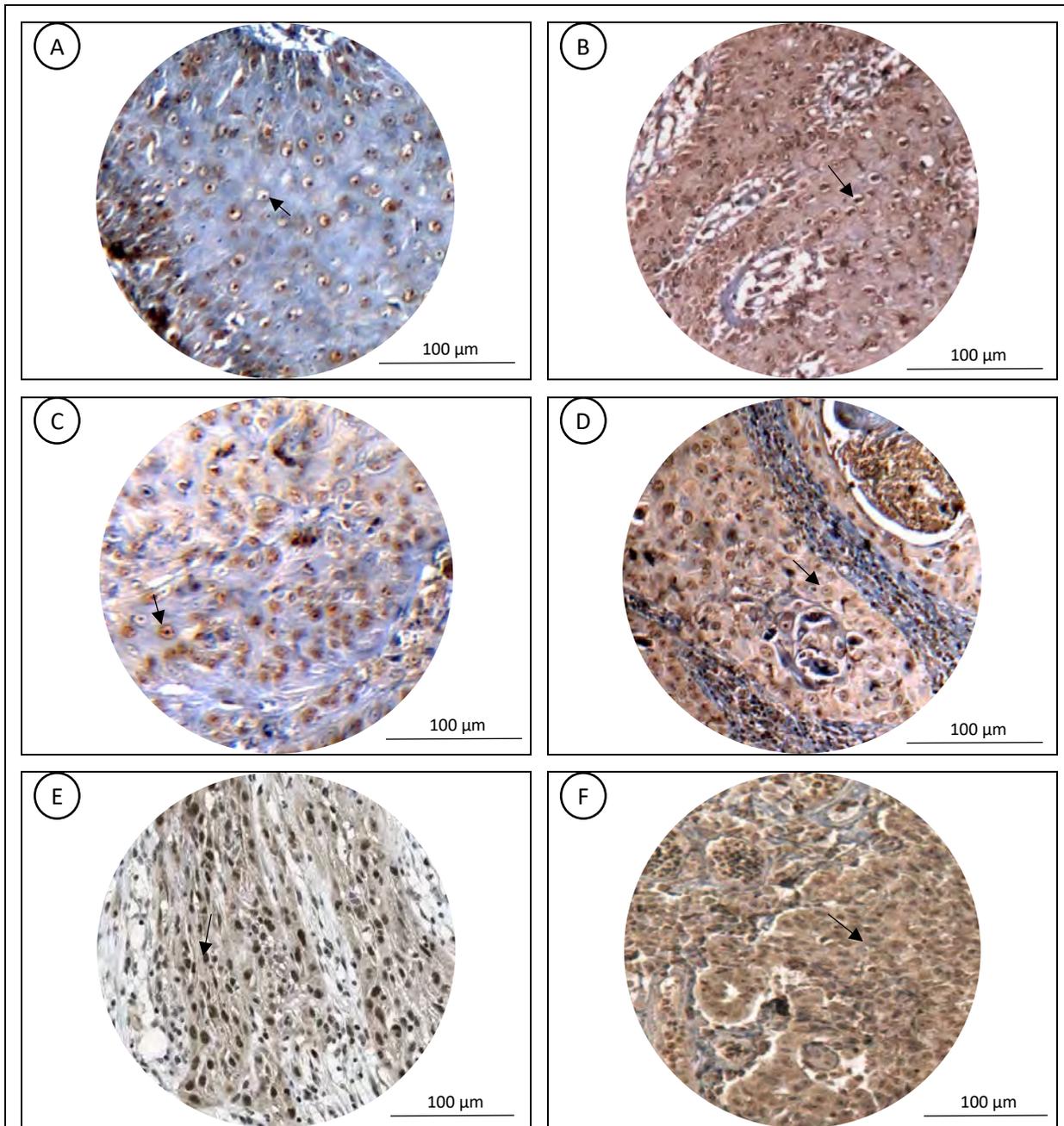


Figura 13. Inmunoseñal de KLF6 en diferentes muestras de CaPe. A y B, Carcinoma e pidermoide con expresión principalmente nuclear. C y D, carcinomas invasores poco diferenciados con fuerte señal positiva contra KLF6 en núcleo y menor intensidad en citoplasma. E, Human Protein Atlas (2017). Carcinoma de células escamosas de piel y cervix respectivamente con expresión de KLF6 en núcleo y citoplasma, recuperado de <http://www.proteinatlas.org/cancer>. F, Carcinoma de células escamosas de cervix con inmunoseñal positiva en núcleo y citoplasma. Marrero-Rodríguez D. (2014).

Los carcinomas de CaPe e estudiados con inmunoseñal negativa contra KLF6, tenían características histológicas variadas. Se incluían carcinomas con perlas de queratinización, con células atípicas pleomórficas, invasores, no invasores y carcinomas con células mayoritariamente negativas y esporádicas positivas a KLF6, así como carcinomas bien y poco diferenciados. La literatura reporta varios tumores epiteliales con casos negativos y positivos para la expresión proteica de KLF6, así como tumores con mezcla de células positivas y negativas.

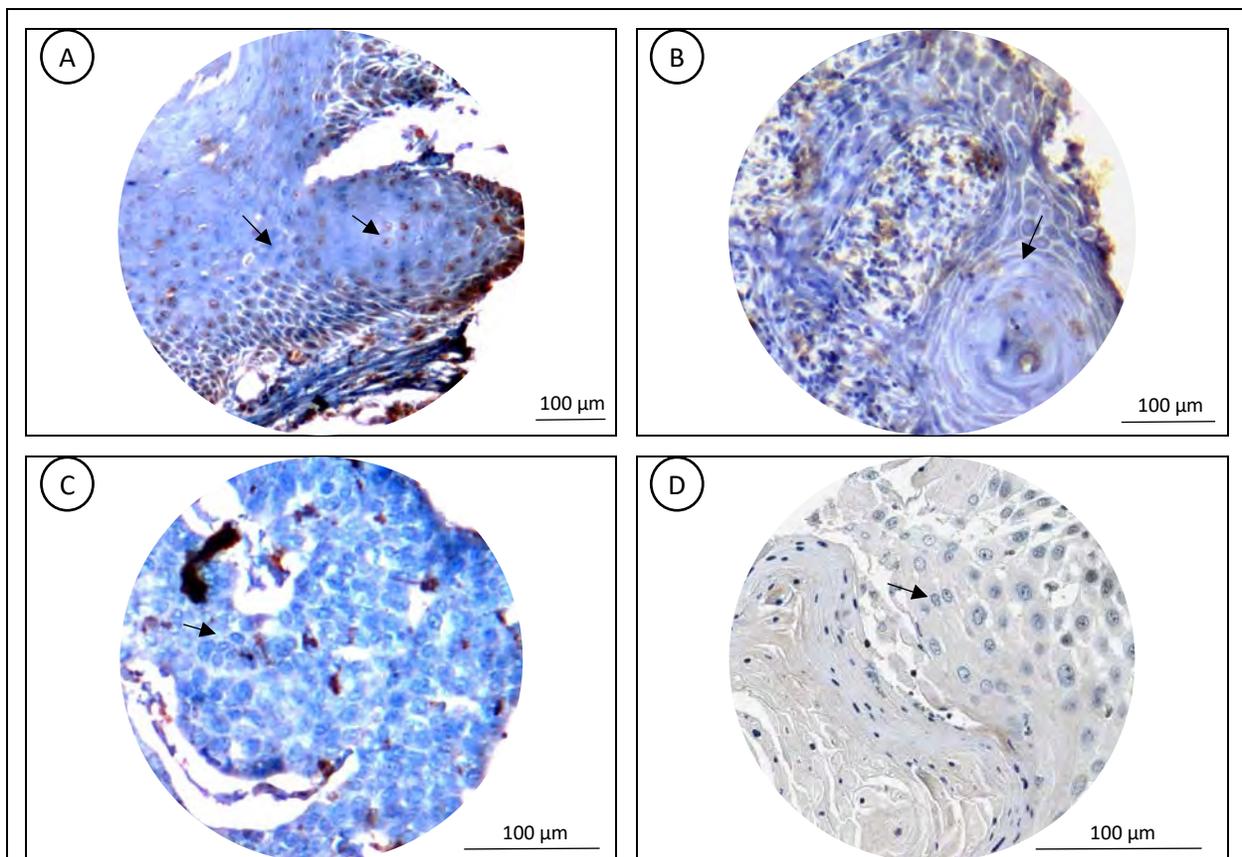


Figura 14. Carcinomas negativos a la proteína KLF6. A, Carcinoma epidermoide verrucoso bien diferenciado e invasor de fascia con una mezcla de células mayoritariamente negativas a KLF6. B, Carcinoma escamoso bien diferenciado no invasor con inmunoseñal negativa a KLF6. C, Carcinoma escamoso invasor poco diferenciado negativo a KLF6. D, Human Protein Atlas (2017). Carcinoma de células escamosas de piel con inmunoseñal negativa contra KLF6, recuperado de <http://www.proteinatlas.org/cancer>.

Los factores de transcripción juegan un papel importante en la adquisición y progresión del cáncer. Distintas vías de transducción de señales se encuentran alteradas en neoplasias culminando en eventos carcinogénicos con la activación de factores de transcripción y consecuente regulación de la expresión génica mediada por estos (Nerbert, 2002). Los factores de transcripción tipo Krüppel son una familia que comprende hasta el momento 17 miembros descritos, estos nombrados según su descripción cronológica (KLF1-KLF17), estos juegan un papel importante dentro de la biología celular ya que se encuentran involucrados en procesos como la proliferación celular, diferenciación celular, angiogénesis, apoptosis e inmunomodulación (Bureau et al., 2009). Así mismo se ha descrito la importancia de los miembros de la familia KLF dentro de la biología celular al regular distintos genes constitutivos con secuencias ricas en GC o GT y al competir por los elementos de respuesta en regiones promotoras reguladas por los miembros de la familia SP1 (Nagai et al., 2009).

Por su parte los miembros de la familia KLF de mayor objeto de estudio han sido los miembros KLF5 y KLF6 por su participación crucial dentro de la célula normal, así como en diversas patologías como el cáncer. Estos pueden actuar como elementos activadores o represores dependientes del contexto celular (Kaczynski, Cook, & Urrutia, 2003b).

Se asocia la expresión de KLF5 con células de alta tasa de proliferación en comparación con aquellas en proceso de diferenciación (Dong & Chen, 2009).

Se ha reportado la expresión de KLF5 en distintos tipos de neoplasias malignas como lo son cáncer de mama, en el cual se encontró una relación positiva con la agresividad y pobre diferenciación (Zheng et al., 2009), así como gástrico (Kwak et al., 2008; Soon et al., 2011), de páncreas (Akira Mori et al., 2009), esófago y vejiga (Chen et al., 2006) entre otros. La importancia

de la expresión de este factor de transcripción en neoplasias radica en la regulación de genes asociados a ciclo celular, angiogénesis, migración celular, diferenciación, inmunomodulación y resistencia a apoptosis, todas características del cáncer, además regula a otros miembros de la familia KLF como a KLF4 (Hanahan & Weinberg, 2011; McConnell & Yang, 2010). Lo anterior hace evidente el potencial papel que lleva a cabo KLF5 en la carcinogénesis, así pues, las alteraciones observadas a nivel proteico podrían perturbar los procesos mencionados durante el desarrollo tumoral.

Las muestras de CaPe menos diferenciados tuvieron basta presencia de KLF5 en núcleo y en poco menor proporción en citoplasma, a pesar de ser un factor de transcripción. La su modificación en los residuos 151 y 202 ha sido mostrada como una modificación posttraduccional necesaria para la localización nuclear de KLF5, mutaciones en estos residuos o lugares cercanos podrían alterar la localización de KLF5 (Du et al., 2008). Además, un análisis de hibridación genómica comparativa (CGH) demostró aberraciones en todos los cromosomas, las mutaciones en la región 13q21-22 fueron de las más comunes en el análisis (Alves et al., 2001), región donde se ubica el gen que codifica a KLF5.

KLF6 tiene interacciones con genes tales como c-Jun, p21 y p53 culminando en la alteración de procesos importantes para la carcinogénesis como apoptosis y arresto del ciclo celular.

La importancia de la expresión de KLF6 y sus isoformas radica en la regulación transcripcional y por consiguiente en la repercusión en las respectivas actividades celulares. KLF6 es capaz de interactuar con genes relacionados a ciclo celular como p21, ciclina D1, cMYC, p53, cJUN; genes asociados a invasión como MMP9, E-caderina; genes relacionados a apoptosis como DAPK2, NOXA, ATF3; a angiogénesis como VEGF, Endogлина, genes asociados a metabolismo como el receptor del factor de crecimiento parecido

a insulina (IGF1R); genes asociados a transporte de drogas como los genes de multiresistencia a drogas MDR1 y MDR3 así como genes asociados a inmunomodulación como TGF β , α -PI (DiFeo, Martignetti, & Narla, 2009).

El gen que codifica KLF6 puede dar origen a 4 transcritos por corte y empalme alternativo, siendo los más estudiados la forma silvestre KLF6wt y la variante 1 KLF6sv1, pudiéndose encontrar ambas isoformas tanto en tejido normal como en neoplasias siendo nuclear con presencia en citoplasma (DiFeo et al., 2009). En particular KLF6sv1 pierde precisamente la secuencia conocida como "señal de localización nuclear (NLS)", que se conserva en KLF6wt (Andreoli et al., 2010). Potencialmente este evento podría estar involucrado en aquellos carcinomas que mostraron expresión de KLF6 en núcleo y citoplasma. Además, la expresión de KLF6sv1 ha sido reportada con un aumento considerable en varios tumores malignos de glioblastoma, ovario, pulmón y carcinoma de próstata (Andreoli et al., 2010).

De igual manera se ha reportado que el 63% de los carcinomas colorectales presentan una expresión de KLF6, el mismo estudio muestra un 36% con expresión perdida o reducida de KLF6, un evento concordante con los resultados obtenidos (Y.-G. Cho et al., 2006). Además del empalme alterno, se ha reportado otras alteraciones capaces de alterar la expresión de KLF6: pérdida de heterocigosidad y el silenciamiento por hipermetilación del promotor. En ambos casos la expresión de KLF6 disminuye. Estas alteraciones han sido reportadas en líneas celulares o bien en tumores malignos colorectales, glioma astrocítico, carcinomas nasofaríngeos, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer epitelial de ovario, entre otros (DiFeo et al., 2009).

9. Conclusiones

∞ La expresión proteica de KLF5 y KLF6 es principalmente nuclear en lesiones benignas de prepucio.

∞ La expresión proteica de KLF5 se puede asociar al grado de diferenciación.

∞ No existe una relación de la expresión proteica de KLF6 con el grado de diferenciación o invasividad en CaPe.

∞ El patrón de expresión de KLF5 y KLF6 es diferente en lesiones benignas de prepucio y CaPe. Esto es indicador de que potencialmente estos factores de transcripción participan en el proceso carcinogénico.

10. Bibliografía

Alves, G., Heller, A., Fiedler, W., Campos, M. M., Claussen, U., Ornellas, A. A., & Liehr, T. (2001). Genetic imbalances in 26 cases of penile squamous cell carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *31*(1), 48–53. <http://doi.org/10.1002/gcc.1117>

Andreoli, V., Gehrau, R. C., & Bocco, J. L. (2010). Biology of Krüppel-like factor 6 transcriptional regulator in cell life and death. *IUBMB Life*, *62*(12), 896–905. <http://doi.org/10.1002/iub.396>

Banck, M. S., Beaven, S. W., Narla, G., Walsh, M. J., Friedman, S. L., & Beutler, A. S. (2006). KLF6 degradation after apoptotic DNA damage. *FEBS Letters*, *580*(30), 6981–6986. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.077>

Bialkowska, A. B., Crisp, M., Bannister, T., & Screening, U. (2011). Identification of Small-Molecule Inhibitors of the Colorectal Cancer Oncogene Krüppel-like Factor 5 Expression by Ultrahigh-Throughput Screening of Krüppel-like Factor 5 Expression by.

<http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0550>

Bureau, C., Hanoun, N., Torrisani, J., Vinel, J.-P., Buscail, L., & Cordelier, P. (2009). Expression and Function of Kruppel Like-Factors (KLF) in Carcinogenesis. *Current Genomics*, *10*(5), 353–360.

<http://doi.org/10.2174/138920209788921010>

Chen, C., Benjamin, M. S., Sun, X., Otto, K. B., Guo, P., Dong, X.-Y., ... Dong, J.-T. (2006). KLF5 promotes cell proliferation and tumorigenesis through gene regulation and the TSU-Pr1 human bladder cancer cell line. *International Journal of Cancer*, *118*(6), 1346–55.

<http://doi.org/10.1002/ijc.21533>

Cho, Y.-G., Choi, B.-J., Song, J.-W., Kim, S.-Y., Nam, S.-W., Lee, S.-H., ... Park, W.-S. (2006). Aberrant expression of krUppel-like factor 6 protein in colorectal cancers. *World Journal of Gastroenterology*, *12*(14), 2250–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16610031>

Cho, Y. G., Kim, C. J., Park, C. H., Yang, Y. M., Kim, S. Y., Nam, S. W., ... Park, W. S. (2005). Genetic alterations of the KLF6 gene in gastric cancer. *Oncogene*, *24*(28), 4588–4590.

<http://doi.org/10.1038/sj.onc.1208670>

Dang, D. T., Pevsner, J., & Yang, V. W. (2000). The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *32*(11–12), 1103–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11137451>

DiFeo, A., Martignetti, J. A., & Narla, G. (2009). The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy. *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, *12*(1–2), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.drug.2008.11.001>

DiFeo, A., Narla, G., Hirshfeld, J., Camacho-Vanegas, O., Narla, J., Rose, S.

- L., ... Martignetti, J. A. (2006). Roles of KLF6 and KLF6-SV1 in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(12), 3730–9. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0054>
- Dong, J.-T., & Chen, C. (2009). Essential role of KLF5 transcription factor in cell proliferation and differentiation and its implications for human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(16), 2691–2706. <http://doi.org/10.1007/s00018-009-0045-z>
- Du, J. X., Bialkowska, A. B., McConnell, B. B., & Yang, V. W. (2008). SUMOylation Regulates Nuclear Localization of Kruppel-like Factor 5. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31991–32002. <http://doi.org/10.1074/jbc.M803612200>
- Gao, Y., Ding, Y., Chen, H., Chen, H., & Zhou, J. (2015). Targeting Krüppel-like factor 5 (KLF5) for cancer therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(8), 699–713. <http://doi.org/10.2174/1568026615666150302105052>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*.
- Kaczynski, J., Cook, T., & Urrutia, R. (2003a). Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology*, 4(2), 206. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=151296&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kaczynski, J., Cook, T., & Urrutia, R. (2003b). Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology*, 4(2), 206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620113>
- Kremer-Tal, S., Narla, G., Chen, Y., Hod, E., DiFeo, A., Yea, S., ... Friedman,

- S. L. (2007). Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. *Journal of Hepatology*, 46(4), 645–54.
<http://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.10.012>
- Kwak, M. K., Lee, H.-J., Hur, K., Park, D. J., Lee, H. S., Kim, W. H., ... Yang, H.-K. (2008). Expression of Krüppel-like factor 5 in human gastric carcinomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 134(2), 163–7. <http://doi.org/10.1007/s00432-007-0265-2>
- Li, D., Yea, S., Dolios, G., Martignetti, J. A., Narla, G., Wang, R., ... Friedman, S. L. (2005). Regulation of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylation. *Cancer Research*, 65(20), 9216–25.
<http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1040>
- Li, Q., Dong, Z., Zhou, F., Cai, X., Gao, Y., & Wang, L. W. (2014). Krüppel-like factor 5 promotes lung tumorigenesis through upregulation of Sox4. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(1), 1–10.
<http://doi.org/10.1159/000356645>
- Limame, R., Op de Beeck, K., Lardon, F., De Wever, O., & Pauwels, P. (2013). Krüppel-like factors in cancer progression: three fingers on the steering wheel. *Oncotarget*, 5(1), 29–48. Retrieved from [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=1456&path\[\]=1783](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=1456&path[]=1783)
- Lin, S.-C. J., Wani, M. A., Whitsett, J. A., & Wells, J. M. (2010). Klf5 regulates lineage formation in the pre-implantation mouse embryo. *Development (Cambridge, England)*, 137(23), 3953–63.
<http://doi.org/10.1242/dev.054775>
- Liu, R., Zhou, Z., Zhao, D., & Chen, C. (2011). The induction of KLF5 transcription factor by progesterone contributes to progesterone-induced breast cancer cell proliferation and dedifferentiation. *Molecular*

Endocrinology (Baltimore, Md.), 25(7), 1137–44.
<http://doi.org/10.1210/me.2010-0497>

Marrero-Rodríguez, D., Taniguchi-Ponciano, K., Jimenez-Vega, F., Romero-Morelos, P., Mendoza-Rodríguez, M., Mantilla, A., ... Salcedo, M. (2014). Krüppel-like factor 5 as potential molecular marker in cervical cancer and the KLF family profile expression. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(11), 11399–407. <http://doi.org/10.1007/s13277-014-2380-4>

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

Mori, A., Moser, C., Lang, S. A., Hackl, C., Gottfried, E., Kreutz, M., ... Stoeltzing, O. (2009). Up-Regulation of Kruppel-Like Factor 5 in Pancreatic Cancer Is Promoted by Interleukin-1 Signaling and Hypoxia-Inducible Factor-1. *Molecular Cancer Research*, 7(8), 1390–1398.
<http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0525>

Mori, A., Moser, C., Lang, S. A., Hackl, C., Gottfried, E., Kreutz, M., ... Stoeltzing, O. (2009). Up-regulation of Krüppel-like factor 5 in pancreatic cancer is promoted by interleukin-1beta signaling and hypoxia-inducible factor-1alpha. *Molecular Cancer Research: MCR*, 7(8), 1390–8. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0525>

Nagai, R., Friedman, S. L., & Kasuga, M. (2009). *The biology of Kruppel-like factors. The Biology of Kruppel-like Factors*. <http://doi.org/10.1007/978-4-431-87775-2>

Narla, G. (2005). A Germline DNA Polymorphism Enhances Alternative Splicing of the KLF6 Tumor Suppressor Gene and Is Associated with Increased Prostate Cancer Risk. *Cancer Research*, 65(4), 1213–1222.
<http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4249>

- Narla, G., DiFeo, A., Fernandez, Y., Dhanasekaran, S., Huang, F., Sangodkar, J., ... Martignetti, J. A. (2008). KLF6-SV1 overexpression accelerates human and mouse prostate cancer progression and metastasis. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(8), 2711–21. <http://doi.org/10.1172/JCI34780>
- Narla, G., Heath, K. E., Reeves, H. L., Li, D., Giono, L. E., Kimmelman, a C., ... Friedman, S. L. (2001). KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5551), 2563–2566. <http://doi.org/10.1126/science.1066326>
- Sangodkar, J., DiFeo, A., Feld, L., Bromberg, R., Schwartz, R., Huang, F., ... Narla, G. (2009). Targeted reduction of KLF6-SV1 restores chemotherapy sensitivity in resistant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *66*(3), 292–7. <http://doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.02.014>
- Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Côté, S., Preiss, A., Maier, D., ... Kemler, R. (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Krüppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell*, *47*(6), 1025–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096579>
- Simmen, R. C. M., Pabona, J. M. P., Velarde, M. C., Simmons, C., Rahal, O., & Simmen, F. A. (2010). The emerging role of Krüppel-like factors in endocrine-responsive cancers of female reproductive tissues. *The Journal of Endocrinology*, *204*(3), 223–31. <http://doi.org/10.1677/JOE-09-0329>
- Soon, M.-S., Hsu, L.-S., Chen, C.-J., Chu, P.-Y., Liou, J.-H., Lin, S.-H., ... Yeh, K.-T. (2011). Expression of Kruppel-like factor 5 in gastric cancer and its clinical correlation in Taiwan. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, *459*(2), 161–166. <http://doi.org/10.1007/s00428-011-1111-0>

- Spinola, M., Leoni, V. P., Galvan, A., Korsching, E., Conti, B., Pastorino, U., ... Dragani, T. A. (2007). Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis of lung cancer risk detects the KLF6 gene. *Cancer Letters*, *251*(2), 311–6. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.11.029>
- Sun, Y., Zheng, B., Zhang, X., He, M., Guo, Z., & Wen, J. (2014). PPAR- γ agonist stabilizes KLF4 protein via activating Akt signaling and reducing KLF4 ubiquitination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *443*(2), 382–388. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.129>
- Suske, G., Bruford, E., & Philipson, S. (2005). Mammalian SP/KLF transcription factors: Bring in the family. *Genomics*, *85*(5), 551–556. <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.01.005>
- Tetreault, M. P., Yang, Y., & Katz, J. P. (2013). Kruppel-like factors in cancer. *Nature Reviews: Cancer*, *13*(10), 701–713. <http://doi.org/10.1038/nrc3582>
- Thomas, M. C., & Chiang, C.-M. (2006). The General Transcription Machinery and General Cofactors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(3), 105–178. <http://doi.org/10.1080/10409230600648736>
- Xie, P., Tang, Y., Shen, S., Wang, Y., Xing, G., Yin, Y., ... Zhang, L. (2011). Smurf1 ubiquitin ligase targets Kruppel-like factor KLF2 for ubiquitination and degradation in human lung cancer H1299 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *407*(1), 254–9. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.016>
- Zheng, H.-Q., Zhou, Z., Huang, J., Chaudhury, L., Dong, J.-T., & Chen, C. (2009). Kruppel-like factor 5 promotes breast cell proliferation partially through upregulating the transcription of fibroblast growth factor binding protein 1. *Oncogene*, *28*(42), 3702–13. <http://doi.org/10.1038/onc.2009.235>

11. Apéndice

A. Como control positivo se realizó la inmunohistoquímica en tejido de testículo con alta expresión de KLF5 y KLF6. El control negativo fue tejido epitelial con el anticuerpo primario intercambiado por albúmina. A continuación, se muestran las micrografías.

