



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La inducción de la expresión de HIF-1 por hipoxia e inflamación correlaciona positivamente con la expresión de CCR6 en Linfoma no Hodgkin.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Anel Anaid Rivas Ramos

TUTOR PRINCIPAL

Leticia Rocha Zavaleta
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Guillermina Juliana Baay Guzmán
Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, HIMFG

María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Enero, 2020



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.

Resumen

Se ha reportado que tanto HIF-1 como CCR6 se encuentran sobre expresados en los diferentes tipos de linfoma no Hodgkin (LNH) y, además, se encuentran asociados al desenlace clínico. Estudios previos demostraron que HIF-1 regula de manera transcripcional la expresión de CCL20. Nuestro grupo de trabajo realizó un análisis bioinformático el cual mostró que el promotor de CCR6 contiene sitios de unión potenciales para HIF-1. Lo cual sugiere que HIF-1 también podría estar regulando la expresión de este receptor. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la activación de HIF-1 mediante condiciones de hipoxia o en presencia de citocinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF- α , puede inducir la expresión de CCR6 en células de LNH pediátrico.

Para lo cual, se evaluó en estudios *in vitro* si la activación de HIF-1 correlaciona positivamente con la expresión de CCR6 en células de LNH pediátrico. Para ello utilizamos la línea celular Ramos (LNH pediátrico), las cuales fueron sometidas a dos diferentes modelos experimentales de activación de HIF-1. El primero consistió en cultivar las células en condiciones de normoxia e hipoxia en diferentes tiempos. El segundo consistió en tratar a las células con diferentes concentraciones de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β . En ambos modelos experimentales se evaluó la expresión proteica de HIF-1 α y de CCR6 mediante ensayos de inmunocitoquímica, así como la expresión relativa del RNA mensajero de *ccr6* mediante PCR tiempo real. Finalmente se evaluó la expresión de HIF-1 α en un microarreglo de tejidos de pacientes con diferentes tipos de LNH pediátrico mediante ensayos de inmunohistoquímica y patología digital.

Los resultados demostraron que, en condiciones de hipoxia, la expresión nuclear de HIF-1 α incrementa significativamente desde las 3 h y en el caso de CCR6 desde las 6 h, de manera importante la expresión de ambas proteínas correlaciona de manera positiva ($p < 0.001$, $r = 0.9552$). Los resultados de la expresión de la proteína fueron consistentes con los resultados obtenidos cuando el mRNA de *ccr6* fue evaluado, pues nuevamente en condiciones de hipoxia a las 3 h se observó un aumento significativo del gen en comparación con las células cultivadas en normoxia. En el caso de los tratamientos con las citocinas proinflamatorias, encontramos que el tratamiento con IL-1 β a partir de 5 ng/mL promueve un aumento tanto de la expresión nuclear de HIF-1 α como de CCR6. Mientras que para el caso del estímulo con TNF- α , se indujo un aumento de ambas proteínas desde el tratamiento con 20 ng/mL de dicha citocina. De manera interesante, se observó que el tratamiento de las células Ramos con ambas citocinas proinflamatorias existe una correlación positiva entre la expresión de HIF-1 α y CCR6 ($p = 0.0233$, $r = 0.9272$ para el caso de IL-1 β y $p = 0.0462$ y $r = 0.9538$ para el caso de TNF- α). De manera interesante, la expresión de HIF-1, evaluada en pacientes con LNH pediátrico, demostró que este factor de transcripción se encuentra elevado en dos de los tipos más agresivos.

Los resultados en conjunto sugieren que la activación de HIF-1 podría estar regulando positivamente la expresión del receptor CCR6, y que la expresión de HIF-1 puede ser un marcador de agresividad en LNH pediátrico.

Abreviaturas

ACS	American Cancer Society
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
BCL	Linfoma de células B
CDDP	Cisplatino
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDHB	Etil-3,4-dihidroxibenzoato
ERH	Elementos respondedores a hipoxia
HE	Hematoxilina-Eosina
HIF-1	Factor inducible en hipoxia 1
HRP	Peroxidasa de rábano
IARC	Centro Internacional de Investigaciones en el Cáncer
ICQ	Inmunocitoquímica
IHQ	Inmunohistoquímica
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Historia
LA	Linfoma anaplásico
LACG	Linfoma anaplásico de células grandes
LB	Linfoma de Burkitt
LH	Linfoma de Hodgkin
LL	Linfoma linfoblástico
LNH	Linfoma no Hodgkin
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NF- κ B	Factor nuclear κ B
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHD	Prolilhidroxilasa
PRDM1	Proteína 1 con dedos de zinc y dominio PR
SDF-1	Factor derivado de células estromales
SHM	Hipermutación somática
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
TMA	Microarreglo de tejidos
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR1	Receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular

Índice

Introducción	1
Epidemiología de linfoma	1
Tipos de Linfoma pediátrico	3
Clasificación de LNH en población pediátrico	4
Linfoma de Burkitt.....	5
Linfoma linfoblástico.....	5
Linfoma de células grandes.....	5
Tratamiento	6
Fisiopatogenia del LNH	6
Hipoxia Tumoral	7
Hipoxia en LNH	8
Factor inducible en Hipoxia 1	9
HIF-1 e inflamación	11
Quimiocinas	12
Quimiocinas en LNH	13
El receptor CCR6 en LNH	15
Justificación	16
Planteamiento del problema	16
Hipótesis	17
Objetivos	17
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares.....	17
Materiales y métodos	18
Cultivo celular.....	18
Inducción de HIF-1 α mediante condiciones hipóxicas.....	18
Inducción de HIF-1 α mediante un estímulo inflamatorio.....	18
Ensayos de inmunocitoquímica (ICQ).....	18
Extracción de RNA total y análisis de expresión por PCR Tiempo Real.....	19
Biopsias de pacientes.....	19
Microarreglo de tejidos.....	20
Inmunohistoquímica (IHQ).....	20
Patología Digital.....	21
Análisis bioinformático.....	21
Resultados	23
El ambiente hipóxico induce la expresión de HIF-1 α y CCR6 y esta expresión correlaciona de manera positiva.....	23
Los estímulos proinflamatorios aumentan la expresión de HIF-1 α y de CCR6 y esta expresión correlaciona de manera positiva.....	26
Evaluación de la expresión de HIF-1 α en tejidos de pacientes pediátrico con LNH.....	29
Discusión	31
Conclusiones	33
Referencias	34

Introducción

Epidemiología de linfoma

El Centro Internacional de Investigaciones en el Cáncer (*IARC*, por sus siglas en inglés), a través del proyecto GLOBOCAN 2018, publicó estimaciones sobre los tipos de cáncer que presentan los índices más elevados de mortalidad e incidencia. Tanto a nivel mundial así como en México, el Linfoma no Hodgkin (LNH) en adultos ocupa el 12° puesto en mortalidad y en las estadísticas referentes a la población infantil, este tipo de cáncer ocupa el 6° lugar en incidencia y 4° lugar en mortalidad (**Figura 1**)¹.

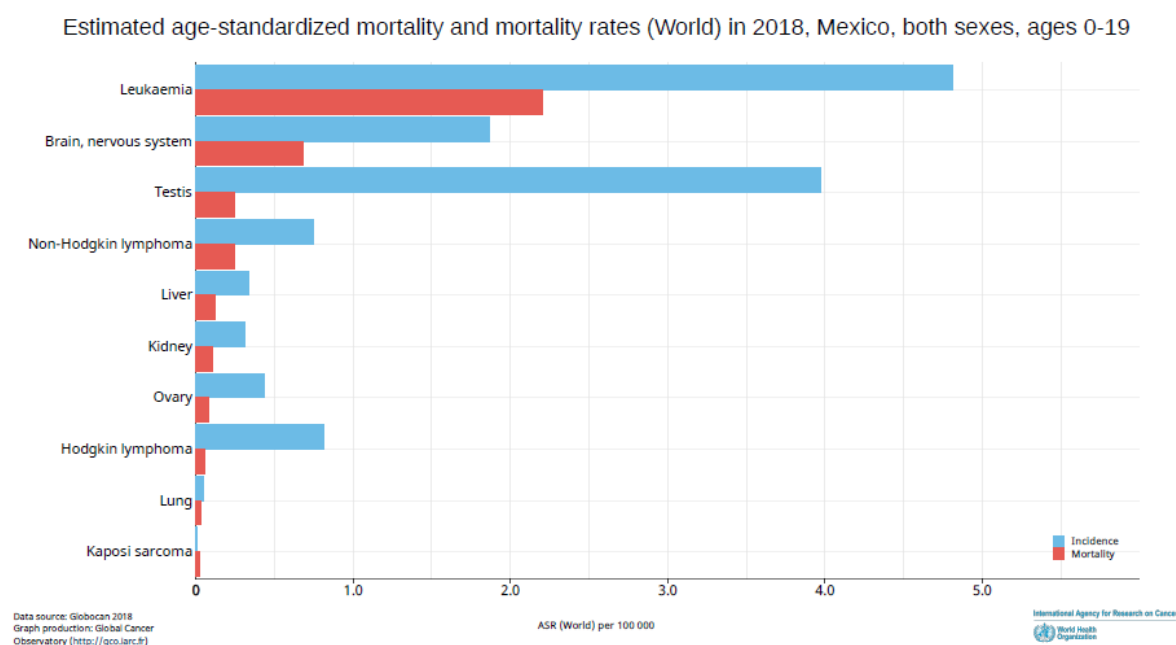


Figura 1. Gráfica correspondiente a los 10 tipos de cáncer en niños con las tasas de mortalidad e incidencia más altas en México por cada 100 000 habitantes. Tomado de GLOBOCAN 2018.

De manera muy importante para nuestro trabajo, se ha reportado que cerca del 7% de todos los tipos de cáncer en población de menos de 20 años corresponde a LNH en países desarrollados. Algunos factores que pueden afectar la incidencia del LNH son²:

- ∞ Localización geográfica: en Estados Unidos de América, se diagnostican 800 casos nuevos por año, en cuanto a la incidencia se reportan 10 casos por 1 millón de habitantes por año, mientras que en sub-Sahara de África la incidencia de LNH causado por el virus de Epstein-Barr es 10-20 veces más alta que en los Estados Unidos de América.

- ∞ Raza: La incidencia de LNH en blancos es más alta que en los afroamericanos, y el linfoma de Burkitt es más común en blancos no hispanos que en blancos hispanos.
- ∞ Edad: El LNH pediátrico generalmente ocurre en la segunda década de la vida.
- ∞ Sexo: Es más común en niñas que en niños con la excepción del linfoma mediastinal de células B, en el que el sexo no influye la incidencia del LNH.

El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) de acuerdo con una estimación realizada en la población desde cero a 17 años en el 2018 (Figura 2), ubicó a los tumores del sistema linfático y afines como la 4^o causa de mortalidad³.

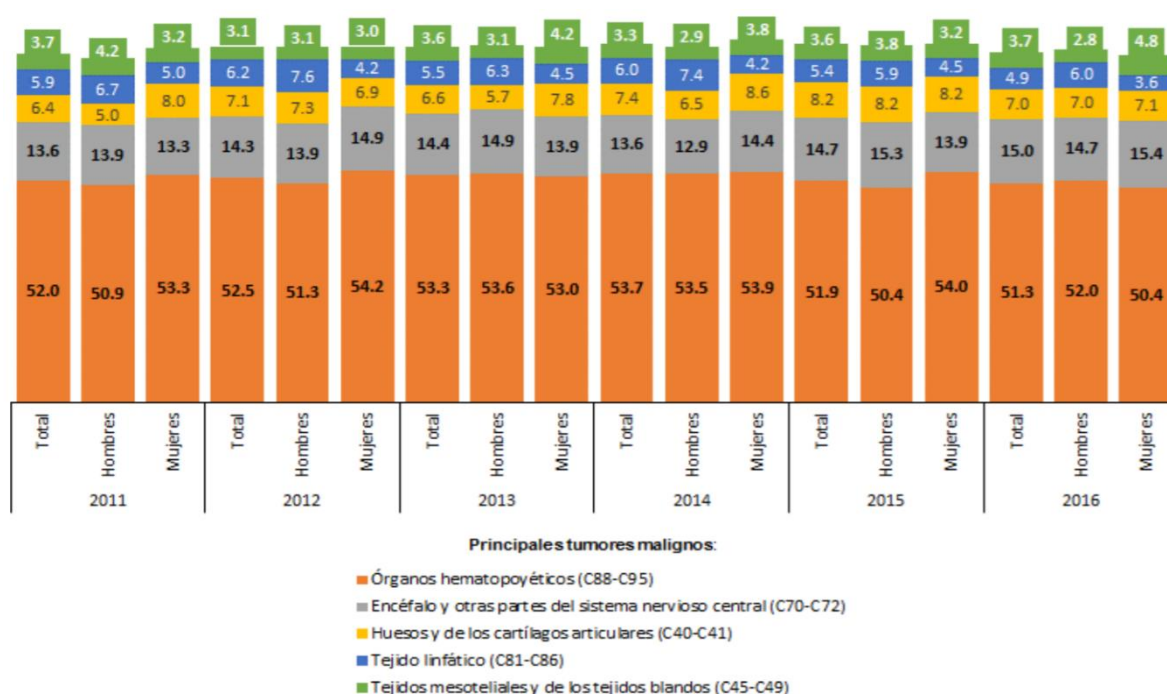


Figura 2. Porcentaje de muertes observadas para los cinco principales tumores malignos en la población de 0 a 17 años según sexo. Serie anual de 2011 a 2016. Tomado de INEGI.

En estudios epidemiológicos realizados en nuestro país por el Instituto Nacional de Pediatría se reportó que de enero de 2007 a 2012 hubo 14.178 pacientes registrados con cáncer, se encontró que el más común fue la leucemia (49.8%), seguido de linfoma (9.9%) y tumores del sistema nervioso central (9.4%). Cuando la cohorte total de niños se agrupó por edad, mostró que la incidencia más alta fue en niños entre 0 y 4 años y la más baja fue de 15 a 18 años. En términos de género, los hombres se vieron predominantemente afectados [7868 (55.5%)], mientras que la frecuencia fue ligeramente menor en las mujeres [6310 (44.5%)], con una relación hombres:mujeres de 1.2:1.

Dependiendo del tipo de neoplasia maligna infantil, los hombres representaron el 54.4% de los pacientes con leucemia aguda, el 54.2% con tumores cerebrales y el 64% de los casos de linfoma (subtipos de Hodgkin y de no Hodgkin)⁴.

Tipos de Linfoma pediátrico

Los linfomas son un tipo de cáncer que se origina en los linfocitos de los ganglios linfáticos, se clasifican en linfomas de Hodgkin (LH) y LNH⁵.

El LH, uno de los tipos de cáncer con mejor pronóstico en población pediátrica que se caracteriza por la presencia de las “células de Reed-Sternberg”⁶. En el caso del LNH, es más frecuente que el LH (el LNH representa el 5% de todos los cánceres del mundo en niños, mientras que el LH representa el 3%), y es alrededor de dos a tres veces más común en los niños que en las niñas, además es más frecuente en niños caucásicos que en los de la raza negra⁵, este trabajo se enfocará en el LNH de la población pediátrica.

El LNH es uno de los cánceres más comunes en la población pediátrica de los Estados Unidos, representando alrededor de 4% de todos los cánceres. Recientemente, la Sociedad Americana Contra El Cáncer en cuanto al LNH indicó que para el 2018: aproximadamente 74,680 personas (41,730 hombres y 32,950 mujeres) serían diagnosticadas con LNH (incluyendo adultos y niños) y aproximadamente 19,910 personas (11,510 hombres y 8,400 mujeres) morirían debido a este tipo de cáncer. El riesgo promedio de padecer LNH durante la vida es de alrededor de 1:47. Sin embargo, la probabilidad de que una persona sufra este padecimiento también se puede afectar por varios factores de riesgo. El LNH puede presentarse a cualquier edad; de hecho, es uno de los cánceres más comunes tanto en niños, adolescentes y adultos jóvenes⁷.

Por su parte, el LNH se puede clasificar por su morfología celular. Las características clave incluyen el tamaño y la forma de las células y cómo están agrupadas (su patrón de crecimiento)⁵:

- ∞ El tamaño se describe como grande o pequeño.
- ∞ La forma se describe como hendida (que muestra pliegues o hendiduras) o no hendida.
- ∞ El patrón de crecimiento puede ser difuso (células cancerosas dispersas) o folicular (dispuesto en grupos de células).

También se puede clasificar de acuerdo con la etapa en la que se encuentran, debido a la falta de correlación con el pronóstico, el sistema de estadificación de Ann Arbor y el Índice de Pronóstico Internacional no se usan rutinariamente para el LNH pediátrico⁸.

El sistema de estadificación de St. Jude (Murphy) se usa más ampliamente para LNH pediátrico⁸:

- ∞ Etapa I: Se encuentra solamente en un sitio, ya sea como un sólo tumor sin afectar en los ganglios linfáticos o en ganglios linfáticos de una parte del cuerpo. Ni el tórax, ni el abdomen están afectados.
- ∞ Etapa II: No está en el tórax, y uno de los siguientes aplica:
 - El linfoma es un sólo tumor y también se encuentra en los ganglios linfáticos cercanos de sólo una parte del cuerpo.
 - El linfoma consiste en más de un tumor y/o en más de un grupo de ganglios linfáticos, todos ubicados sobre o debajo del diafragma.
 - El linfoma se originó en el tracto digestivo (usualmente al final del intestino delgado), y se puede extirpar mediante cirugía. Podría o no haber alcanzado los ganglios linfáticos adyacentes.
- ∞ Etapa III:
 - El linfoma se originó en el tórax (usualmente en el timo o los ganglios linfáticos en el centro del tórax o el revestimiento del pulmón).
 - El linfoma se originó en el abdomen y se ha propagado extensamente dentro del abdomen. Por tal razón, no se puede extirpar completamente mediante cirugía.
 - El linfoma está localizado próximo a la columna vertebral (y también puede estar en cualquier otro lugar).
 - El linfoma consiste en más de un tumor o en más de un grupo de ganglios linfáticos que están tanto por encima como por debajo del diafragma. Por ejemplo, el linfoma está en los ganglios linfáticos de las axilas y en los ganglios linfáticos de la ingle.
- ∞ Etapa IV: El linfoma se encuentra en el sistema nervioso central (cerebro o médula espinal) o en la médula ósea cuando se descubrió originalmente.

Clasificación de LNH en población pediátrico

Alrededor del 90% de los pacientes pediátricos y adolescentes con LNH corresponden a linfocitos B maduros (Burkitt, linfoma/leucemia de tipo Burkitt o linfoma difuso de células B grandes); linfoma linfoblástico (principalmente linfoma precursor de células T y, con menor frecuencia, linfoma precursor de células B); o linfoma anaplásico de células grandes (linfoma de células T o de células nulas). El otro 10% de LNH observado en la población pediátrica se compone de tipos de enfermedad comúnmente observados en adultos, como linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado a la

mucosa (MALT), linfoma cutáneo, linfoma del sistema nervioso central (SNC) primario o Linfoma de células T^{5,8}.

El diagnóstico tradicional del LNH pediátrico, con el sistema St. Jude, se lleva a cabo a partir de una biopsia de ganglio linfático que se le realiza al paciente, habitualmente, los linfomas son clasificados, por patólogos, de acuerdo con un análisis morfológico de las células cancerosas en el microscopio⁵.

En los países de ingresos altos y con los tratamientos actuales, más del 80% de los niños y adolescentes con LNH sobrevivirán al menos 5 años, aunque el resultado depende de varios factores, incluidos el estadio clínico y la histología⁹.

Linfoma de Burkitt

Es el subtipo más abundante, responsable del 40% de los casos de LNH, es más frecuente en niños que en niñas y ocurre con mayor reincidencia en el rango de edad de 5-10 años; se origina de los linfocitos B y es uno de los cánceres que crece con mayor rapidez. Se puede propagar a otros órganos, incluyendo el sistema nervioso central. La sobrevida en etapas I y II es del 90%, mientras que en etapas III y IV es del 80%¹⁰.

Linfoma linfoblástico

Es uno de los tipos de LNH más frecuentes en niños ya que es responsable del 25 al 30% de los casos, se desarrolla en linfoblastos. Si se encuentra más del 25% de linfoblastos en médula ósea, se clasifica y se trata como leucemia linfoblástica aguda. La mayoría se desarrolla a partir de células T y se originan en el timo. Una pequeña fracción se origina de células B, comienzan en los ganglios linfáticos fuera del tórax. La sobrevida en etapas I y II es del 90%, mientras que en etapas III y IV es del 80%¹¹.

Linfoma de células grandes

Estos linfomas se originan de formas más maduras de células T o células B y pueden crecer casi en cualquier parte del cuerpo. No es común que se propague a la médula ósea, ni al cerebro. Tampoco crece tan rápidamente como otros linfomas en niños. Puede dividirse en¹²:

- ∞ Linfoma Anaplásico de Células Grandes: responsable del 10% de todos los LNH, generalmente se origina en células T maduras. Puede comenzar en los ganglios linfáticos del cuello o en otras áreas, y se puede encontrar en la piel, los pulmones, los huesos, el tracto digestivo u otros órganos.

- ∞ Linfoma Difuso de Células Grandes B: responsable del 15% de todos los LNH, se origina en células B, generalmente en el mediastino (el espacio entre los pulmones), también se encuentran en tejido linfático del cuello, del abdomen, o en los huesos.

La sobrevida para los linfomas de células grandes en etapas tempranas, es decir, I y II, es del 90%, sin embargo, en etapas más avanzadas el tiempo de sobrevida se reduce hasta un 75%⁵.

Tratamiento

El principal tratamiento para el LNH consiste en la administración del esquema conocido como CHOP (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, prednisona)⁵.

En concreto, el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” que es uno de los centros médicos de tercer nivel que reciben a pacientes pediátricos con LNH, se clasifica el estadio de los pacientes con el sistema de Murphy y, además, se utilizan diferentes esquemas de tratamiento de acuerdo con la clasificación morfológica e inmunológica que realicen los patólogos, uno de los esquemas más frecuentes es el COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexate, prednisona)¹³.

A pesar de los esfuerzos para brindar un mejor diagnóstico y tratamiento a los pacientes con LNH, se tienen reportes de que entre un 10 y 20% no responden al tratamiento; es por esta razón que entender mejor la fisiopatogenia de la enfermedad ayudará a buscar nuevos blancos terapéuticos o de pronóstico que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes y disminuir el porcentaje de pacientes con quimiorresistencia.

Fisiopatogenia del LNH

Como ya se mencionó, cerca del 85-90% de todos los LNH se derivan de linfocitos B, el resto de los linfomas proceden de linfocitos T¹⁴.

Las células B normales se generan en la médula ósea, dichas células B vírgenes (naïve) salen de la médula ósea para madurar en órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos y bazo, formando folículos linfoides primarios y secundarios; estos últimos se caracterizan por tener centros germinales. Los centros germinales representan sitios de maduración de afinidad, un proceso que resulta en la selección de células B plasmáticas. El centro germinal es la única estructura fisiológica, que admite células B de proliferación rápida, en donde se llevan a cabo dos procesos fisiológicos, conocidos como hipermutación somática (SHM) y recombinación de cambio de isotipo; es importante

mencionar que ambos procesos requieren doble ruptura de la cadena de ácido desoxirribonucleico (DNA) y aunque son necesarios para la generación de diversidad de anticuerpos, también son propensos a errores que pueden desembocar en linfomagénesis¹⁴. Es decir, que la función inmunológica fundamental del centro germinal viene con un inconveniente peligroso: los mismos mecanismos genéticos que permiten el desarrollo de receptores de inmunoglobulina de alta afinidad de diferentes clases de isotipos están involucrados en la transformación maligna de las células B¹⁵.

El daño del DNA que ocurre dentro del centro germinal está controlado por una serie de factores de transcripción cuidadosamente controlados que incluyen Bcl-6, MYC y PRDM1. No es sorprendente que alteraciones genéticas adquiridas de estos y otros factores de diferenciación promueven el desarrollo de linfomas¹⁴.

Temas comunes que sustentan la biología del linfoma incluyen (1) alteraciones genéticas que promueven el crecimiento y supervivencia, (2) regulación de las principales vías de señalización, (3) inhibición de la apoptosis, (4) bloquea la diferenciación terminal, (5) escape inmunológico y (6) alteraciones de los genes que están involucrados en remodelación, modificación de cromatina¹⁴ y (7) movilidad celular y metástasis.

Los LNH a pesar de tratarse de una malignidad hematopoyética, son considerados tumores semisólidos, debido a que los ganglios linfáticos se encuentran invadidos de células tumorales. Lo cual, se aprecia como nódulos tumorales múltiples de diversos tamaños, en donde se ha demostrado existe un ambiente de hipoxia. Esta condición resulta también un mecanismo de patogenicidad, diversos trabajos han postulado que los bajos niveles de oxígeno contribuyen al crecimiento del cáncer y a la resistencia a la quimioterapia, a la radiación y al incremento de la proliferación y migración celular¹⁶.

En este sentido, se sabe que la hipoxia generada en los tumores contribuye de manera importante en la regulación de diversas proteínas involucradas en múltiples procesos celulares, incluyendo los mecanismos de regulación de citocinas, quimiocinas y sus receptores¹⁷.

Hipoxia Tumoral

Los tumores se vuelven hipóxicos porque los nuevos vasos sanguíneos que se desarrollan son aberrantes y tienen un flujo sanguíneo deficiente y aunque la hipoxia es tóxica tanto para las células cancerosas como para las células normales, las células cancerosas experimentan cambios genéticos y

adaptativos que les permiten sobrevivir e incluso proliferar en un ambiente hipóxico. Estos procesos contribuyen al fenotipo maligno y al comportamiento agresivo del tumor¹⁸.

Dentro del tumor existen varios tipos de hipoxia, una es la que ocurre cuando la proliferación incontrolada de células tumorales hace que los tumores superen su suministro de sangre (y, por lo tanto, de oxígeno). Este límite en la difusión de oxígeno (distancia calculada que el oxígeno difunde a medida que pasa del capilar a las células antes de que se metabolice completamente) se denominó "hipoxia crónica". Otro tipo de hipoxia, conocida como hipoxia "aguda" o "limitada por perfusión", se produce cuando los vasos sanguíneos aberrantes se cierran, lo que también puede hacer que el flujo sanguíneo se invierta¹⁸.

La hipoxia induce la expresión de genes que regulan procesos celulares importantes en el ambiente tumoral como la proliferación, angiogénesis, metabolismo, apoptosis, inmortalización y migración¹⁹.

En el contexto de la proliferación, la hipoxia induce la expresión de factores de crecimiento que se sabe promueven la proliferación celular tales como el TGF- β y PDGF, también incrementa la actividad de la cinasa fosfatidilinositol 3-OH, que se encuentra involucrada en procesos de proliferación celular y supresión de apoptosis, entre otros¹⁸.

Otra característica del cáncer es la alteración en el metabolismo de la glucosa, la glucólisis, que en general, es la formación de piruvato a partir de glucosa y luego a ácido láctico, en la mayoría de las células animales la formación de ácido láctico se encuentra inhibida en presencia de oxígeno, lo cual permite a la mitocondria oxidar el piruvato hasta formar dióxido de carbono y agua, esta inhibición se conoce como "efecto Pasteur", sin embargo, la versatilidad del metabolismo en las células es esencial para mantener la producción de energía a lo largo de un rango de concentraciones de oxígeno. La conversión de glucosa a ácido láctico en presencia de oxígeno se conoce como glucólisis aeróbica o el "efecto Warburg"²⁰.

Además, la hipoxia se asocia con la regulación positiva de los transportadores de glucosa y las enzimas glucolíticas, en particular la hexocinasa, así como la piruvato deshidrogenasa y la lactato deshidrogenasa. Esto resulta en la capacidad de las células tumorales para sobre regular la glucólisis aeróbica, al mismo tiempo que reduce la vía de fosforilación oxidativa²¹.

Hipoxia en LNH

En LNH se ha reportado que existe un aumento en la expresión de proteínas reguladas en hipoxia como por ejemplo, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y su receptor (VEGFR1),

y que además existe una correlación positiva de ambas con la progresión clínica de la enfermedad²². Otra proteína relacionada a un ambiente hipóxico que se ha visto aumentada en células de LNH, es la enzima lactato deshidrogenasa, la sobreexpresión de dicha enzima correlaciona con la expresión del factor inducible en hipoxia 1 alfa (HIF-1 α). Esta sobreexpresión también se observó en biopsias de pacientes adultos diagnosticados con LNH en comparación con biopsias de ganglios no cancerosos²³.

Ante un ambiente hipóxico, se ha reportado que las células responden mediante factores de transcripción; un principal regulador de la adaptación celular es la familia de factores inducibles por hipoxia (HIF), que está conformada por tres isoformas: HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α demostrado que este factor regulan la expresión de proteínas involucradas en apoptosis, glicolisis, proliferación, quimiorresistencia, expresión de citocinas y quimiocinas entre otros procesos²⁴.

Factor inducible en Hipoxia 1

HIF-1 es un heterodímero compuesto la subunidad α inducible y β , la subunidad constitutiva, también conocida como Translocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburos Arilo (*ARNT*, por sus siglas en inglés)²⁵. La regulación canónica ocurre en condiciones de normoxia, dos residuos de prolina son hidroxilados por las enzimas prolihdroxilasas (PHD), estas enzimas son dioxigenasas que son dependientes de 2-oxoglutarato (2-OG) y O₂, y que requieren al Fe²⁺ y al ascorbato como cofactores para la reacción que produce succinato y CO₂. Por otro lado, un residuo de lisina es acetilado por una acetiltransferasa (ARD). Dichas alteraciones en los residuos mencionados conllevan a la degradación de la subunidad α , ya que dan la señal a la proteína Von Hippel-Lindau (VHL) para unirse y llevar a cabo su actividad de ubiquitinligasa y posteriormente llevar a degradación proteosomal (**Figura 3**)¹⁹.

Sin embargo, en condiciones de hipoxia HIF-1 α se estabiliza por la inactividad de las PHD y se transloca al núcleo uniéndose a la subunidad β (HIF-1 β), que se expresa de manera constitutiva, es entonces cuando el complejo se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en el promotor de poco más de 150 genes blanco, que participan en diversos procesos como la glicólisis²⁶, angiogénesis²⁷, apoptosis²⁸, y quimiotaxis²⁹ entre otros¹⁹. Adicionalmente a las vías canónicas, puede existir otro mecanismo por el cual la desmetilación de CpG asociada a tumor facilita la autorregulación positiva de la expresión de HIF-1 α a nivel de transcripción. Por ejemplo, Koslowski et al encontraron que el propio promotor HIF-1 α posee un HRE, que normalmente está reprimido por la metilación de un dinucleótido CpG ubicado en el elemento central en las células normales, pero, por el contrario, se activa de manera frecuente y aberrante por la desmetilación. en líneas celulares

de cáncer de colon y muestras primarias de cáncer de colon, lo que permite la unión de HIF-1 α a su propio promotor, lo que resulta en la activación automática de la expresión de HIF-1 α ³⁰.

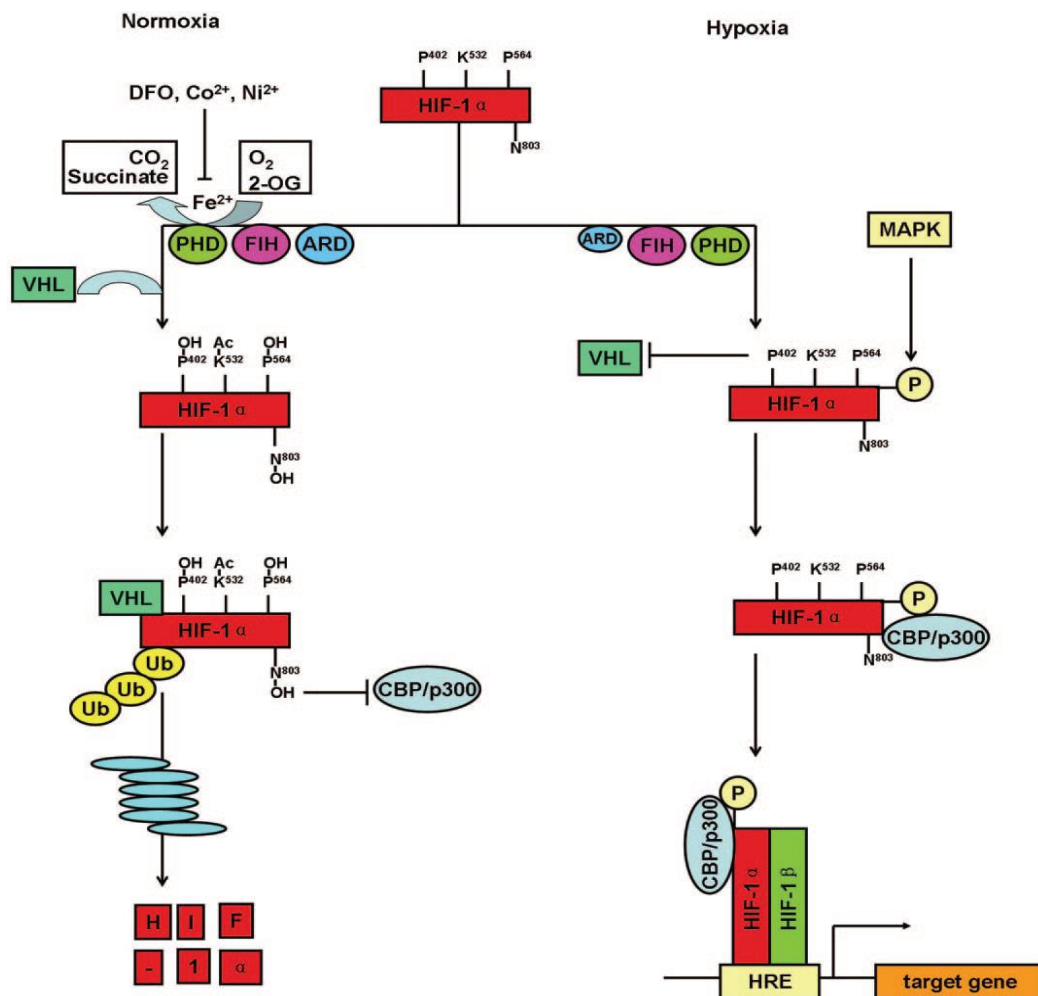


Figura 3. Regulación dependiente de oxígeno de HIF-1., 2-OG=2-oxoglutarato, ARD=Acetiltransferasa, CBP=proteína de unión de la proteína de respuesta a cAMP, DFO=Deferoxamina, FIH=Factor inhibitorio de HIF, HRE=Elementos de respuesta a hipoxia, PHD=Prolilhidroxilasa, UB=Ubiquitina, VHL=Proteína de Von Hippel-Lindau²⁴.

HIF-1 es un factor de transcripción responsable de la homeostasis del oxígeno, al participar en la inducción de genes que facilitan la adaptación y supervivencia de las células a hipoxia (disminución del oxígeno). Dicho factor es de gran importancia, pues se ha demostrado que niveles elevados de HIF-1 α correlacionan con el crecimiento del tumor, vascularización y metástasis, tanto en modelos animales como en estudios clínicos; siendo considerado como un marcador de mal pronóstico en diversos tipos de cáncer^{31,32}.

HIF-1 ha sido relacionado con malignidades hematológicas como la leucemia linfoblástica aguda, desarrollando un papel importante en el progreso o pronóstico de esta enfermedad³³. Dentro de nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado que la expresión del factor HIF-1 α está involucrado en la regulación de la quimiorresistencia en una línea celular de LNH, a través de la regulación transcripcional positiva de la proteína antiapoptótica Bcl-XL, la cual está involucrada en la estabilización de la membrana mitocondrial. Esto fue evaluado mediante técnicas de inmunocitoquímica y western blot, en donde se observó que la sobre expresión de HIF-1, generada mediante la mimetización de un ambiente hipóxico con etil-3,4-dihidroxibenzoato (EDHB), induce un aumento en la expresión de Bcl-XL. Por otro lado, mediante citometría de flujo se demostró que el tratamiento de células de LNH con EDHB, induce quimiorresistencia al cisplatino (CDDP)³⁴.

De manera interesante, nuestro grupo también demostró que HIF-1 α regula transcripcionalmente de manera positiva a la quimiocina CXCL13 al unirse a los tres HRE en el promotor de su gen en células de LNH; lo cual fue determinado mediante ensayos de plásmidos reporteros, mutación sitio dirigida e inmunoprecipitación de la cromatina. Los resultados *in vitro* de la correlación de la expresión de HIF-1 α y CXCL13, fueron corroborados en biopsias de pacientes incluidos en un microarreglo de tejidos de LNH pediátrico, en donde la expresión de ambas proteínas fue evaluada mediante inmunohistoquímica y patología digital, mostrando que ambas proteínas se encuentran elevadas en pacientes con los tipos de LNH más agresivos³⁵.

HIF-1 e inflamación

Además de la vía de regulación canónica (dependiente de oxígeno), se ha reportado que HIF-1 también puede ser regulado en condiciones de inflamación de manera positiva por el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) dicho factor está involucrado en procesos inflamatorios regulando la expresión de quimiocinas y citocinas³⁶, se ha descrito mediante ensayos de gen reportero que NF- κ B contribuye a incrementar el mRNA de HIF-1 α en condiciones de hipoxia³⁶, también se ha demostrado que la estimulación con lipopolisacáridos en macrófagos aumenta los niveles de HIF-1 α promoviendo tanto la proteína, como el mRNA a través de las vías de MAPK y NF- κ B, vía dependiente del receptor tipo Toll 4 (TLR-4)³⁷.

Recientemente se ha propuesto a HIF-1 α como blanco transcripcional de NF- κ B, pues se ha demostrado mediante ensayos de gen reportero, mutación sitio dirigida y ChIP que NF- κ B se une a la región promotora de HIF-1 aumentando actividad del promotor en la línea celular de LNH, Ramos, además de que también se demostró mediante ensayos de Western Blot que la inhibición de NF- κ B disminuye la expresión de la proteína de HIF-1 α y viceversa³⁸.

Se ha reportado que durante un ambiente inflamatorio las células tumorales, así como las células de la respuesta inmune secretan citocinas y quimiocinas, las cuales participan de manera importante en procesos pro y antitumorales³⁹.

Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de citocinas quimiotácticas que dirigen la migración de leucocitos en el cuerpo bajo condiciones fisiológicas e inflamatorias y están involucradas en diversos procesos del cáncer, tales como angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis⁴⁰.

El papel de las quimiocinas en muchas condiciones patológicas diferentes ha llevado a la búsqueda de antagonistas de quimiocinas, en forma de inhibidores de moléculas pequeñas, versiones modificadas o truncadas de las quimiocinas mismas, anticuerpos o moléculas solubles similares a los receptores, para su uso como terapéutica. Varias de estas moléculas han alcanzado ensayos clínicos de fase II y III y un antagonista de CCR5 (Maraviroc, Slezentry®) ha sido aprobado recientemente por la FDA para el tratamiento de pacientes infectados por el VIH³⁹.

Los receptores de quimiocinas comprenden una familia de siete receptores acoplados a proteína G en el dominio transmembrana. Una de las principales características entre las quimiocinas y sus receptores es la “promiscuidad”, es decir, los receptores generalmente se unen a varias quimiocinas del mismo subtipo y de manera similar, algunas quimiocinas pueden unirse a varios receptores diferentes⁴¹.

Se clasifican en 4 familias de acuerdo con la presencia de residuos de cisteína en el extremo amino terminal⁴¹:

- ∞ CC
- ∞ CXC
- ∞ CX₃C
- ∞ XC

Actualmente, hay cerca de 50 quimiocinas conocidas, se dividen en 29 CC y 17 CXC, existen otros grupos más pequeños, XC y CX₃C, que comprenden dos y un miembro, respectivamente⁴¹.

Dentro de la primera familia se encuentra la quimiocina CCL20, y su receptor CCR6⁴¹. CCL20 se une a CCR6, lo que lleva a la disociación y activación de las proteínas G. La proteína G fosforila la molécula de Akt, lo que lleva a una señalización posterior a través de las moléculas mTOR y STAT3.

La señalización de Akt/mTOR/STAT3 inhibe la expresión de Foxp3 y promueve la expresión de las moléculas ROR γ t e IL-17 en la célula T (Figura 4)⁴².

De igual manera, las quimiocinas pueden dividirse en dos grupos, las quimiocinas homeostáticas y las inflamatorias, dentro de estas últimas se encuentran las involucradas en reclutamiento de células del sistema inmune a los sitios de inflamación y actúan como mediadores de la inflamación durante las infecciones, daño tisular u otras condiciones patológicas³⁹.

Se ha reportado que existe una alteración en la expresión de ambas proteínas en malignidades de células B, como algunos tipos de leucemias y linfomas. CCL20 tiene la principal función de reclutar células que expresan CCR6, tales como células dendríticas inmaduras, linfocitos T y linfocitos B. Por otro lado, su único receptor, CCR6, tiene expresión constitutiva en ganglios linfáticos, apéndice y páncreas⁴⁰.

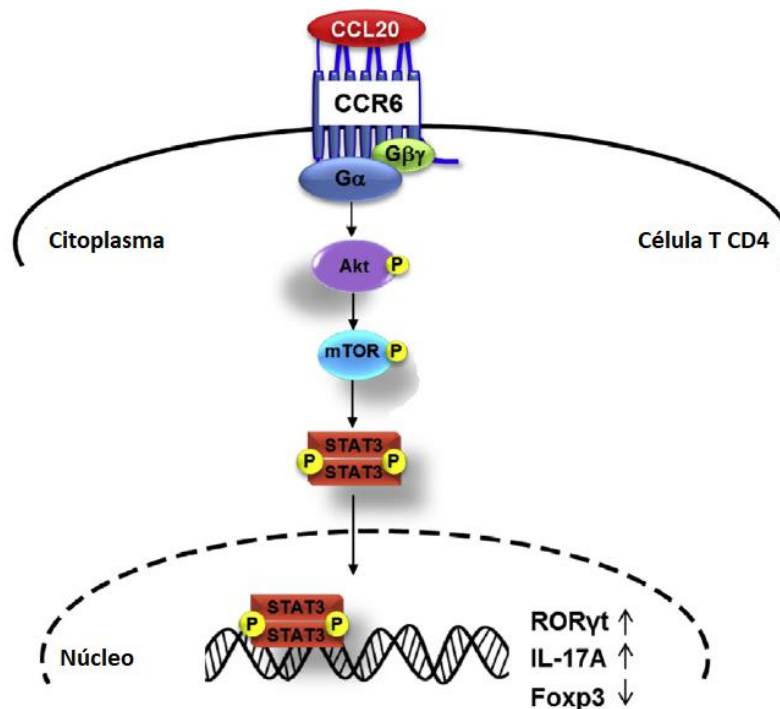


Figura 4. Representación esquemática de la señalización CCR6 en células T CD4⁺.⁴²

Quimiocinas en LNH

Se ha reportado la implicación de HIF-1 α en la migración celular, debido a su participación en procesos de quimiotaxis ya que es capaz de regular quimiocinas involucradas en cáncer, contribuyendo en el microambiente tumoral tales como SDF-1 o CXCL12, que fue la primera

quimiocina que se describió que es regulada por HIF-1, se reportó que esta quimiocina favorece metástasis en hueso a partir de una línea celular de cáncer de próstata en un modelo *in vivo*²⁹.

Por otro lado se ha descrito la participación de HIF-1 en la regulación transcripcional de CXCL13 como se mencionó anteriormente³⁵ además se ha descrito que la expresión de CXCL8 correlaciona con la expresión de HIF-1 α en hepatocarcinoma desarrollando un papel importante en el progreso de la enfermedad⁴³.

Recientemente se reportó en un modelo de hepatocarcinoma que HIF-1 regula transcripcionalmente a la quimiocina CCL20, cuyo receptor es CCR6, esta quimiocina presenta una dualidad teniendo una actividad antitumoral o inmunosupresora, sin embargo, hasta el momento no existen reportes de qué papel tiene CCL20 y CCR6 en linfomas⁴⁴.

El patrón de receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión expresadas por células de linfoma de diferentes tipos a veces reflejan el origen celular del tumor y correlacionan con el patrón de “homing” del linfoma. Se ha reportado que algunos linfomas cutáneos anaplásicos de células grandes expresan CCR4, así como las leucemias/linfomas de células T, sin embargo, algunos otros linfomas como los periféricos de células T son usualmente CCR4 negativos y además no expresan algunos otros receptores como CCR7, CXCR3 y CCR10, por lo cual se sugiere que los diferentes tipos de leucemia/linfoma de células T expresan distintos conjuntos de receptores de quimiocinas. La mayoría de los LNH derivados de linfocitos B expresan los receptores CXCR4 y CXCR5, así como CXCR3, y migran en respuesta a las quimiocinas CXCL12 y CXCL13. Además, se ha sugerido que la presencia de células de linfoma en el sistema nervioso central es dirigida por dichas quimiocinas producidas por células del cerebro o células endoteliales del cerebro que interactúan con los receptores expresados en las células de linfoma. Otros receptores que se han identificado en LNH de linfocitos B son CC5, CCR3, CCR2 y CCR6, de manera importante para este trabajo³⁹.

Dentro de las funciones de las quimiocinas que juegan un papel importante en el crecimiento del linfoma están la migración, la inhibición de la apoptosis, las actividades pro-angiogénicas, entre otras. Las quimiocinas que se producen en el sitio del tumor, ya sea por las células tumorales, del estroma o de infiltrados, pueden tener efectos benéficos o inhibitorios para la malignidad³⁹.

De hecho, se ha reportado que algunos linfocitos T reguladores, que pueden influenciar negativamente la respuesta inmune al tumor, facilitando así el crecimiento, expresan CCR4 y CCR8 y que pueden ser llamados al sitio tumoral a través de la expresión de las quimiocinas CCL17, CCL22 y CCL1. Por otro lado, se ha descrito que la quimiocina CCL3, que recluta macrófagos que promueven el crecimiento tumoral, se expresa diferencialmente en los linfomas³⁹.

El receptor CCR6 en LNH

Se ha demostrado que CCR6 tiene un papel importante en la fisiopatogenia del cáncer intestinal promoviendo metástasis en un modelo *in vivo*⁴⁵. Otro ejemplo de ello es que su expresión, junto con la de su ligando CCL20, han correlacionado con gliomas de alto grado en comparación con los de bajo grado y, por lo tanto, es indicativo de un mal pronóstico en pacientes con gliomas de alto grado⁴⁶.

En otro reporte, se observó que CCR6 correlaciona con el grado de agresividad en cáncer próstata, pues se observa que la expresión de CCR6 sea débil, intermedia o fuerte, se asocia con la agresividad del tumor⁴⁷; de manera más importante para el proyecto, se ha descrito que CCR6 tiene una expresión diferencial en biopsias de diferentes tipos de LNH adulto, como linfoma folicular, linfoma asociado a mucosas en pulmón, linfoma de células del manto⁴⁸.

Recientemente se ha reportado, por ensayos de biología molecular, que HIF-1 regula transcripcionalmente a la quimiocina CCL20, ligando del receptor CCR6, en hepatocarcinoma⁴⁴. Por todo lo anterior es que este trabajo está enfocado en el estudio de la posible relación que existe entre HIF-1 y CCR6 en LNH.

Justificación

El LNH representa, la cuarta causa de mortalidad en los casos de cáncer infantil. Y aunque los tratamientos habituales han permitido una sobrevida de 85% a cinco años, aún son necesarios estudios en la fisiopatología de esta neoplasia hematopoyética que permitan la identificación de mejores factores con valor pronóstico y/o mejores blancos terapéuticos. HIF-1, así como la quimiocina CCL20 y su receptor CCR6, han sido implicados en la progresión, agresividad y metástasis en diferentes tipos de cáncer. Recientemente, se reportó que HIF-1 regula transcripcionalmente de manera positiva la expresión de la quimiocina CCL20. Por otro lado, un análisis bioinformático realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que el promotor de CCR6 contiene sitios de unión para HIF-1, por lo tanto, es razonable pensar que HIF-1 puede estar regulando a CCL20 y CCR6 en una línea celular de LNH pediátrico, y que esta regulación esté implicada en la fisiopatogenia de esta enfermedad.

Planteamiento del problema

El LNH se encuentra dentro de los primeros tipos de cáncer más frecuentes en edad pediátrica tanto en nuestro país como a nivel mundial. Nuestro grupo de trabajo ha reportado que HIF-1 se encuentra sobre expresado en los diferentes tipos de LNH y que su aumento en la expresión correlaciona con los subtipos más agresivos. Se ha reportado que HIF-1 regula transcripcionalmente de manera positiva la expresión de la quimiocina CCL20. Por otro lado, un análisis bioinformático realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que el promotor de CCR6 contiene sitios de unión para HIF-1.

Por lo que es de nuestro interés determinar si HIF-1 podría estar regulando la expresión de CCL20 y CCR6 en células de LNH y si esta regulación se encuentra implicada en la fisiopatogénesis de la enfermedad.

Hipótesis

La activación de HIF-1 α mediante la inducción de un ambiente hipóxico o mediante el tratamiento con citocinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF- α , inducirá la expresión de CCR6 en células de LNH pediátrico.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar si la activación de HIF-1 mediante la inducción de un ambiente hipóxico o mediante el tratamiento con citocinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF- α , inducirá la expresión de CCR6 en células de LNH pediátrico.

Objetivos particulares

- ∞ Evaluar si la activación de HIF-1 después de exponer a las células de LNH a un ambiente hipóxicos, inducirá la expresión de CCR6.
- ∞ Evaluar si la activación de HIF-1 después de tratar a las células de LNH con citocinas proinflamatorias como IL-1 β o TNF- α , inducirá la expresión de CCR6.
- ∞ Evaluar si la proteína HIF-1 α *in situ* en un microarreglo de tejidos de pacientes pediátricos con diferentes tipos de LNH se expresa de manera diferencial.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Se cultivó la línea celular Ramos (Linfoma de Burkitt pediátrico con crecimiento en suspensión; ATCC CRL-1596®, Virginia, EUA) con medio RPMI Advanced 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO-Invitrogen®, California, EUA), 1% L-glutamina, 1% Piruvato de sodio (GIBCO-Invitrogen®, California, EUA) y 1% antibiótico-antimicótico (GIBCO-Invitrogen®, California, EUA). Las células se mantuvieron en cultivo a 37°C y 5% CO₂.

Inducción de HIF-1 α mediante condiciones hipóxicas

Se cultivaron 5x10⁵ células Ramos, en condiciones de normoxia como control e hipoxia, a una concentración ambiental de O₂ de 1%, 5% de CO₂, a 37° C en una cámara de hipoxia (Bactrox, Sheldon Manufacturing Inc.®, Oregon, EUA), durante diferentes periodos de tiempo (0, 1, 3, 6, 9 h). Posteriormente, se recolectaron las células para elaboración de laminillas para ensayos de inmunocitoquímica para la detección de las proteínas de interés. Así como, células para determinación de mRNA de los genes de interés.

Inducción de HIF-1 α mediante un estímulo inflamatorio

Se cultivaron 5x10⁵ células Ramos por condición, posteriormente se estimularon con las citocinas TNF- α e IL-1 β , las células fueron tratadas por 24 h con las concentraciones de 0, 0.1, 1.0, 5.0, y 10.0 ng/mL para el caso IL-1 β ; y de 0, 5.0, 10.0, 20.0 y 50.0 ng/mL para el caso de TNF- α . Consecutivamente, se recolectaron las células y se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para la detección de las proteínas de interés. Así como, células para determinación de mRNA de los genes de interés. Para el experimento correspondiente a la combinación de ambas citocinas, se utilizó TNF- α 10.0 ng/mL e IL-1 β 5.0 ng/mL. Las células fueron tratadas durante 6h.

Ensayos de inmunocitoquímica (ICQ)

La expresión de HIF-1 α , CCR6 y CCL20 se analizó empleando las células Ramos en sus distintas condiciones antes mencionadas. Se realizó la recuperación de antígenos, utilizando una solución de citrato de sodio al 0.01% de pH 6.0, durante 20 minutos a 90°C. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una solución al 3% de H₂O₂ en metanol 2 veces por 15 minutos. La unión inespecífica de los anticuerpos se redujo al incubar con una solución de bloqueo realizada al 5% de leche en PBS durante 180 minutos. Las laminillas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpos contra HIF-1 α (dilución 1:2000, Novus Biologicals®, Colorado, EUA) y CCR6 (dilución 1:1250, R&D Systems®, Minnesota, EUA). Al día siguiente, las laminillas se lavaron 8

veces en una solución de buffer de fosfatos (*PBS*, por sus siglas en inglés) 1X pH 7.4 durante 5 minutos. Después de los lavados, las laminillas se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado conjugado a streptavidina, parte de un kit (Vector Laboratories®, California, EUA), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la generación del color visible, se utilizó 3,3-tetra-hidrocloruro diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories®, California, EUA) de 1-5 minutos. La reacción se detuvo con agua destilada y como medio de contraste se utilizó hematoxilina. Finalmente, los tejidos se deshidrataron mediante el tratamiento con xilol y diferentes concentraciones de alcohol, y se colocó el cubreobjetos con medio de montaje.

El análisis se realizó en un microscopio óptico Olympus BX41® (Olympus®, Pennsylvania, EUA) a una magnificación de 20x se capturaron diferentes micrografías en donde se evaluó el porcentaje de células positivas mediante el conteo manual de 100 células y posteriormente se evaluó la presencia de expresión citoplasmática y nuclear, obteniendo el resultado en porcentajes; para el análisis correspondiente a la expresión total. Utilizando el software Image Pro-Plus® (Media Cybernetics Inc.®, Maryland, EUA) para el conteo de píxeles totales en dichas micrografías.

Extracción de RNA total y análisis de expresión por PCR Tiempo Real

Se realizó la cuantificación del RNA mensajero (mRNA) de CCR6 y CCL20 en células Ramos en condiciones de 3h de hipoxia, a partir de extractos de RNA total obtenidos por kit miRneasy® (Qiagen Inc.®, Maryland, EUA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó una reacción de transcriptasa reversa para la obtención de cDNA. Posteriormente se realizó PCR en tiempo real con el kit Universal Taqman Master Mix II® (Applied Biosystems®, California, EUA) y sondas Taqman® dirigidas a CCR6 y CCL20 y como control de expresión constitutiva se usó el gen de la proteína de unión a la caja TATA (*TBP*, por sus siglas en inglés). Se calculó el valor relativo de expresión de los genes utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁴⁹.

Biopsias de pacientes

Se incluyeron muestras quirúrgicas de 52 biopsias de ganglios de pacientes pediátricos con diferentes tipos de LNH: 12 Linfomas linfoblásticos (LL), 17 Linfomas de Burkitt (LB), 16 Linfomas de Células Grandes (LCG) y 7 Linfomas Anaplásico de células Grandes (LACG) así como 6 Hiperplasias Reactivas (HR). Las muestras se obtuvieron del archivo de Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez y del Departamento de Patología del Hospital de Pediatría, CMN S.XXI, IMSS.

Microarreglo de tejidos

Para la construcción del microarreglo de tejidos (*TMA*, por sus siglas en inglés “tissue microarray”) se tomaron secciones de 4 μm de cada muestra parafinada para la tinción de hematoxilina y eosina con el fin de identificar la región de interés por un patólogo experto en el diagnóstico de pacientes pediátricos con LNH. Posteriormente, empleando el equipo CHEMICON’s Advanced Tissue Arrayer® (ATA 100 Chemicon) (Millipore Corporation®, Massachusetts, EUA) que utiliza una aguja calibre 0.5 mm mediante la cual se extrajeron cilindros de parafina de 3 mm de altura de un bloque de parafina de 2.5 X 2.5 cm “en blanco”, delimitándose una matriz de 5 x 5 elementos. Una vez elaborada la matriz, se utilizó una aguja de calibre 0.4mm para obtener cilindros de tejido de cada una de las muestras de tejido embebidas en parafina (bloque donador), se tomó como guía el corte teñido con hematoxilina y eosina. Cada uno de estos cilindros que contienen el tejido fueron implantados en el bloque en blanco que ya había sido previamente perforado (bloque receptor) y una vez completada la matriz de tejidos (cada tejido por triplicado), se impregnó una pequeña cantidad de parafina líquida sobre el arreglo para igualar la altura de los cilindros. Posteriormente, el arreglo se calentó en un horno a 60 °C por 15 minutos para homogeneizar la parafina de los cilindros inyectados con la del bloque en blanco y eliminar los huecos entre los cilindros de las muestras y el bloque receptor. Finalmente, el arreglo se enfrió durante 5 minutos en hielo y se obtuvieron cortes de 5 μm con un microtomo rotatorio. El TMA empleado en este estudio contenía 52 biopsias de ganglios de pacientes pediátricos con diferentes tipos de LNH: 12 Linfomas linfoblásticos (LL), 17 Linfomas de Burkitt (LB), 16 Linfomas de Células Grandes (LCG) y 7 Linfomas Anaplásico de células Grandes (LACG) así como 6 Hiperplasias Reactivas (HR).

Inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizaron tinciones de IHQ en cortes seriados de los TMAs de 4 μm de espesor, previamente desparafinados e hidratados en un tren de solventes en el que se incluye etanol (70, 90 y 100%), etanol en xilol (50%) y xilol. Posteriormente, se realizó la recuperación de antígenos, utilizando una solución de citrato de sodio al 0.01% de pH 6.0, durante 20 minutos a 90°C. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una solución al 3% de H_2O_2 en metanol 2 veces por 15 minutos. La unión inespecífica de los anticuerpos se redujo al incubar con una solución de bloqueo realizada al 3% de suero normal de cerdo en PBS durante 120 minutos. Las laminillas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpos contra HIF-1 α (dilución 1:2000, Novus Biologicals®, Colorado, EUA) y CCL20 (Abcam®, Cambridge, RU). Al día siguiente, las laminillas se lavaron 8 veces en una solución de buffer de fosfatos (PBS) 1X pH 7.4 durante 5 minutos. Después de los lavados, las laminillas se incubaron con un segundo anticuerpo biotinilado, parte de un kit (GBI Labs®, Washington, EUA), durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguida por una incubación

con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP) del mismo kit (GBI Labs®, Washington, EUA), durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la generación del color visible, se utilizó 3,3'tetra-hidrocloruro diaminobenzidina (DAB, GBI Labs®, Washington, EUA) de 1-5 minutos. La reacción se detuvo con agua destilada y como medio de contraste se utilizó hematoxilina. Finalmente, los tejidos fueron deshidratados mediante el tratamiento con xilol y diferentes concentraciones de alcohol (70, 90 y 100%), y se colocó el cubreobjetos con medio de montaje.

Patología Digital

La foto-documentación y análisis de expresión se realizó mediante patología digital con el digitalizador de imágenes Scan Scope CS® (Aperio, Leica Biosystems®, Wetzlar, Alemania). Brevemente, las laminillas fueron digitalizadas a una magnificación de 40X, obteniendo imágenes con una resolución de 0.45 pixeles/μm. entonces se seleccionaron secciones de 500 μm por cada tejido, eligiendo áreas representativas y entonces la expresión fue analizada usando el software Sprectrum V11.1.2.752® (Aperio, Leica Biosystems®, Wetzlar, Alemania). El algoritmo empleado cuantifica la expresión total o nuclear según sea requerido directamente en el tejido dando una escala cuantitativa de intensidad categorizada como 0 (sin tinción), 2+ (tinción moderada) y 3+ (tinción fuerte), basada en la identificación de color café como tinción específica de las proteínas de interés y de color azul (hematoxilina, de contraste). Los datos fueron procesados mediante el programa de análisis estadístico GraphPad Software®, Inc (San Diego, California, USA).

Análisis bioinformático

Para poder postular la posible regulación transcripcional de CCR6 por el factor de transcripción inducible en hipoxia, se analizó *in silico* la secuencia promotora del gen CCR6 para identificar los sitios de unión para HIF-1. La secuencia analizada comprende los nucleótidos del -2000 hasta el +400 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT). Se determinó la presencia de tres sitios putativos de unión para HIF-1 usando herramientas bioinformáticas (PROMO, Meme suit, Transfact) basadas en la construcción de matrices de pesos de la posición de los nucleótidos reconocidos por el factor de transcripción HIF-1. La base de datos Jaspar predice que tales sitios tienen una calificación relativa en promedio de 0.9, la unidad indica identidad completa con la matriz del factor de transcripción de interés. En la **Figura 5** se muestran los sitios de unión que se encuentran en las posiciones relativas al SIT: -1046 a -1053, -545 a -552 y +110 a +117 pb.

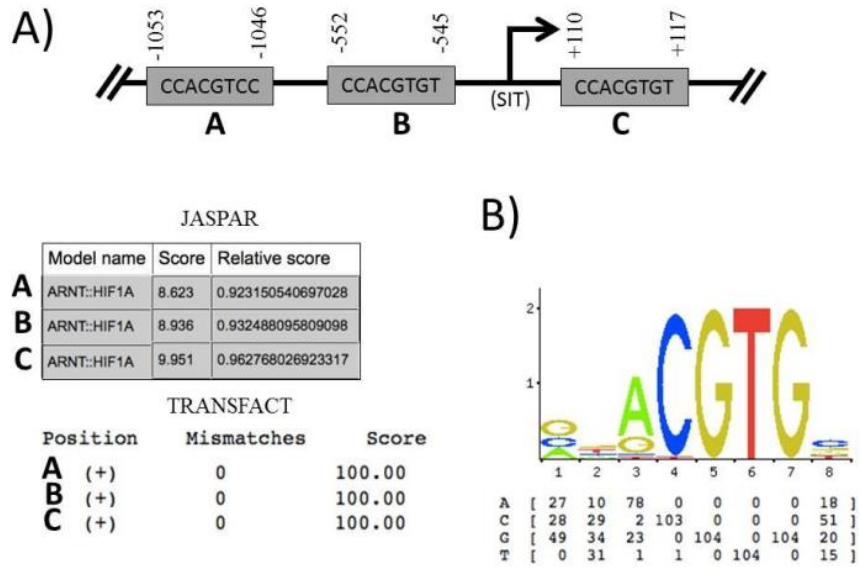


Figura 5. Análisis bioinformático de los sitios de unión para HIF-1 α en la secuencia promotora del gen CCR6. Se muestran los tres sitios de unión putativos para el factor de transcripción HIF-1 α obtenidos tras la búsqueda bioinformática usando el servidor en línea, JASPAR.

Resultados

El ambiente hipóxico induce la expresión de HIF-1 α y CCR6 y esta expresión correlaciona de manera positiva.

Se realizó una cinética en donde las células Ramos fueron expuesta a condiciones de hipoxia en diferentes tiempos (0, 1, 3, 6 y 9 h), para el ensayo se utilizaron 5×10^5 células por pozo. En los respectivos controles de normoxia se utilizaron el mismo número de células y los tiempos utilizados en hipoxia. Posterior a cada tiempo, las células fueron depositadas y fijadas en el portaobjetos para realizar tinciones de inmunocitoquímica de HIF-1 α y del receptor CCR6.

Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 6a**, en donde se muestran microfotografías representativas de la inmunotinción para HIF-1 α tanto en condiciones de normoxia, como en hipoxia. Se observa que este factor de transcripción se expresa de manera basal. Sin embargo, la expresión de HIF-1 α se incrementa en condiciones de hipoxia de manera clara principalmente a nivel nuclear. Mientras que en condiciones de normoxia también se observa un aumento conforme al tiempo, pero esta expresión es primordialmente a nivel citoplásmico.

El análisis morfométrico respectivo, muestra un incremento en la expresión total del factor HIF-1 α (**Figura 6a**) en condiciones de hipoxia, y al realizar el análisis correspondiente a núcleos positivos, existe un aumento estadísticamente significativo en la expresión a partir de las 3 h, en comparación con los estados de normoxia, este aumento se mantiene hasta las 9 h. La gráfica muestra el promedio relativo de la expresión de cuatro experimentos realizados de manera independiente (ANOVA $p < 0.001$) (**Figura 6b**).

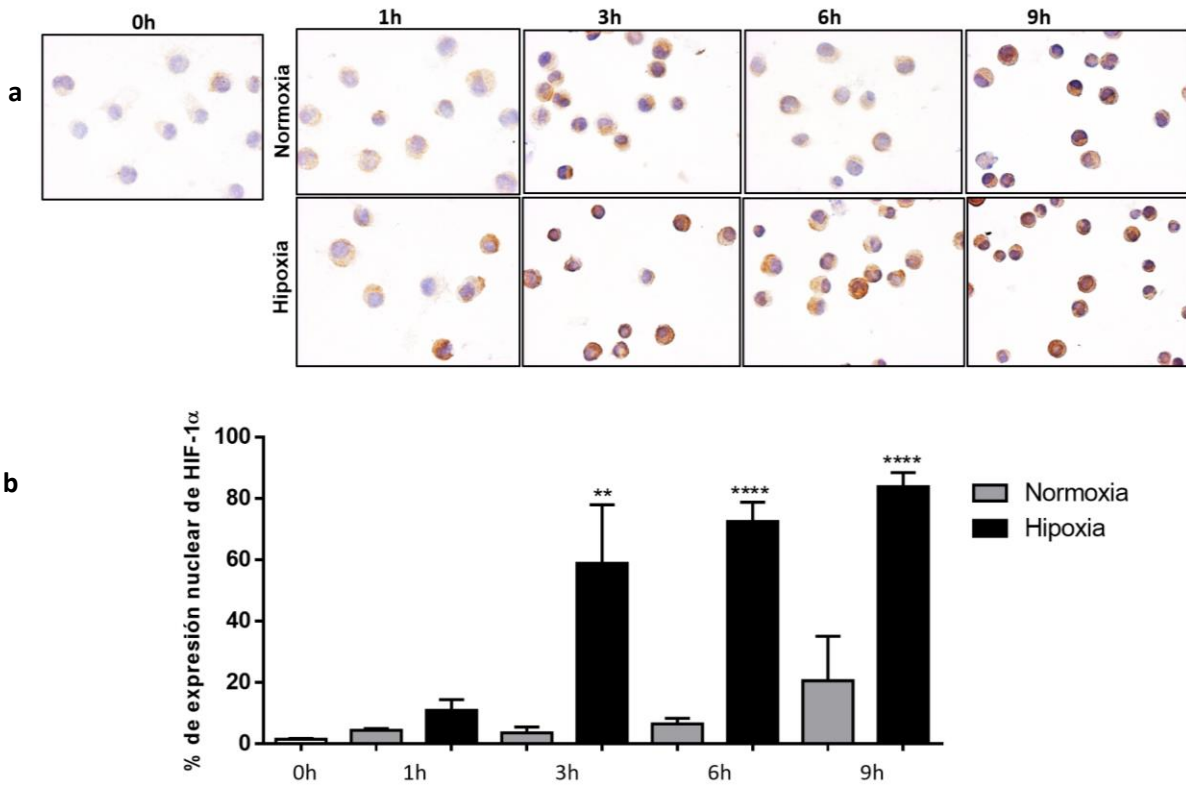


Figura 6. Condiciones de hipoxia inducen la expresión del factor HIF-1 α en la línea celular Ramos. El estado de hipoxia incrementa la expresión (A) y específicamente la expresión nuclear aumenta desde las 3 h (B). Magnificación 20x, n=4, ** p <0.01, **** p <0.0001 (ANOVA).

En el caso del receptor CCR6, se realizó la tinción en los mismos tiempos, encontrando que las condiciones de hipoxia incrementan la expresión de dicho receptor lo cual se puede observar en las microfotografías representativas presentadas en la **Figura 7a**, donde se muestra una tinción a nivel citoplasmático. Al realizar el análisis cuantitativo se comprobó que la expresión del receptor aumenta de manera significativa, desde las 6 h, teniendo como pico máximo de expresión las 9 h (**Figura 7b**).

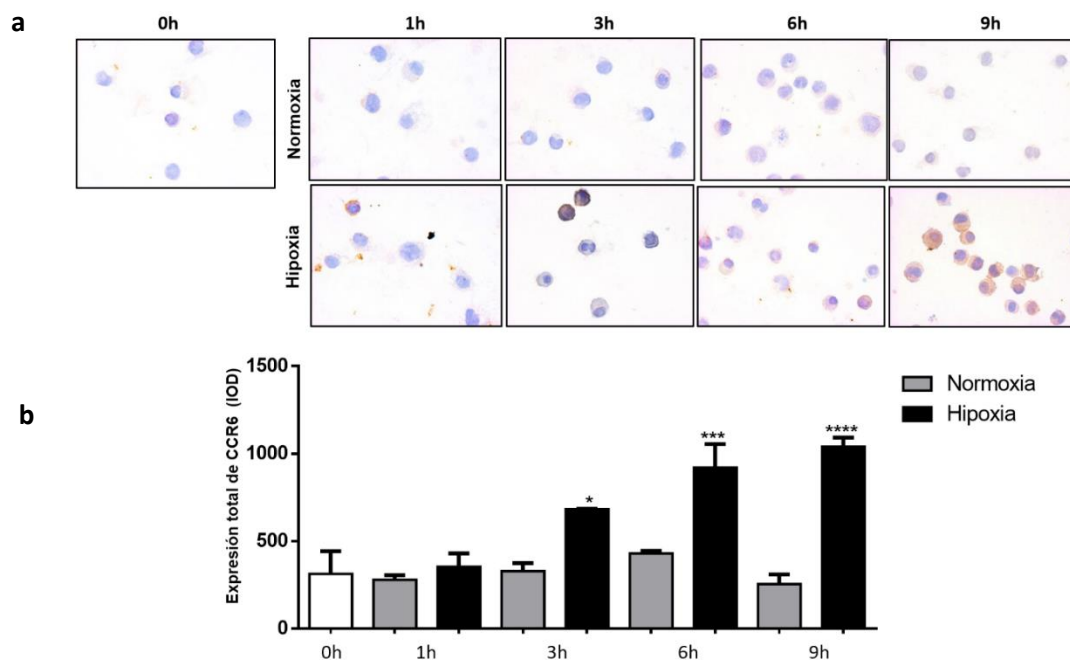


Figura 7. Condiciones de hipoxia incrementan la expresión del receptor CCR6 en la línea celular Ramos. El estado de hipoxia incrementa la expresión (a) y específicamente la intensidad de la expresión aumenta desde las 3 h, $n=3$ * $p<0.5$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ (ANOVA) (b). Magnificación 20x. IOD=Densidad óptica integrada.

Posteriormente, se realizó un análisis de correlación de Pearson, entre la expresión nuclear de HIF-1 α y la expresión de CCR6 expuestas en condiciones de hipoxia, en donde se observa que existe una correlación positiva, con una $p<0.001$ y una $r=0.9552$ (Figura 8).

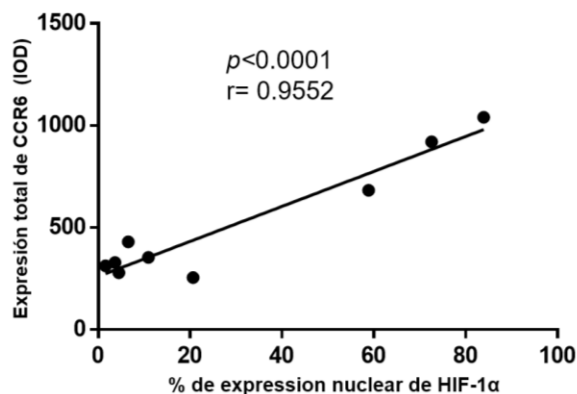


Figura 8. La expresión de HIF-1 α y de CCR6, en condiciones de hipoxia tiene una correlación positiva en la línea celular Ramos. Gráfica correspondiente al análisis de correlación r de Pearson $p<0.0001$ y $r=0.9552$. IOD=Densidad óptica integrada.

Con el propósito de corroborar nuestros resultados de inmunotinción que demuestran que la expresión de CCR6 aumenta en condiciones de hipoxia. Realizamos ensayos de RT-PCR en tiempo real en

células Ramos para medir la expresión relativa de los mRNA de CCR6 y CCL20 (proteína que se sabe es regulada de manera transcripcional por HIF-1 α), como control positivo, en condiciones de hipoxia y normoxia por 3 h, tiempo al que se observó un aumento en la expresión de HIF-1 α nuclear mediante inmunocitoquímica. Al realizar el análisis por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, observamos que existe un incremento significativo del mensajero de CCR6, incluso en mayor proporción, que el control positivo CCL20. La gráfica muestra un resultado representativo de cuatro experimentos realizados de manera independiente (**Figura 9**).

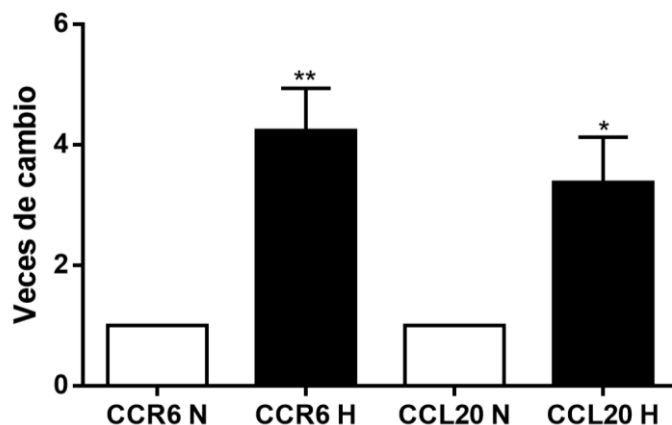


Figura 9. Expresión relativa de CCL20 y CCR6 en hipoxia (H). Se determinó mediante PCR en tiempo real la expresión relativa de CCL20 y CCR6 en hipoxia con relación a normoxia (N), se usó como control endógeno a TBP y se analizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para evaluar las veces de cambio. n=4 * p <0.5, ** p <0.01, (t-student).

Los estímulos proinflamatorios aumentan la expresión de HIF-1 α y de CCR6 y esta expresión correlaciona de manera positiva.

Se ha descrito que la expresión de HIF-1 α no sólo es regulada en condiciones de hipoxia, sino también en ambientes inflamatorios. Por lo que fue de nuestro interés, evaluar la inducción de HIF-1 α y CCR6, inducida por las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , para lo cual, primero realizamos una curva dosis respuesta en las células Ramos, se utilizaron 5×10^5 células por pozo y fueron tratadas por 24 h con las concentraciones de 0, 0.1, 1.0, 5.0, y 10.0 ng/mL para el caso de IL-1 β , y de 0, 5.0, 10.0, 20.0 y 50.0 ng/mL para TNF- α . Después de tratamiento las células fueron depositadas y fijadas en portaobjetos para realizar tinciones de inmunocitoquímica para HIF-1 α y CCR6.

Se observa que en el caso de tratamiento con IL-1 β existe un aumento de la expresión HIF-1 α principalmente a nivel nuclear y de CCR6 a nivel citoplásmico, como lo muestran las fotografías representativas presentadas en la **Figura 10a**. Al realizar el análisis cuantitativo, se observó que hay diferencia estadísticamente significativa para HIF-1 α y CCR6 a partir de 5 ng/mL en comparación con el control de células no tratadas, las gráficas muestran un resultado representativo de cuatro

experimentos realizados de manera independiente (ANOVA $p < 0.001$) **Figura 10b y 10c**. Los resultados de correlación de Pearson demostraron que la expresión de ambas proteínas correlaciona de manera directa ($p = 0.0233$ y $r = 0.9272$) (**Figura 10d**).

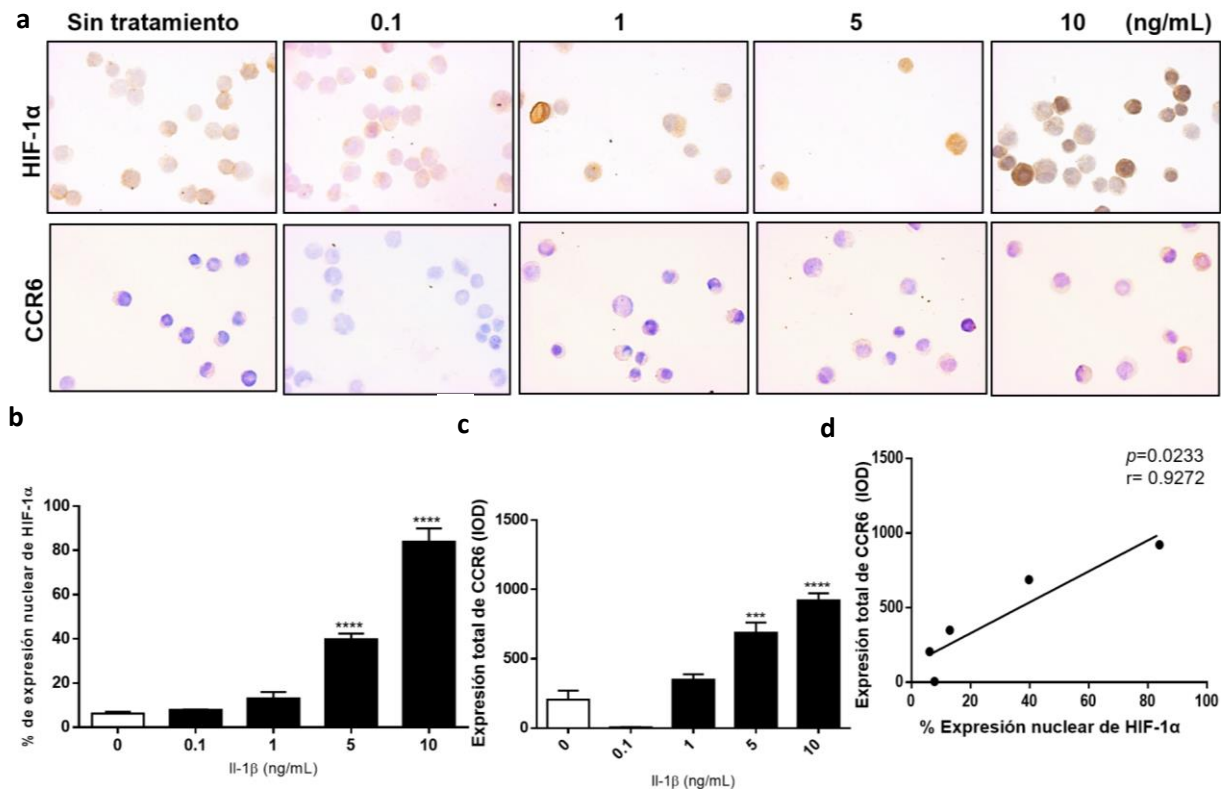


Figura 10. La expresión de HIF-1 α y de CCR6 se ve incrementada cuando las células son estimuladas por IL-1 β . a) Micrografías representativas de la tinción de HIF-1 α y CCR6 en las distintas concentraciones de IL-1 β . Magnificación 20x, n=4, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (ANOVA). b) Análisis correspondiente a la tinción nuclear de HIF-1 α . c) Análisis correspondiente a la tinción de CCR6. d) Gráfica correspondiente al análisis de correlación r de Pearson $p = 0.0233$ y $r = 0.9272$.

Cuando las células fueron tratadas con TNF- α , se observó un aumento en la expresión de HIF-1 α principalmente a nivel nuclear y de CCR6 a nivel citoplásmico, como lo muestran las fotografías representativas presentadas en la **Figura 11a**. Al realizar el análisis cuantitativo, se observó diferencia estadísticamente significativa para HIF-1 α y CCR6 a partir de 5 ng/mL en comparación con el control sin tratamiento, la gráfica representa un resultado representativo de cuatro experimentos realizados de manera independiente (ANOVA $p < 0.001$) (**Figura 11b y 11c**). El análisis de correlación de Pearson demostró que la expresión de ambas proteínas correlaciona de manera directa ($r = 0.9538$) (**Figura 11d**).

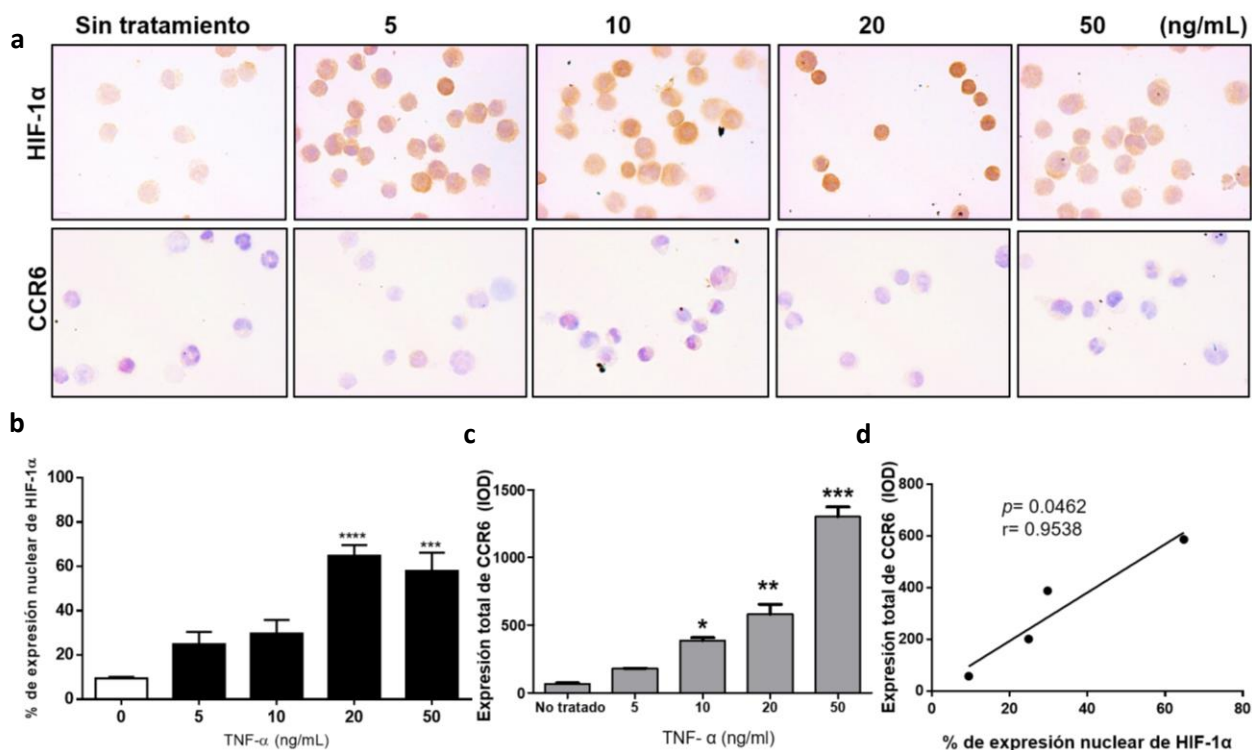


Figura 11. La expresión de HIF-1 α y de CCR6 se ve incrementada cuando las células son estimuladas por TNF- α . a) Micrografías representativas de la tinción de HIF-1 α y CCR6 en las distintas concentraciones de TNF- α . b) Análisis correspondiente a la tinción nuclear de HIF-1 α . Magnificación 20x, n=4, * p <0.5, ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.0001 (ANOVA). c) Análisis correspondiente a la tinción de CCR6. d) Gráfica correspondiente al análisis de correlación r de Pearson $p=0.0462$ y $r=0.9538$.

Finalmente, las células fueron tratadas con una combinación de las citocinas TNF- α (10 ng/mL) e IL-1 β (5 ng/mL), con el objetivo de saber si estas citocinas potenciaban la expresión de ambas proteínas. En la **Figura 12a** se presentan microfotografías representativas de la inmunotinción de HIF-1 α de las células Ramos tratadas o no con dicha combinación. En donde se puede observar de manera clara que la expresión de dicho factor de transcripción es principalmente a nivel nuclear. Los ensayos de RT-PCR demuestran que existe un aumento significativo del mensajero de CCR6 en condiciones inflamatorias. Las gráficas muestran un resultado representativo de tres experimentos realizados de manera independiente (t-student p <0.01) (**Figura 12b**).

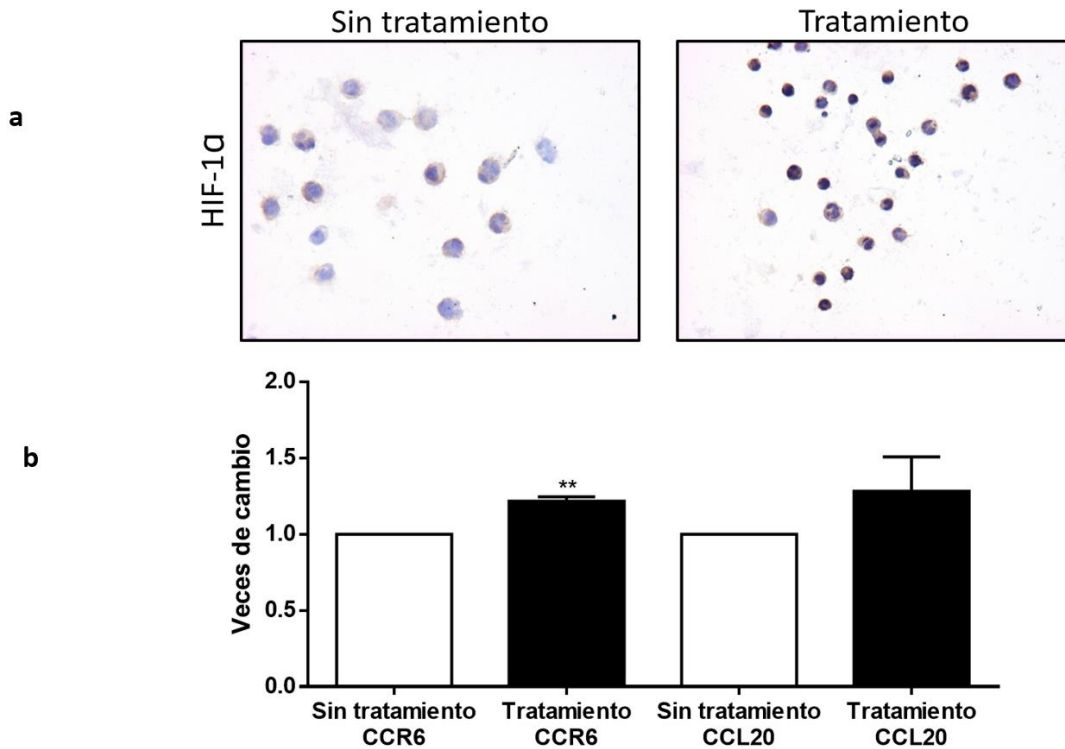


Figura 12. La combinación de TNF- α con IL-1 β promueve la expresión nuclear de HIF-1 α y el mRNA de CCR6. a) Micrografías representativas de la inmunotinción de HIF-1 α . b) Se determinó mediante PCR en tiempo real la expresión relativa de CCL20 y CCR6 en presencia de TNF- α (10 ng/mL) más IL-1 β (5 ng/mL), se usó como control endógeno a TBP y se analizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, para evaluar las veces de cambio. n=3 ** p <0.01 (t-student).

Evaluación de la expresión de HIF-1 α en tejidos de pacientes pediátrico con LNH

Se construyeron dos TMAs con 52 muestras parafinadas de ganglios de pacientes pediátricos con LNH. Posteriormente se realizaron cortes de 4 μ m, para las tinciones de inmunohistoquímica, con las que se evaluó la expresión de las proteínas HIF-1 α y CCL20. Se analizó la intensidad de la expresión total de la inmunotinción, y para el caso de HIF-1 α se evaluó también el número de núcleos positivos, ambos análisis se realizaron mediante patología digital.

La expresión de las proteínas se analizó en un equipo automatizado (Aperio®) que cuenta con un software para escanear tejidos y analizar células o núcleos positivos.

Los datos se agruparon por tipo de linfoma utilizando la siguiente clasificación: Linfoma de Burkitt (LB), Linfoma Linfoblástico (LL), Linfoma de Células grandes B (LCG), Linfoma Anaplásico (LA) e Hiperplasia Reactiva (HR) una lesión premaligna (**Figuras 13 y 14**). Las microfotografías representativas de las inmunotinciones en cada uno de los diferentes tipos de LNH, mostraron que existe una fuerte expresión de HIF-1 α a nivel citoplásmico y nuclear. Al evaluar de manera

cuantitativa mediante patología digital la expresión total de las proteínas HIF-1 α se observó que se encuentran aumentados de manera significativa en los diferentes tipos de LNH pediátricos en comparación con tejido de lesiones premalignas (HR), a nivel nuclear de HIF-1 α , lo cual es interesante ya que sugiere que se encuentra activado.

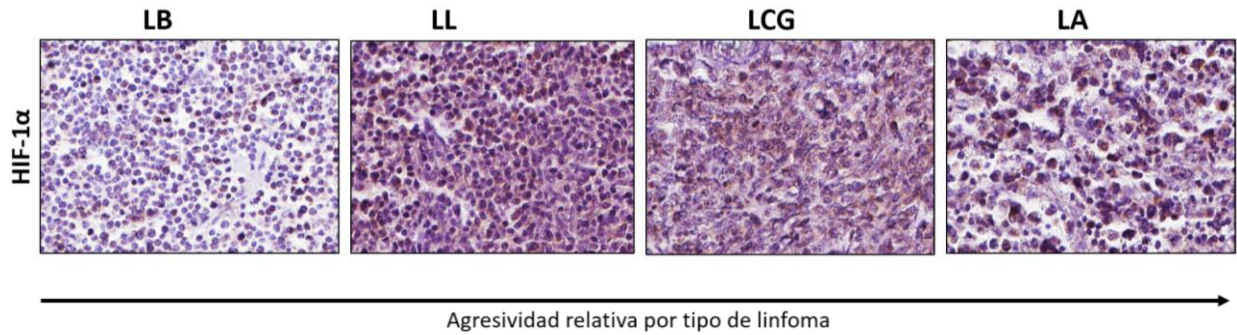


Figura 13. Micrografías representativas de la expresión del factor HIF-1 α en los diferentes tipos de LNH en las muestras de ganglios en los TMAs. LB=Linfoma de Burkitt, LL=Linfoma Linfoblástico, LCG=Linfoma de Células Grandes, LA=Linfoma Anaplásico. Magnificación 40x.

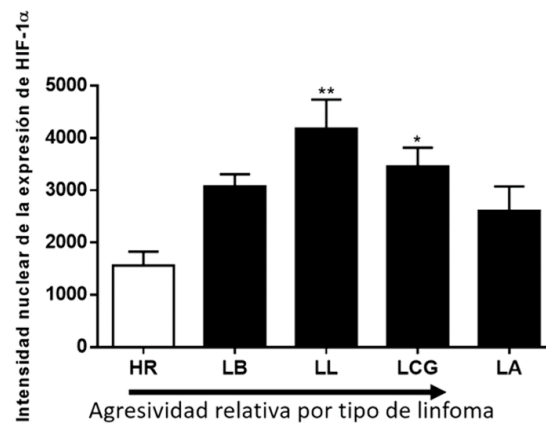


Figura 14. Análisis correspondiente a los TMA de LNH con tinción de HIF-1 α . a) Gráfica correspondiente a la tinción nuclear de HIF-1 α ($p < 0.01$). LB=Linfoma de Burkitt, LL=Linfoma Linfoblástico, LCG=Linfoma de Células Grandes, LA=Linfoma Anaplásico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Discusión

La expresión de las quimiocinas en el ambiente tumoral tiene un papel dual, ya que son importantes para el reclutamiento de linfocitos, macrófagos y células dendríticas, generando así un ambiente antitumoral; sin embargo, se ha visto que algunas quimiocinas que son secretadas por el tumor favorecen el crecimiento tumoral y la metástasis.

Una de las quimiocinas con más importancia en el cáncer es CCL20, dicha quimiocina está regulada positivamente por mediadores proinflamatorios y se expresa de manera prominente en el tejido mucosal (intestino y pulmones), hígado y timo, se secreta por neutrófilos, células Th17 y células mononucleares de sangre periférica. Debido a su expresión constitutiva en ausencia de activación directa por el sistema inmune, CCL20 también se postula para desempeñar papeles importantes en la homeostasis inmunológica. Por otro lado, CCR6 es expresado por células dendríticas derivadas de monocitos, células T de memoria y ciertas células B. El eje se ha destacado de manera sobresaliente en las células inmunitarias opuestas, Th17 y las células reguladoras, siendo ambas CCR6⁺. Esto conduce a la pregunta de cómo un sistema inmunológico puede controlar simultáneamente la inflamación y la modulación inmune⁴¹.

Por otro lado, el papel de HIF-1 en la regulación de la expresión de quimiocinas es muy importante para el reclutamiento de las células del sistema inmune hacia al tumor; sin embargo, también se ha descrito su participación en la invasión y metástasis a través de la regulación de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4, otra quimiocina que se ha relacionado con la metástasis es CCL20 y su receptor CCR6^{48,50}.

En el 2011 Dang E. *et al.* demostraron que HIF-1 favorece una respuesta Th17 por la regulación de ROR γ t y la degradación de la proteína Foxp3 (Factor de transcripción de células T reguladoras) durante el desarrollo de los linfocitos Th17, en un modelo de encefalitis autoinmune⁵¹. Esto llama la atención ya que podemos observar que la dualidad entre la inmunosupresión y la activación o inflamación no solo está presente a nivel del eje CCR6/CCL20, sino que es posible que HIF-1 lo pudiera estar induciendo.

Lo anterior sugiere que los factores que están determinando hacia donde se dirige la respuesta inmune, sean aquellos que inducen la expresión y/o activación de HIF-1, como son un ambiente hipóxico o uno proinflamatorio. Lo anterior puede dilucidar la implicación del eje HIF-1/CCR6/CCL20 en la fisiopatogénesis del LNH.

En este trabajo se utilizó un ambiente hipóxico y citocinas proinflamatorias como moduladores de la expresión de HIF-1 α , con el propósito de evaluar el papel de este factor de transcripción en la

expresión del receptor CCR6. Los resultados mostraron que el tratamiento de células Ramos tanto con hipoxia como con las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β a diferentes tiempos, tienen efectos sobre la expresión de CCR6. En las **Figuras 6 y 8**, se observó una mayor expresión de HIF-1 α nuclear que correlaciona de manera positiva con CCR6, después de cultivarlas en condiciones de hipoxia, en comparación con las células en normoxia. También, se encontró que el aumento de HIF-1 α correlaciona con el aumento del mRNA de CCR6 sugiriendo una posible regulación en las condiciones mencionadas.

Por otro lado, al realizar estímulos inflamatorios con IL-1 β (**Figura 10**) este trabajo demuestra que existe una regulación de la expresión de CCR6 en este estímulo, pues se observó una mayor expresión de HIF-1 α nuclear que correlaciona de manera positiva con CCR6 en comparación con las células no tratadas. Se observa dentro de dichos resultados que la expresión de CCR6 en 0.1 ng de IL-1 β /mL (**Figura 10b**), disminuye en comparación con las células no tratadas, a pesar de que la regulación de CCR6 es un campo poco explorado, se podría sugerir una autorregulación de dicho receptor⁵².

En el caso del estímulo con TNF- α (**Figura 11**), se demostró que también existe un incremento de la expresión de CCR6 que correlaciona positivamente con la expresión nuclear de HIF-1 α , dichos resultados obtenidos corresponderían a la primera evidencia en células cancerosas donde se muestra que en condiciones inflamatorias como es la presencia de IL-1 β y TNF- α se induce un incremento de CCR6 (de acuerdo con una extensa revisión de la literatura).

De manera interesante, los resultados no sólo demuestran que existe un incremento proteico de CCR6 en inflamación, también se encontró que el aumento de HIF-1 α correlaciona positivamente con el aumento del mRNA de CCR6 en un ambiente proinflamatorio dado por la presencia de las citocinas ya mencionadas en combinación, sugiriendo una posible regulación. Cabe destacar que experimentos adicionales de plásmidos reporteros e inmunoprecipitación de cromatina son necesarios para poder afirmar lo anterior. Es importante mencionar que en la quimiocina usada como control, CCL20, no existe un aumento significativo, lo cual puede deberse a que probablemente el tiempo de estimulación no es suficiente para que la expresión del mensajero aumente⁵³, o también a que se ha descrito que la expresión de los genes regulados por HIF-1 α puede ser dependiente del estímulo inflamatorio o hipóxico⁵⁴.

Estos resultados toman relevancia de evaluar al observar que, en tejidos de pacientes pediátricos con LNH existe la sobreexpresión de HIF-1, los resultados obtenidos demuestran que existe una diferencia estadísticamente significativa de la expresión nuclear de HIF-1 α (lo cual se traduce como actividad del factor de transcripción) en pacientes con LNH en comparación con biopsias de hiperplasia reactiva. Experimentos adicionales, así como el correlacionar con los datos de la expresión

de estas proteínas con los datos clínicos, son requeridos para poder evaluar una posible implicación biológica de HIF-1 α en la regulación de CCL20 y de CCR6.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en conjunto demostraron que la activación de HIF-1 α induce la expresión de CCR6 tanto a nivel proteico como a nivel de mRNA en una línea celular de LNH pediátrico.

Se demostró que la expresión de HIF-1 α aumenta de manera significativa en los LNH pediátrico de mayor agresividad. Lo cual sugiere que este factor participa de manera importante en la fisiopatogénesis de LNH pediátrico, estos resultados son consistentes con lo reportado anteriormente por nuestro grupo de trabajo, lo cual sugiere que HIF-1 α podría estar regulando a CCR6.

Referencias

1. Globocan 2012 International Agency for Research on Cancer WHO. (2012). Available at: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. (Accessed: 6th April 2018)
2. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, P. P. T. E. *Childhood Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries* (National Cancer Institute (US), 2002).
3. INEGI. *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos nacionales.* (2018).
4. Rivera-Luna, R. *et al.* Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer* **14**, 790 (2014).
5. American Cancer Society. *Linfoma no Hodgkin en niños. Cancer.org* (2014).
6. Leukemia & Lymphoma Society. *Linfoma de Hodgkin.* 44 (2014).
7. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2018. American Cancer Society* (2018). doi:10.1182/blood-2015-12-687814
8. Gross, T. G. & Termuhlen, A. M. Pediatric non-Hodgkin lymphoma. *Current Hematologic Malignancy Reports* **3**, 167–173 (2008).
9. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, P. P. T. E. *Childhood Non-Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries* (National Cancer Institute (US), 2002).
10. Molyneux, E. M. *et al.* Burkitt's lymphoma. *Lancet (London, England)* **379**, 1234–44 (2012).
11. Cortelazzo, S., Ferreri, A., Hoelzer, D. & Ponzoni, M. Lymphoblastic lymphoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **113**, 304–317 (2017).
12. Pillon, M. *et al.* Primary mediastinal large B-cell lymphoma: Outcome of a series of pediatric patients treated with high-dose methotrexate and cytarabine plus anti-CD20. *Pediatr. Blood Cancer* **65**, e26855 (2018).
13. HIMGF. *Protocolo de manejo para pacientes pediátricos con Linfoma No Hodgkin.*
14. Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A. & Cavalli, F. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet* **390**, 298–310 (2017).
15. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 172–184 (2015).
16. Huang, Y., Lin, D. & Taniguchi, C. M. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe? *Sci. China Life Sci.* **60**, 1114–1124 (2017).
17. Masoud, G. N. & Li, W. HIF-1?? pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **5**, 378–389 (2015).

18. Harris, A. L. HYPOXIA — A KEY REGULATORY FACTOR IN TUMOUR GROWTH. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 38–47 (2002).
19. Soni, S. & Padwad, Y. S. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol. (Madr)*. **56**, 503–515 (2017).
20. Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–899 (2004).
21. Courtney, R. *et al.* Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular biology reports* (2015). doi:10.1007/s11033-015-3858-x
22. Minoia, C. *et al.* Changes in angiogenesis and hypoxia-inducible factor-1 α protein expression in relapsed/refractory indolent non-Hodgkin lymphomas. *Br. J. Haematol.* **163**, 640–645 (2013).
23. Lu, R. *et al.* Lactate dehydrogenase 5 expression in Non-Hodgkin lymphoma is associated with the induced hypoxia regulated protein and poor prognosis. *PLoS One* **8**, e74853 (2013).
24. Ke, Q. & Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* **70**, 1469–1480 (2006).
25. Keith, B. & Simon, M. C. Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. *Cell* **129**, 465–472 (2007).
26. Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L. & Dang, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**, 177–185 (2006).
27. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–13 (1996).
28. Chen, N. *et al.* BCL-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1{alpha}. *J. Biol. Chem.* **284**, 10004–12 (2009).
29. Diao, X. W., Feng, J. Y., Wang, Q. W., Sun, J. G. & Chen, Z. T. SDF-1/CXCR4 axis promotes prostate cancer cell invasion and bone metastasis through p38, NF- κ B and HIF-1 α pathways. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **9**, 2706–2717 (2016).
30. Koslowski, M., Luxemburger, U., Türeci, O. & Sahin, U. Tumor-associated CpG demethylation augments hypoxia-induced effects by positive autoregulation of HIF-1 α . *Oncogene* **30**, 876–82 (2011).
31. Nigim, F. *et al.* Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 α in a New Orthotopic Model of Glioblastoma Recapitulating the Hypoxic Tumor Microenvironment. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74**, 710–722 (2015).
32. Samanta, D., Gilkes, D. M., Chaturvedi, P., Xiang, L. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E5429–E5438 (2014).

33. Silveira, V. S. *et al.* Hypoxia-related gene expression profile in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic implications. *Leuk. Lymphoma* **8194**, 1–7 (2014).
34. Hernandez-Luna, M. a, Rocha-Zavaleta, L., Vega, M. I. & Huerta-Yepe, S. Hypoxia inducible factor-1 α induces chemoresistance phenotype in non-Hodgkin lymphoma cell line via up-regulation of Bcl-xL. *Leuk. Lymphoma* **54**, 1048–55 (2013).
35. Méndez-Maldonado, K. *et al.* Hypoxia inducible transcription factor (HIF-1) regulates CXCL13 expression: Clinical implications in pediatric non-Hodgkin’s lymphoma. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **71**, 25–35 (2014).
36. Nizet, V. & Johnson, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature Reviews Immunology* **9**, 609–617 (2009).
37. Nishi, K. *et al.* LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 983–95 (2008).
38. Qiao, Q., Nozaki, Y., Sakoe, K., Komatsu, N. & Kirito, K. NF- κ B mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma. *Exp. Hematol.* **38**, 1199–1208 (2010).
39. Golay, J. & Introna, M. Chemokines and antagonists in non-Hodgkin’s lymphoma. *Expert Opin. Ther. Targets* **12**, 621–635 (2008).
40. Schutyser, E., Struyf, S. & Van Damme, J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 409–426 (2003).
41. Lee, A. Y. S., Phan, T. K., Hulett, M. D. & Körner, H. The relationship between CCR6 and its binding partners: Does the CCR6–CCL20 axis have to be extended? *Cytokine* **72**, 97–101 (2015).
42. Kulkarni, N. *et al.* CCR6 signaling inhibits suppressor function of induced-Treg during gut inflammation. *J. Autoimmun.* **88**, 121–130 (2018).
43. Li, X.-P. *et al.* Co-expression of CXCL8 and HIF-1 α ; is associated with metastasis and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **6**, 22880–9 (2015).
44. Ye, L. Y. *et al.* Hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma induces an immunosuppressive tumor microenvironment to promote metastasis. *Cancer Res.* **76**, 818–830 (2016).
45. Nandi, B. *et al.* CCR6, the sole receptor for the chemokine CCL20, promotes spontaneous intestinal tumorigenesis. *PLoS One* **9**, (2014).
46. Wang, L. *et al.* Overexpression of CCL20 and its receptor CCR6 predicts poor clinical prognosis in human gliomas. *Med. Oncol.* **29**, 3491–3497 (2012).
47. Ghadjar, P. *et al.* Chemokine receptor CCR6 expression level and aggressiveness of prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **134**, 1181–1189 (2008).
48. Rodig, S. J., Jones, D., Shahsafaei, A. & Dorfman, D. M. CCR6 is a functional chemokine

- receptor that serves to identify select B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum. Pathol.* **33**, 1227–1233 (2002).
49. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 50. Ikeda, S. *et al.* Disruption of CCL20-CCR6 interaction inhibits metastasis of advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Oncotarget* **7**, 13563–74 (2016).
 51. Dang, E. V. *et al.* Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell* **146**, 772–784 (2011).
 52. Jin, P. *et al.* Astrocyte-derived CCL20 reinforces HIF-1-mediated hypoxic responses in glioblastoma by stimulating the CCR6-NF- κ B signaling pathway. *Oncogene* (2018). doi:10.1038/s41388-018-0182-7
 53. Kennedy-Crispin, M. *et al.* Human keratinocytes' response to injury upregulates CCL20 and other genes linking innate and adaptive immunity HHS Public Access. *J Invest Dermatol* **132**, 105–113 (2012).
 54. Stasinopoulos, I., O'Brien, D. R. & Bhujwala, Z. M. Inflammation, but not hypoxia, mediated HIF-1alpha activation depends on COX-2. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 31–5 (2009).