



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Determinación de la expresión del factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1) en tumores de meduloblastoma pediátricos: implicaciones clínicas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Q.F.B. DIEGO ANAYA ESTRADA

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. José Pedraza Chaverri  
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Aliesha Araceli González Arenas  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Guillermina Juliana Baay Guzmán  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Ciudad de México. Septiembre, 2022



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.

## Índice

Índice.....	2
Índice de Figuras.....	4
Índice de Tablas.....	4
Abreviaturas.....	5
1. Resumen.....	6
2. Marco teórico.....	7
2.1. Cáncer.....	7
2.2. Epidemiología del cáncer.....	7
2.3. Meduloblastoma.....	8
2.4. Clasificación del meduloblastoma.....	9
2.5. Subclasificación Molecular del meduloblastoma.....	10
2.5.1. Meduloblastoma vía WNT activada.....	10
2.5.2. Meduloblastoma SHH activado.....	10
2.5.3. Meduloblastoma SHH activado, TP53 mutante.....	12
2.5.4. Meduloblastoma no-WNT/no-SHH.....	13
2.6. Estratificación de riesgo actual del meduloblastoma.....	15
2.7. Factor inducible en hipoxia 1.....	17
2.8. El factor de transcripción HIF-1 en cáncer.....	19
3. Planteamiento de problema.....	21
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos.....	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos específicos.....	22
6. Material y métodos.....	23
6.1. Materiales y reactivos.....	23
6.1.1. Inmunohistoquímica.....	23
6.1.2. Medición del mRNA.....	23
6.2. Metodología.....	24
6.2.1. Pacientes.....	24
6.2.2. Determinación del mRNA.....	25
Extracción de RNA.....	25

Síntesis de cDNA.....	26
qRT-PCR .....	27
6.2.3. Microarreglos de tejidos (MATs) .....	27
6.2.4. Inmunohistoquímica (IHQ) .....	28
6.2.5. Patología digital .....	29
6.2.6. Análisis estadístico .....	30
7. Resultados .....	31
Objetivo 1. Cuantificación de la expresión del mRNA de HIF-1 $\alpha$ en tejidos de pacientes pediátricos con MB. ....	31
7.1.1. El nivel del mRNA de HIF-1 $\alpha$ no presenta diferencias entre los subgrupos de MB pediátrico. ....	31
Objetivo 2. Evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ en tejidos de pacientes pediátricos con meduloblastoma.....	34
7.2.1. Inmunorreactividad diferencial de la proteína HIF-1 $\alpha$ en muestras de pacientes pediátricos con meduloblastoma. ....	34
7.2.2 La proteína HIF-1 $\alpha$ no presenta expresión diferencial en pacientes pediátricos con meduloblastoma. ....	38
7.2.3. Los subgrupos moleculares presentan diferencias en el porcentaje de células HIF-1 $\alpha$ núcleo positivas. ....	41
Objetivo 3. Evaluar la asociación de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ con los diferentes datos clínicos.....	45
7.3.1. La expresión nuclear de HIF-1 $\alpha$ se asocia con riesgo estándar y muerte. ....	45
8. Discusión.....	52
10. Resumen de resultados.....	57
11. Conclusiones.....	57
12. Perspectivas.....	58
13. Referencias .....	58

## Índice de Figuras

Figura 1. Vías desreguladas en meduloblastoma WNT y SHH. ....	11
Figura 2. Resumen gráfico de los subgrupos de meduloblastoma. ....	14
Figura 3. Regulación del factor de transcripción HIF-1. ....	18
Figura 4. Microarreglos de tejidos de muestras de meduloblastoma pediátrico. ....	28
Figura 5. Subclasificación molecular de los pacientes con MB y niveles de expresión de mRNA de HIF-1 $\alpha$ en tejidos de pacientes con MB. ....	32
Figura 6. Tinciones de H&E e inmunorreactividad de la proteína HIF-1 en muestras de meduloblastoma pediátrico. ....	35
Figura 7. Inmunorreactividad de la proteína HIF-1 en muestras de meduloblastoma pediátrico. ....	38
Figura 8. Determinación de la intensidad de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ en muestras de pacientes pediátricos con meduloblastoma. ....	40
Figura 9. Cuantificación del número de células HIF-1 $\alpha$ positivas en muestras de pacientes pediátricos con meduloblastoma. ....	44
Figura 10. Cuantificación nuclear de células HIF-1 $\alpha$ positivas, clasificado por sexo. ....	46
Figura 11. Cuantificación nuclear de células HIF-1 $\alpha$ positivas, clasificado por grupos de edad. ....	47
Figura 12. Cuantificación nuclear de células HIF-1 $\alpha$ positivas, clasificado por subgrupo molecular. ....	48
Figura 13. Cuantificación nuclear de células HIF-1 $\alpha$ positivas, clasificado por grupo de riesgo. ....	49
Figura 14. Cuantificación nuclear de células HIF-1 $\alpha$ positivas, clasificado por recaída. ....	50
Figura 15. Cuantificación nuclear de células HIF-1 $\alpha$ positivas, clasificado por sobrevida. ....	51

## Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación del pronóstico para meduloblastomas pediátricos conforme a los subgrupos moleculares. (Thomas & Noël, 2019) ....	16
Tabla 2. Implicación de HIF-1 en diferentes tipos de cáncer. ....	20

## Abreviaturas

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>A/CG</b>	Anaplásico/Células Grandes
<b>DN</b>	Desmoplásico Nodular
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EDHB</b>	Etil 3,4-dihidroxibenzoato
<b>GB</b>	Glioblastoma
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina / Eosina
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral
<b>HIF-1</b>	Factor inducible en hipoxia 1
<b>HRE</b>	Elementos respondedores de hipoxia
<b>MALT</b>	Mucosas asociadas a tejido linfoide
<b>MB</b>	Meduloblastoma
<b>MBEN</b>	Meduloblastoma de Extensa Nodularidad
<b>mRNA</b>	Mensajero de Ácido Ribonucleico
<b>MYC</b>	Oncogén celular homólogo a virus mielocitomatosis
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>SHH</b>	Sonic Hedgehog
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TAM</b>	Macrófagos Asociados a Tumor
<b>TME</b>	Microambiente Tumoral
<b>WNT</b>	Wingless e int-1

## 1. Resumen

Las neoplasias del sistema nervioso central (SNC) son la tercera causa de cáncer infantil, siendo el meduloblastoma (MB) el tumor cerebral maligno más común, con aproximadamente el 20%. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasifica dentro del grupo de los tumores embrionarios y tradicionalmente el diagnóstico se ha establecido por evaluación histopatológica. Sin embargo, en el 2016 se actualizó esta clasificación, dividiéndola en 4 subgrupos moleculares, para lo que se requiere la combinación de variantes histológicas y genéticas definidas en un diagnóstico integral como un estándar.

Pese a los esfuerzos para clasificar adecuadamente este tipo de tumores aún es necesario dilucidar en los diferentes subgrupos de MB como se encuentra el microambiente tumoral (TME) y que participación tiene en la fisiopatología de esta neoplasia. Uno de los componentes importantes del TME es la hipoxia la cual activa al factor de transcripción inducible en hipoxia 1 (HIF-1), el cual es muy importante en la homeostasis y se ha descrito en cáncer como un factor de mal pronóstico asociado a baja sobrevida y resistencia a quimioterapia y radioterapia.

En este estudio se realizaron tinciones de inmunohistoquímica de la proteína HIF-1 $\alpha$  en 41 muestras de pacientes pediátricos con MB incluidas en microarreglos de tejidos (MATs). Se encontraron diferencias en los porcentajes de núcleos positivos a HIF-1 $\alpha$  en las células entre los cuatro subgrupos moleculares de MB, teniendo al subgrupo molecular WNT como el que tiene los porcentajes más elevados, seguido por Grupo 4, SHH y Grupo 3. También se observaron que los pacientes que fallecieron tienen mayores porcentajes de HIF-1 comparado con los que sobrevivieron, lo cual sugiere que existe una relación entre los niveles de HIF-1 y la sobrevida. Por último, se encontraron diferencias entre los porcentajes de expresión de HIF-1 en los pacientes con riesgo estándar y alto riesgo, observando que todos aquellos pacientes clasificados como riesgo estándar presentan niveles elevados de HIF-1, mientras que los pacientes clasificados como alto riesgo tienen menores porcentajes del factor de transcripción.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Cáncer**

El cáncer es un conjunto de diversas enfermedades que se caracterizan por un crecimiento descontrolado de células con el potencial de convertirse en malignas a través de la adquisición de características aberrantes (potencial replicativo sin límite, autosuficiencia en señales de crecimiento, evasión de apoptosis, angiogénesis sustentable, evasión del sistema inmune, entre otros) durante su desarrollo, como resultado de factores ambientales o genéticos (1).

Puede surgir en cualquier tejido del cuerpo, además de que la adquisición de características malignas puede llevar al tumor a invadir tejidos circundantes o distantes, lo que se conoce como metástasis. Un porcentaje importante de neoplasias pueden tratarse mediante cirugía, quimioterapia y/o radioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana (1,2).

### **2.2. Epidemiología del cáncer**

En el 2020 el Globocan (Global Cancer Observatory) reportó a nivel mundial una prevalencia de 50,550,287 casos de cáncer, y una incidencia de 19,292,789 nuevos casos, así como 9,958,133 defunciones por cáncer (3). Específicamente en México, se informó una prevalencia de 530,602 casos, con una incidencia de 195,499 nuevos casos, así como 90,222 defunciones (4).

Particularmente, para el cáncer infantil se estima que en nuestro país existen anualmente entre 5,000 y 7,000 nuevos casos en menores de 18 años y representa la principal causa de muerte por enfermedad entre los 5 y 14 años de edad, cobrando más de 2,000 vidas anuales. De acuerdo con los registros del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA), la supervivencia global estimada a 5 años de todos los tipos de cáncer en menores de edad es del 56% (5). Y los tumores en el sistema nervioso central (SNC) representa el 1.6% de



los nuevos casos de cáncer tanto en México como en el mundial (3,4). Siendo los tumores cerebrales pediátricos una de las principales causas de mortalidad en niños (6).

El meduloblastoma (MB), es uno de los tumores que afecta al SNC, representa el 63% de tumores embrionarios intracraneales y tiene una incidencia anual de 5 casos por cada millón de individuos. Las cúspides de incidencia se presentan en los grupos de edad de 1-4 años y de 5-9 años, con una edad media de diagnóstico de 6 años, raramente el meduloblastoma es diagnosticado en adultos. En general, es más común en hombres que en mujeres, con una proporción de 1.8:1 (hombres:mujeres), aunque la predominancia de sexo varía entre los subgrupos de MB. Aproximadamente el 18% de pacientes desarrollan neoplasias subsecuentes durante los 30 años posteriores al diagnóstico, lo cual puede parcialmente ser explicado por predisposición hereditaria. No se ha descrito alguna diferencia sustancial en la incidencia del meduloblastoma a través de las regiones étnicas o geográficas (7).

### **2.3. Meduloblastoma**

El meduloblastoma es el tumor cerebelar maligno más común en niños, en nuestro país representa aproximadamente el 20% de tumores cerebrales pediátricos (8–10), siendo diagnosticado principalmente entre los 6-8 años de edad y antes de los 19 años (7,10,11). En adultos entre la tercera y cuarta décadas de la vida se presenta con menor frecuencia, constituyendo el 1% de las neoplasias del SNC (12).

Se define como un tumor embrionario neuroepitelial que se localiza preferentemente en la fosa posterior, de color gris a púrpura, consiste en un cúmulo de células indiferenciadas densamente compactadas con pleomorfismo nuclear ligero a moderado y un alto índice mitótico (11,12). Actualmente se acepta que este tumor se origina de los precursores de las células granulares del cerebelo, de la

zona ventricular y de los precursores neuronales de la porción dorsal del puente; fue descrito por primera vez por Bailey y Cushing en 1925 (12,13).

## **2.4. Clasificación del meduloblastoma**

La OMS lo clasifica dentro del grupo de los tumores embrionarios del SNC Grado IV (12). Que se caracterizan por su rápido crecimiento con alta tasa mitótica, pudiendo presentar vasos de neoformación y áreas de necrosis.

Tradicionalmente, el diagnóstico ha sido establecido por evaluación histopatológica, reconociendo la OMS cinco variantes histológicas de acuerdo con su morfología: 1.- Clásico; 2.-Desmoplásico/Nodular (DN); 3.- Meduloblastoma con Nodularidad Extensa (MBNE); 4.- Células Grandes (CG); y 5.- Anaplásico (A) (estos dos últimos se combinaron después en una categoría histopatológica como (CG/A).

Sin embargo, estas variantes histológicas reflejan parcialmente una heterogeneidad subyacente molecular, y no es posible por morfología establecer a que grupo genético corresponden.

En el 2017 con el conjunto de parámetros moleculares para la clasificación de tumores del SNC, la OMS ha reconocido 4 subgrupos moleculares de meduloblastomas genéticamente definidos: WNT (Wingless), SHH (Sonic Hedgehog), Grupo 3 y Grupo 4 (8,14,15), y la actualización más reciente de la clasificación de tumores del SNC de la OMS del 2021 dicta que para hacer el diagnóstico molecular de los MB se incluyan las siguientes determinaciones: diagnóstico histológico, además de una clasificación por técnicas de inmunohistoquímica, biología molecular y evaluación de genes específicos. A la combinación de estudios se le denomina diagnóstico integral y se recomienda como estándar para el diagnóstico debiendo de realizar el mayor número de técnicas posibles (7,11).

## 2.5. Subclasificación Molecular del meduloblastoma

### 2.5.1. Meduloblastoma vía WNT activada

Éste representa el subgrupo más raro constituyendo aproximadamente el 10% de todos los meduloblastomas. Tiene un resultado favorable comparado con los otros subgrupos, afecta principalmente a los niños y adolescentes, y presenta una ligera predominancia en niñas. Se considera que los meduloblastomas WNT surgen de las células progenitoras del tallo cerebral dorsal (16), y son localizados normalmente en la línea media del cerebro, y ocupan el cuarto ventrículo. Raramente presentan metástasis (17).

Los tumores con la vía WNT activa son identificados por la presencia de al menos dos características: una mutación en el gen  $\beta$ -Catenina (CTNNB1, Catenin beta-1), la cual puede ser identificada mediante una reacción de inmunohistoquímica nuclear positiva de  $\beta$ -catenina y la presencia de monosomía del cromosoma 6 (15,18–20). Es frecuente encontrar mutaciones sin sentido en la proteína tumoral 53 (TP53, Tumor Protein 53). A pesar de ser un marcador de alto riesgo en el subgrupo SHH y en otros tipos de cáncer, las mutaciones en TP53 no confieren diferencia alguna en la sobrevida de los pacientes diagnosticados con meduloblastomas WNT activado (21,22).

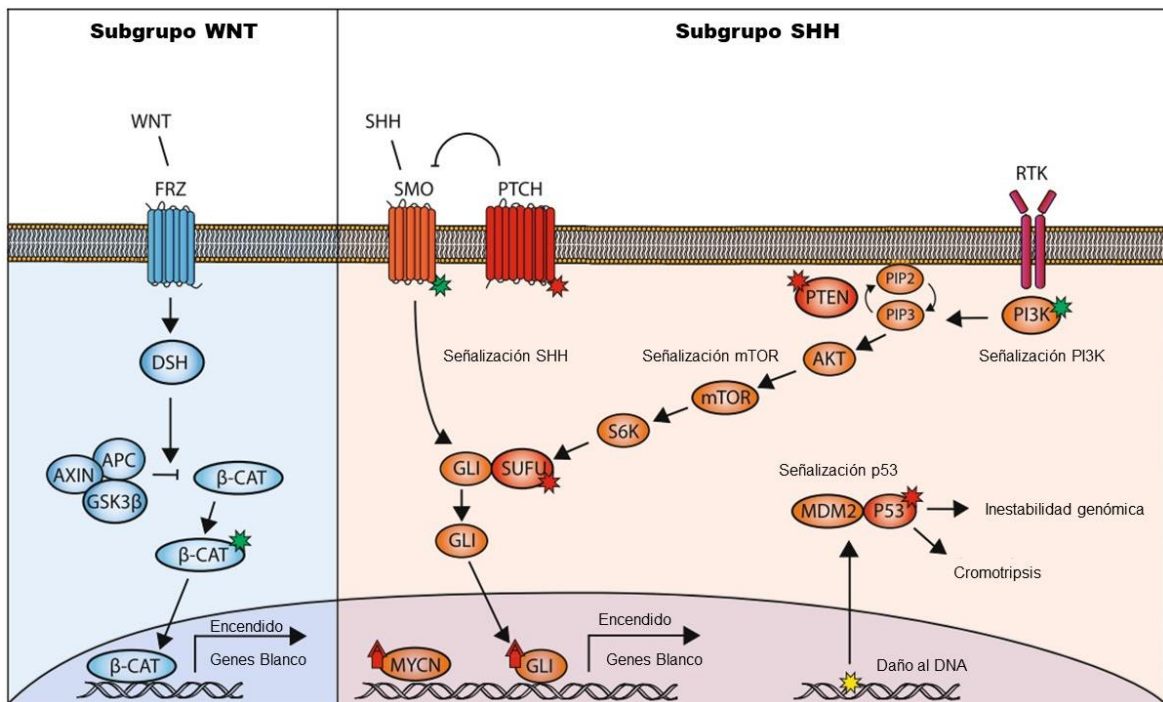
### 2.5.2. Meduloblastoma SHH activado

Cerca del 30% de todos los MB se clasifican como tumores Sonic Hedgehog (SHH), los cuales se localizan a menudo lateralmente en el hemisferio cerebelar, hay evidencia de que se originan de las células precursoras de la capa granular externa del cerebelo (16). Generalmente se presenta en niños de 4 años o menos. La hiperactivación de la vía de señalización Sonic Hedgehog es característica en este subgrupo y es frecuente debido a mutaciones en los genes supresores de tumores Patched (PTCH), Smoothened (SMO), y el supresor de homólogo

fusionado (SUFU) (16,21,23). Además, se asocian a menudo a la pérdida del cromosoma 9q, y con menos frecuencia con la pérdida del 17p o 10q, o la ganancia de 3q (17).

La vía SHH juega un papel crítico en el desarrollo cerebelar normal. El ligando SHH es secretado por las neuronas de Purkinje, y promueve la mitogénesis en células progenitoras de capas granulares externas. La respuesta a la señal SHH es controlada por PTCH y SMO, las cuales son proteínas transmembranales. La proteína PTCH suprime la actividad de SMO en la ausencia del ligando SHH (23).

Los tumores con SHH activo son determinados por la presencia de una reacción de inmunohistoquímica del regulador transcripcional asociado a Yes1 (YAP1) y la proteína 1 de unión asociada a GRB2 (GAB1) (18,19).



**Figura 1. Vías desreguladas en meduloblastoma WNT y SHH.**

Los pacientes Wingless e Int (WNT) tienen una alteración de activación en  $\beta$ -Catenina ( $\beta$ -CAT) la cual promueve su estabilización y permite la sobreexpresión de sus genes blancos. Las alteraciones en el subgrupo Sonic Hedgehog (SHH) ocurren en la vía de señalización Shh, así como, las vías cooperadoras Fosfoinositol 3-cinasa/ Diana de rapamicina en células de mamífero (PI3K/mTOR) y convergen con la sobreexpresión del Oncogen asociado a glioma (GLI). (21)

*Frizzled (FRZ), Dishevelled (DSH), Factor supresor tumoral (adenomatous polyposis coli tumor) (APC), Glucógeno-sintetasa-cinasa (GSK3 $\beta$ ).*

*Smoothened (SMO), Patched (PTCH), Supresor de homólogo fusionado (SUFU), Receptor tirosina cinasa (RTK), Fosfatidilinositol bisfosfato (PIP2), Fosfatidilinositol trisfosfato (PIP3), Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), Proteína cinasa B (AKT), cinasa 6S (S6K), Doble minute murino 2 (MDM2).*

### 2.5.3. Meduloblastoma SHH activado, TP53 mutante

Los meduloblastomas SHH activado pueden ser divididos en cuatro subgrupos (SHH- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) los cuales reflejan distintas aberraciones somáticas, con diversas vías activadas. En particular, los SHH- $\alpha$  pueden presentar mutaciones de TP53 (10,14).

La proteína p53 actúa principalmente como un factor de transcripción que se activa en respuesta a múltiples estímulos de estrés para regular la expresión de genes que controlan la proliferación y senescencia, reparación de DNA y muerte celular. Un p53 defectuoso puede permitir que las células anormales proliferen dando por resultados cáncer (24).

Los meduloblastomas SHH y TP53 mutante son tumores raros con un mal pronóstico que compromete a pacientes entre los 4 y 17 años, raramente se observa en infantes y adultos. Es definido como un tumor del cerebelo con evidencia de activación de la vía SHH, así como mutación de línea germinal o somática de TP53. La activación de la vía SHH en tumores TP53 mutantes se relaciona con pérdida del cromosoma 17p, y amplificaciones de los genes GLI2, MYCN, o SHH, y las mutaciones en PTCH, SUFU y SMO son poco comunes en comparación con los SHH TP53 no mutante. Estos tumores usualmente presentan la histología anaplásico/células grandes (11,22,23).

La mayoría de las fallas al tratamiento en meduloblastomas SHH activado está relacionado con mutaciones en TP53. Este grupo es de muy alto riesgo. Una

potencial explicación para el mal pronóstico en tumores SHH y TP53 mutado se relaciona con resistencia a la radiación, así como la recaída local (22).

#### 2.5.4. Meduloblastoma no-WNT/no-SHH

Los MB del Grupo 3 y del Grupo 4 están más relacionados entre ellos que con los WNT y SHH y aparecen en la edición 2016 de la OMS como no-WNT/no-SHH, aun así, son molecular y clínicamente heterogéneos con consecuencias diversas. Estos tumores representan cerca de dos terceras partes de los meduloblastomas (11,25).

El perfil de transcriptoma del Grupo 3 se caracteriza por la expresión relativamente alta de MYC, un protooncogén que acta como factor de transcripción y está involucrado en la regulación del ciclo celular, así como en la inmortalización, apoptosis, proliferación y diferenciación celular. Por su parte, los tumores del Grupo 4 se caracterizan por alteraciones recurrentes en KDM6A y SNCAIP, el primero es un gen que regula la expresión genética a través de histonas y el segundo una proteína relacionada con neurodegeneración, además de otros genes. Con un panel de tres anticuerpos ( $\beta$ -catenina, GAB1 y YAP1) se pueden definir estos grupos, los tumores no-WNT/no-SHH presentan inmunorreactividad citoplasmática a  $\beta$ -catenina (no nuclear) y las células tumorales son inmunonegativas a GAB1 y YAP1 (11,26,27).

Los meduloblastomas del Grupo 3 cuentan aproximadamente con el 25% de los casos, predominantemente entre infantes y niños, con su rango máximo de diagnóstico entre 3 a 5 años y casi nunca en adultos (25). Su origen celular es poco claro. El Grupo 4 es el subgrupo más común, presentando cerca del 35% al 40% de los casos de meduloblastoma, sin embargo, es el menos comprendido (25). Muchos MB del Grupo 4 expresan marcadores de neuronas glutamatérgicos, las cuales pueden ser las células de origen. Estos tumores están localizados entre el 4to ventrículo. Tienen alteraciones citogenéticas recurrentes, incluyendo amplificaciones de MYCN y CDK6, pérdida del cromosoma 11, y duplicación de la

región donde el gen SNCAIP se localiza en el cromosoma 5. El isocromosoma 17q es la alteración genética más común en el Grupo 4, pero a diferencia de los tumores Grupo 3 tienen MYC intensificado, el cual no es predictivo de la supervivencia (28). No se han observado mutaciones somáticas de TP53 en el diagnóstico de los MB Grupo 3 y Grupo 4, aunque, pero se pueden observar en la recaída, y por lo general se asocia con amplificación de MYC (22).

Se ha reportado que los meduloblastomas Grupo 3 y Grupo 4 presentan perfiles de riesgo bajos e intermedios (28).

Subgrupo	WNT		SHH				Grupo 3			Grupo 4			
	WNT α	WNT β	SHH α	SHH β	SHH γ	SHH δ	Grupo 3α	Grupo 3β	Grupo 3γ	Grupo 4α	Grupo 4β	Grupo 4γ	
Proporción por Subtipo													
Relación de los Subtipos													
Datos Clínicos	Edad												
	Histología			A/CG Desmoplásia	Desmoplásia	Nodular Desmoplásia	Desmoplásia						
	Metástasis	8.6%	21.4%	20%	33%	8.9%	9.4%	43.4%	20%	39.4%	40%	40.7%	38.7%
	Sobrevivida a 5 años	97%	100%	69.8%	67.3%	88%	88.5%	66.2%	55.8%	41.9%	66.8%	75.4%	82.5%
Número de copias	Amplio	6 <sup>-</sup>	9q <sup>+</sup> , 10q <sup>+</sup> , 17p <sup>-</sup>			Genoma balanceado		7 <sup>+</sup> , 8 <sup>+</sup> , 10 <sup>-</sup> , 11 <sup>-</sup> , i17q		8 <sup>+</sup> , i17q	7q <sup>+</sup> , 8p <sup>-</sup> , i17q	i17q	7q <sup>+</sup> , 8p <sup>-</sup> , i17q (menos)
	Focal		MYCN amp, GLI2 amp, YAP1 amp	Pérdida de PTEN		10q22 <sup>-</sup> , 11q23.3			Ganancia OTX2, pérdida DDX31	MYC amp	MYCN amp, CDK6 amp	SNCAIP dup	CDK6 amp
Otros eventos			Mutaciones TP53			Mutaciones promotor TERT		Alta expresión de GF11/1B					

Edad (años): 0-3 >3-10 >10-17 >17

**Figura 2. Resumen gráfico de los subgrupos de meduloblastoma.**

Representación esquemática de datos clínicos clave, mutaciones presentes y relaciones entre los diferentes subtipos dentro de cada uno de los cuatro subgrupos de MB. (14)

Wingless e Int (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), Oncogen asociado a glioma 2 (GLI2), regulador transcripcional asociado a Yes1 (YAP1), Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), Telomerasa transcriptasa inversa (TERT), Orthodenticle Homeobox 2 (OTX2), Helicasa 31 caja muerta (DDX31), Factor de crecimiento independiente de represor transcripcional 1 (GF11/1B), Proteína cinasa de división celular 6 (CDK6), Proteína sinucleína de interacción alfa (SNCAIP).

## 2.6. Estratificación de riesgo actual del meduloblastoma

Los MB históricamente se han subdividido por grupo de riesgo estándar y alto, basado en el porcentaje de tumor residual postoperatorio, presencia de metástasis y la edad del paciente (17,29).

Los pacientes con tumores residuales ( $>1.5 \text{ cm}^2$ ), edad menor a 3 años, y/o que muestran metástasis son clasificados como pacientes de riesgo alto, mientras que los restantes se clasifican como pacientes de riesgo intermedio. Después del tratamiento trimodal que consiste de máxima resección quirúrgica, irradiación craneoespinal, y quimioterapia adyuvante, las tasas de sobrevida de los pacientes de riesgo intermedio y alto es de 85 y 70%, respectivamente (16,17,30–32).

Durante un consenso en Heidelberg en 2015, un nuevo protocolo de estratificación de riesgo basado en criterios de pronóstico molecular ha sido propuesto para pacientes entre 3 y 17 años. La clasificación redefinida tiene cuatro grupos de riesgo, definidos principalmente por sobrevida, y toma en cuenta la información de subgrupos moleculares y la heterogeneidad del padecimiento. El protocolo define a los pacientes como “Muy alto riesgo” ( $<50\%$  sobrevida), “Alto riesgo” (50-75% sobrevida), “Riesgo estándar” (75-90% sobrevida), y “Bajo riesgo” ( $>90\%$  sobrevida) (16,30,33).



**Tabla 1. Clasificación del pronóstico para meduloblastomas pediátricos conforme a los subgrupos moleculares. (30)**

	<b>Sobrevida total a 5 años</b>	<b>Perfil Molecular</b>
<b>Muy alto riesgo</b>	<50%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Grupo 3 con metástasis</li> <li>● Grupo SHH con mutación en TP53</li> </ul>
<b>Alto riesgo</b>	50%-70%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Grupo SHH con MYCN amplificado o con metástasis</li> <li>● Grupo 4 con metástasis</li> </ul>
<b>Riesgo estándar</b>	76%-90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Grupo SHH sin mutación en TP53 o sin amplificación MYCN</li> <li>● Grupo 3 sin amplificación de MYC</li> <li>● Grupo 4 sin pérdida del cromosoma 11</li> </ul>
<b>Bajo riesgo</b>	>90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Grupo WNT</li> <li>● Grupo 4 con pérdida del cromosoma 11</li> </ul>

A pesar de los esfuerzos para brindar una clasificación adecuada a este tipo de tumores, aun es necesario comprender mejor este padecimiento, ya que se desconocen aún muchos de los mecanismos implicados en la patología. En los últimos años se le ha dado un gran peso al microambiente tumoral (TME) como uno de los factores fundamentales que determina la progresión tumoral. Se ha descrito que los niveles de oxígeno presentes en los tumores son menores en comparación con los tejidos aledaños, por lo que la hipoxia generada en el tumor tiene la capacidad de promover metástasis, invasión celular y ser un factor de mal pronóstico en pacientes (34).

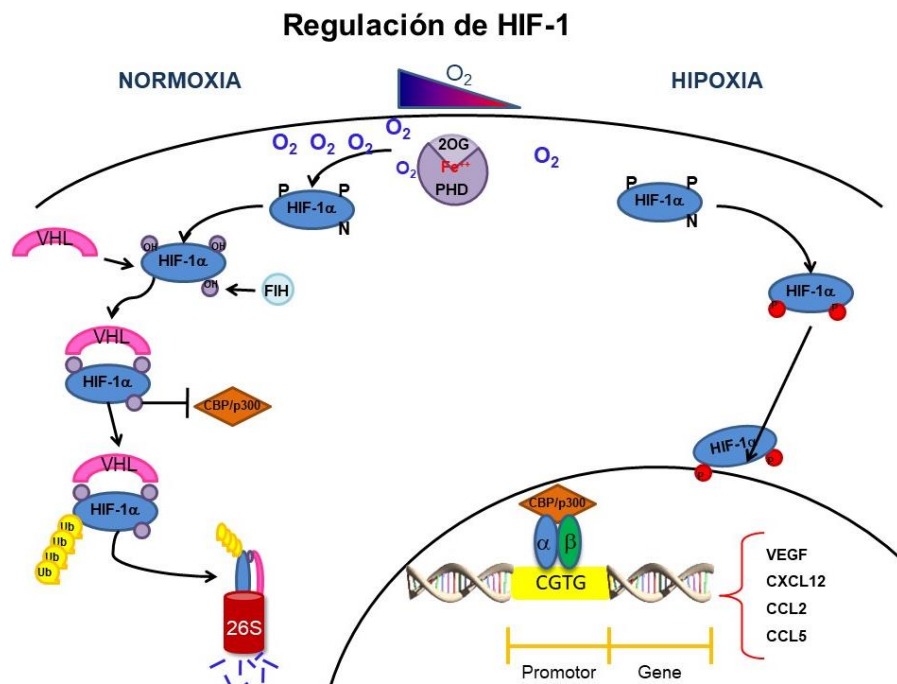
## 2.7. Factor inducible en hipoxia 1

La hipoxia que es la falta de oxígeno tisular, es una de las características intrínsecas más importantes en los tumores sólidos y está asociada siempre a fenotipos más agresivos, además de conferir resistencia a la quimio y radioterapia. La hipoxia logra manifestar estos efectos desfavorables a través de un factor de transcripción inducible en hipoxia (HIF), el cual tiene un papel esencial en la homeóstasis del oxígeno en procesos biológicos y en células tumorales participa en la adaptación de condiciones de hipoxia y privación de nutrientes al regular la transcripción de diferentes protooncogenes (35).

Los factores inducibles en hipoxia (HIF) son una familia de heterodímeros compuesta por tres subunidades  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ ) que son sensibles al O<sub>2</sub>, además, también están compuestos por una subunidad insensible al O<sub>2</sub> denominada HIF-1 $\beta$ , también conocida como la fracción constitutiva del receptor nuclear translocador de hidrocarburos de arilos (ARNT). Las subunidades de la familia HIF son activadores transcripcionales regulados por oxígeno que juegan un papel esencial en el desarrollo de los mamíferos, la fisiología y la patogénesis de diversas enfermedades (36,37).

En condiciones de normoxia (cuando la disponibilidad de O<sub>2</sub> está en balance con la demanda), dos residuos de prolina y una lisina del dominio de degradación dependiente de oxígeno de la subunidad  $\alpha$  son hidroxiladas por enzimas prolihidroxilasas (PHD) permitiendo que el HIF-1 $\alpha$  modificado tenga una interacción con el complejo Von Hippel-Lindau E3 ubiquitina ligasa (VHL); a continuación, se lleva a cabo la degradación de la proteína a través de la vía de ubiquitina-proteosoma. Por otra parte, la proteína HIF-1 $\alpha$  es estable en hipoxia y forma un heterodímero con HIF-1 $\beta$  con la ayuda de diferentes coactivadores, tales como la proteína respondedora a unión adenosil monofosfato cíclico (CBP) y acetiltransferasa (p300) (38,39) se unen a sus elementos respondedores a hipoxia (HREs), de este modo activando la expresión de diversos genes de respuesta a hipoxia (40). De igual manera el factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  puede ser activado

de maneras independientes de oxígeno. Algunas de éstas, como la activación a través de hormonas y citocinas inflamatorias, cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), microRNA (miRNA), especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares (41).



**Figura 3. Regulación del factor de transcripción HIF-1.**

La regulación canónica de la subunidad  $\alpha$  esta mediada por un sensor de oxígeno constituido por la enzima prolihdroxilasa (PHD), Fe<sup>2+</sup>, O<sub>2</sub> y 2-oxoglutarato (2OG), el cual en estado de normoxia, hidroxila a HIF-1 $\alpha$  permitiéndole la unión del VHL dando una señal de ubiquitinación y así ser degradada por el proteasoma 26S, en tanto en estados de hipoxia, las PHD no es funcional y la subunidad  $\alpha$  es fosforilada y transloca al núcleo en donde se une a la subunidad  $\beta$  y a los coactivadores CBP/p300 uniéndose al promotor de sus genes blancos. (42)

El factor de transcripción HIF-1 promueve la expresión de genes que codifican para proteínas que aumentan el suministro de oxígeno, ya que estimula la eritropoyesis, angiogénesis, permeabilidad de vasos sanguíneos y aumenta la sobrevivencia de las células ante estas condiciones. Además tiene un papel muy importante en el proceso de inflamación (43). HIF-1 regula genes involucrados en

diversas vías biológicas, sus genes blanco principales son la eritropoyetina (EPO), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la hemo-oxigenasa-1 (HO-1), adrenomedulina (ADM), y el transportador de glucosa (GLUT-1) (44).

## **2.8. El factor de transcripción HIF-1 en cáncer**

El factor de transcripción HIF-1 es muy importante durante el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo, sin embargo, estos mecanismos promovidos por el factor de transcripción también se promueven en las células cancerígenas. Las células tumorales desarrollan hipoxia como resultado de un suministro insuficiente de oxígeno (hipoxia crónica) o debido a fluctuaciones transitorias en el flujo sanguíneo (hipoxia aguda) (35). En tumores sólidos cerca del 60% del volumen tumoral presentan menos del 1% de O<sub>2</sub> con una presión parcial de oxígeno (pO<sub>2</sub>) menor a 10 mmHg comparado con la pO<sub>2</sub> de 40 a 65 mmHg en tejidos normales y de 10-21% de O<sub>2</sub> (45).

La hipoxia intratumoral activa tanto a HIF-1 $\alpha$  como a HIF-2 $\alpha$ , se ha descrito en diversos tipos de cáncer humanos que existe una sobreexpresión sobre todo de HIF-1 $\alpha$ , lo que tiene una fuerte asociación con una alta mortalidad y metástasis (46). Diversos genes regulados por HIF-1 se encargan de funciones importantes como la angiogénesis, migración e invasión, inhibición de la apoptosis, regulación de pH, y metabolismo de glucosa, presentan una sobreexpresión muy importante en diversos tipos de tumores en comparación con los tejidos sanos (40,45). La hipoxia intratumoral es un factor de mal pronóstico en tumores de próstata, mama, musculo esquelético, cabeza y cuello, cérvix, entre otros que se asocia a mayor tasa de fracaso a la radioterapia, quimioterapia, y al aumento de la metástasis (47).

**Tabla 2. Implicación de HIF-1 en diferentes tipos de cáncer.**

<b>Tipo de Tumor</b>	<b>Evolución clínica</b>	<b>Referencia</b>
Cérvix	Resistencia a radioterapia, baja sobrevida.	(48,49)
Hígado	Resistencia a quimioterapia, baja sobrevida.	(51, 52)
Mama	Metástasis, baja sobrevida.	(53, 54)
Páncreas	Resistencia a quimio y radioterapia.	(54)
Próstata	Resistencia a radioterapia, baja sobrevida	(55,56)
Pulmón	Baja sobrevida.	(58, 59)
Glioblastoma	Resistencia a quimio y radioterapia, baja sobrevida.	(49, 50)

Respecto a tumores de SNC HIF-1 $\alpha$  se ha descrito en glioblastoma (GB) como un factor de pronóstico muy importante, al promover la resistencia a la radioterapia y quimioterapia, y tiene una asociación a baja sobrevida (59–61). Se ha descrito que HIF-1 en GB tiene la capacidad de promover efectos como la angiogénesis, inmunosupresión, invasión celular y la sobrevivencia de células en condiciones de hipoxia (62).

En el caso del MB es aún muy controversial y poca la información que existe respecto a la relación que podría tener el factor de transcripción HIF-1 en la patogénesis y la progresión de la enfermedad. En 2018, Cruzeiro y colaboradores evaluaron 41 muestras pediátricas de MB, reportando que existía una sobreexpresión de RNA mensajero de HIF1A en los tumores a comparación de los tejidos sanos (63), por otra parte, Valencia y colaboradores reportaron en 2019 que HIF-1 $\alpha$  promovía la quimiorresistencia (64). Sin embargo, pese a los pocos reportes que existen respecto a la relación de HIF-1 con el MB, aún es necesario dilucidar el rol que pueda tener este factor de expresión en la enfermedad.

### 3. Planteamiento de problema

Las neoplasias del SNC son la tercera causa de cáncer infantil, siendo el MB la neoplasia sólida más frecuente en la edad pediátrica, y la segunda causa de muerte por cáncer en menores de 15 años. A pesar de la existencia de una clasificación y un tratamiento eficiente, éste aún no se aplica en países como el nuestro debido a los altos costos, por lo tanto, el entendimiento de los mecanismos implicados en la fisiopatología del MB, ayudará a brindar nuevos blancos terapéuticos y factores diagnóstico o pronóstico de la enfermedad, que nos permitan incrementar la sobrevida global del paciente al implementar la clasificación y tratamiento actual.

En este contexto, se ha descrito que el factor de transcripción HIF-1 (65), que es un factor de mal pronóstico en diversos tipos de cáncer incluyendo tumores de SNC como el glioblastoma, y se asocia a resistencia a quimioterapia y radioterapia, así como metástasis. En MB aun no existen muchos reportes acerca de cómo se expresa este factor de transcripción y cual podría ser el rol que pueda tener en la fisiopatología del MB.

Por lo que en este proyecto se propone determinar la expresión del factor HIF-1 $\alpha$  en tejidos de pacientes pediátricos con meduloblastoma evaluando posibles correlaciones con los datos clínicos.

## **4. Hipótesis**

La sobreexpresión del factor de transcripción inducible en hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) en tejidos de pacientes con meduloblastoma pediátrico contribuirá con la fisiopatología de la enfermedad.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo general**

Determinar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en tejidos de pacientes pediátricos con meduloblastoma y su implicación en la fisiopatología de la enfermedad.

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Cuantificar la expresión del mRNA de HIF-1 $\alpha$  en tejidos de pacientes pediátricos con MB.
2. Evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en tejidos de pacientes pediátricos con MB.
3. Determinar la asociación de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  con los datos clínicos.

## 6. Material y métodos

### 6.1. Materiales y reactivos

#### 6.1.1. Inmunohistoquímica.

- Laminillas electrocargadas: Shandon Superfrost Plus (Ref 6776214, Thermo scientific™, Waltham, MA, EUA)
- Cubreobjetos (2975-246, Corning, NY, EUA)
- Hematoxilina (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA)
- Peróxido de Hidrógeno (2186-1, JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- Metanol (9070-03, JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA)
- Recuperador antigénico: VECTOR Antigen Solution Citrated Base (Cat. No. H-3300, VECTOR, Burlingame, CA, EUA)
- Lápiz hidrofóbico: ImmEdge™ Pen (Cat. No. H-4000, VECTOR, Burlingame, CA, EUA)
- Diluyente de anticuerpos primarios: Da Vinci Green Diluent (SKU. PD900, BioCare Medical, Concord, CA, EUA)
- Anticuerpo primario específico:
  - HIF-1 $\alpha$  (Cat. No. NB100-479, NOVUS, California, Estados Unidos)
- Estuche Vector ImmPRESS™ HRP Reagent Kit Anti-Rabbit IgG (Cat. No. MP-7401, VECTOR, Burlingame, CA, EUA)
- 3'3' tetra-hidrocloruro diaminobenzidina (DAB) ImmPACT® DAB Peroxidase (HRP) Substrate (No. Cat. SK-4105, VECTOR, Burlingame, CA, EUA)
- Medio de montaje: Entellan® (107961, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA)

#### 6.1.2. Medición del mRNA.

- DNasa 10 X (Ambion 145012, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA)
- DNasa (2U/ $\mu$ l) (Ambion 145014, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA)
- Reactivo inactivador de la DNasa (Ambion 145013, Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA)



- Estuche RT<sup>2</sup> First Strand (QIAGEN, Hilden, Alemania)
- Multiplacas de arreglos de PCR RT2 (RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array System, QIAGEN, Hilden, Alemania)
- RT2 SYBER Green ROX qPCR Mastermix, (QIAGEN, Hilden, Alemania)

## 6.2. Metodología

### 6.2.1. Pacientes

Tipo de estudio: Retrospectivo.

Población: Pacientes pediátricos de 0 a 18 años con diagnóstico de meduloblastoma y tratados en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. En el periodo de 1990 al 2018.

Criterios de exclusión: Casos que no tengan datos clínicos completos, casos que solo hayan acudido por diagnóstico o tratamiento.

Criterios de inclusión: Casos que estuviera existente el material histológico en el Servicio de Patología del hospital, casos que tengan datos clínicos completos, casos que tengan determinado el subgrupo molecular.

Criterios de eliminación: Casos donde el tejido se haya desprendido en la tinción de IHQ, casos que no tengan determinado subgrupo molecular o no hayan amplificado el mRNA de HIF-1 $\alpha$ .

Tamaño de muestra: Se incluyeron 140 muestras de meduloblastoma pediátricos y 7 cerebelos sanos como controles en los microarreglos de tejidos. Sin embargo, solo se reportaron 41 pacientes, esta disminución se debe a que de la tinción de

IHQ se conservaron 115 muestras, de estos se obtuvo el expediente clínico de 75 casos, no obstante, solo se logró determinar el mRNA de HIF-1 $\alpha$  y el subgrupo molecular de 41 pacientes y 4 controles sanos.

#### 6.2.2. Determinación del mRNA

##### Extracción de RNA

Se realizaron cortes de secciones de 20 micras o menos, (10 micras) de tejidos embebidos en parafina de los pacientes previamente procesados en los MATs. La cuchilla empleada se limpió previamente para remover ribonucleasas y se eliminó con bisturí el exceso de parafina alrededor de los cortes. Los cortes realizados se guardaron en tubos de 1.5 mL. A continuación, se realizó la eliminación de la parafina, agregando 1 mL de xilol seguido de una incubación a 42°C con agitación constante y centrifugando por 5 minutos, esto se realizó dos veces, después se realizaron tres lavados de 1 mL con etanol absoluto por 3 minutos a temperatura ambiente en agitación, seguidos de centrifugación a 14000 rpm por cada lavado. Finalmente, el etanol de las muestras se dejó evaporar durante 5 minutos aproximadamente a temperatura ambiente hasta que el tejido se secase completamente.

Una vez secas las muestras se realizó la digestión de los tejidos, a los cuales se les agregaron 350  $\mu$ l de amortiguador de digestión, las muestras se dejaron incubando a 42 °C hasta que no se observara tejido. Después de las primeras 24 horas, si aún existía tejido, se agregaron 5  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml), para facilitar la disrupción de los tejidos mediante métodos físicos, las muestras se maceraron en el tubo con un pistilo. En promedio la incubación fue de 48 horas.

Después de la digestión se procedió a realizar la extracción de ácidos nucleicos, a las muestras se les agregó 800  $\mu$ l de Trizol (tiocianato de guanidina), seguido de agitación e incubación a temperatura ambiente por 5 min, luego se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se agitó vigorosamente por 20 segundos seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación se

centrifugó las muestras a 14,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se midió el volumen extraído, se procedió a agregar 2 µl de glucógeno (5 µg/µl) dentro de la muestra, seguido de un volumen de isopropanol, esto en un volumen igual al volumen que se recuperó en la fase acuosa, se mezcló por inversión lentamente y se incubó a -20°C toda la noche. Se procede a centrifugar las muestras a velocidad máxima a 4°C durante 20 min, seguido de una decantación y un lavado con 1 mL de etanol al 75 % centrifugando a velocidad máxima a 4°C por 10 min y eliminando el etanol. Una vez limpia la muestra se dejan secar las muestras en un ambiente libre de ribonucleasas.

Para realizar la eliminación de DNA, se resuspendió el RNA en 30 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), y se colocaron en cada muestra 3 µl de buffer DNasa 10 X + 1 µl de DNasa (2U/µl). Se incubaron por 15 minutos a 37°C agregando después 3.4 µl de reactivo inactivador de la DNasa dejándose incubar por 2 minutos con una agitación intermedia a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad y se obtuvo el sobrenadante en un tubo nuevo almacenándose a -20°C.

### Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se empleó el estuche RT<sup>2</sup> First Strand, las muestras de RNA previamente extraídas de tejidos embebidos en parafina y almacenadas a -20°C, se preparó la mezcla de transcripción reversa y se agregaron 10 µL de esta mezcla a cada una de las muestras a procesar dejándose incubar durante 15 minutos a 42°C, a continuación se detuvo la reacción al incubar a 92°C durante 5 minutos, después se agregaron 91 µL de agua libre de RNasas, por último se colocaron las muestras en hielo para proceder a la reacción de cadena de polimerasas cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

## qRT-PCR

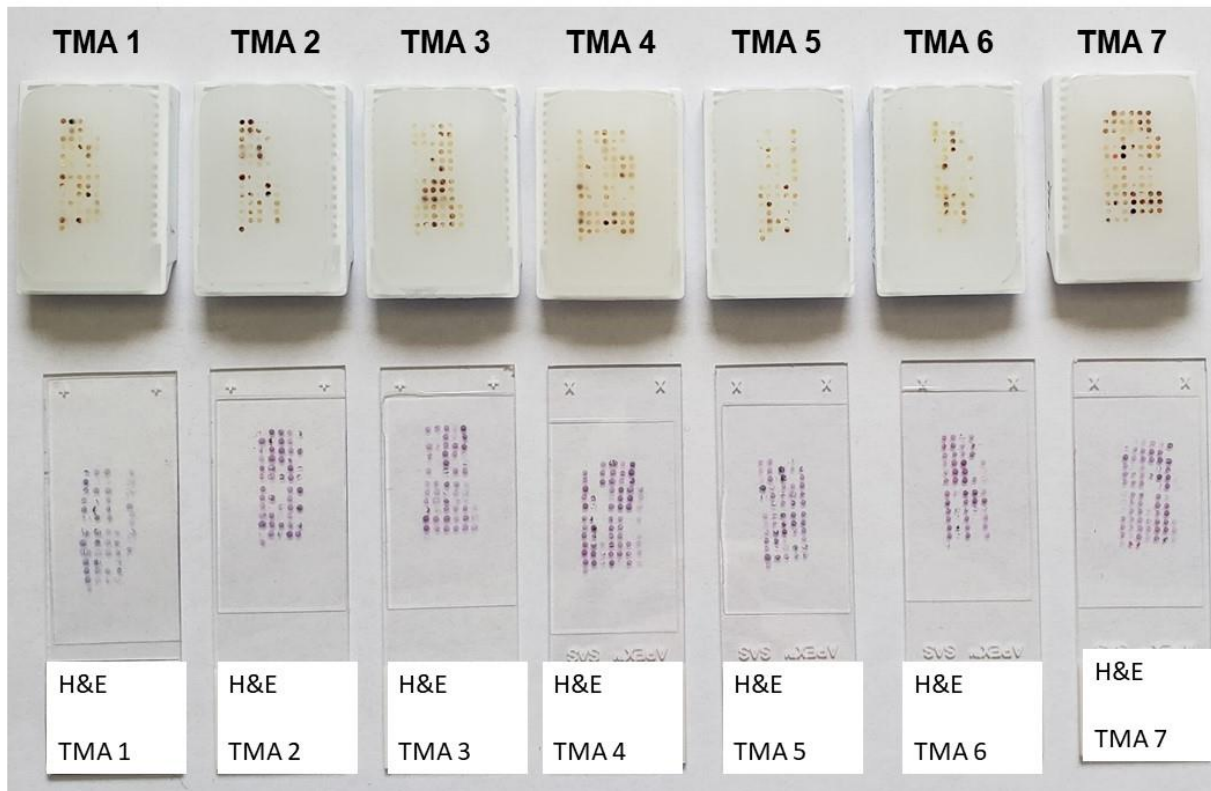
La determinación génica de HIF-1 $\alpha$  se realizó por arreglos en multiplaca de PCR, de 96 pozos diseñadas por el fabricante (Custom RT2 PCR Array, Qiagen, Alemania) la qRT-PCR se corrió en el termociclador (Aria-Mx-Real-time PCR System, Agilent, Santa Clara, CA, USA.), con RT<sup>2</sup> SYBER Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen, Alemania) y el cDNA de cada paciente. Para cada muestra se corrieron 5 genes endógenos, 2 controles de transcripción, 1 de DNA genómico y 1 control positivo. La subclasificación molecular empleada en este trabajo se realizó con 22 genes incluidos que fueron incluidos en estas mismas placas (66), esta clasificación considera los genes reportado por Northcott: **WNT** (*WIF1*, *TNC*, *GAD1*, *DKK2*, *EMX2*), **SHH** (*PDL1M3*, *EYA1*, *HHIP*, *ATOH1*, *SFRP1*), **Grupo 3** (*IMPG2*, *GABRA5*, *EGFL11*, *NRL*, *MAB21L2*, *NPR3*) y para el **Grupo 4** (*KCNA1*, *EOMES*, *KHDRBS2*, *RBM24*, *UNC5D*, *OAS1*) (67).

Los resultados se analizaron en GeneGlobe (Qiagen, Alemania), estos fueron normalizados con el gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y se comparó con la expresión del mensajero basal en cerebelos sanos. Los resultados se presentan en  $\text{Log}_2 2^{-\text{Delta-Delta-CT}}$  ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ).

### 6.2.3. Microarreglos de tejidos (MATs)

Se emplearon 7 microarreglos de tejidos con 140 biopsias de MB previamente construidos (Figura 4) (68). Brevemente las biopsias de tejidos de pacientes con meduloblastoma pediátrico fijadas en formalina y embebidas en parafina se arreglaron en microarreglos de tejidos, previa selección de tres áreas representativas en un corte de 4 $\mu\text{m}$  con tinción de hematoxilina/eosina (H&E) por un médico patólogo experto en la neoplasia. Estas áreas fueron extraídas de los “bloques donadores” de cada paciente con ayuda de un microarreglador de tejidos (Chemicon Advanced Tissue Arrayer “ATA 100”, MO, EUA) y transferidas a un bloque de parafina nuevo o “bloque receptor” y así arreglar por triplicado cada una

de las muestras. De los 7 bloques de MATs se realizaron cortes seriados de 4  $\mu\text{m}$  con un micrótopo rotatorio semiautomático (Leica RM 2125RT) y se colocaron en laminillas electrocargadas (Shandon Superfrost Plus, ThermoScientific, UK) para la posterior realización de las tinciones de inmunohistoquímica.



**Figura 4. Microarreglos de tejidos de muestras de meduloblastoma pediátrico.**

En la parte superior se observan 7 MATs que contienen 140 muestras y sus respectivas laminillas con tinciones de H&E en la parte inferior.

#### 6.2.4. Inmunohistoquímica (IHQ)

Se realizaron tinciones de IHQ para la determinación de la proteína HIF-1 $\alpha$  en cortes seriados de 4  $\mu\text{m}$  en los diferentes MATs de pacientes pediátricos con meduloblastoma, brevemente, los tejidos se desparafinaron y se hidrataron en un

tren de disolventes que incluye xilol (100%), etanol/xilol (50%/50%), etanol (100%, 90% y 70%) y agua, posteriormente, se realizó la recuperación antigénica con un recuperador antigénico de citrato de sodio a un pH de 6 por 20 minutos en olla de presión a 135°C.

La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una disolución al 3% de peróxido de hidrogeno en metanol, 2 veces por 15 minutos y la unión inespecífica de los anticuerpos se redujo al incubar con suero normal de caballo durante 60 minutos. El tejido se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo específico para HIF-1 $\alpha$  durante toda la noche. Después de cinco lavados con PBS, las laminillas se incubaron con un segundo anticuerpo ImmPRESS HRP IgG Polymer Detection durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se desarrolló la generación del color visible, utilizando el DAB de 2 a 5 minutos observando la tinción en microscopio. La reacción se detuvo con agua y se contratiñó con hematoxilina. Finalmente, los tejidos se deshidrataron y se fijaron con medio de montaje Entellan.

#### 6.2.5. Patología digital

Las laminillas de los diferentes MATs con la tinción de IHQ para HIF-1 $\alpha$  se digitalizaron mediante un escaneador de laminillas (APERIO®, Leica, Wetzlar, Alemania) que adicionalmente cuenta con un software de análisis de microarreglos de tejido en el que se determinó la intensidad de la expresión de la proteína de interés cuantitativamente, mediante conteo de pixeles totales, esto en 5 a 6 áreas de 200 $\mu\text{m}^2$ , colocadas en los 3 spots por paciente, los resultados son la sumatoria de las tres intensidades (leve, moderada y fuerte) y se presentan en Pixeles/200  $\mu\text{m}^2$ . Adicionalmente de estas mismas áreas de 200  $\mu\text{m}^2$  se cuantificó cuantitativamente el % de células HIF-1 $\alpha$  positivas, citoplasmáticas y nucleares positivas, siendo la sumatoria de los porcentajes el % total de células positivas (G. (69)). Los datos se correlacionarán con los datos demográficos y clínicos de los pacientes.

#### 6.2.6. Análisis estadístico

Se utilizó el Software SPSS versión 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y GraphPad Prism® Versión 6.01. Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos debido a que cada caso tiene menos de 30 muestras, al obtener una p mayor a 0.05 se concluyó que las muestras no eran normales; por lo tanto, se empleó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para poder evaluar si existen diferencias significativas en el número de células nucleares positivas de la proteína HIF-1 $\alpha$  en diferentes datos clínicos como sexo, edad, subgrupo molecular, riesgo, recaída y sobrevida.

## 7. Resultados

### **Objetivo 1. *Cuantificación de la expresión del mRNA de HIF-1 $\alpha$ en tejidos de pacientes pediátricos con MB.***

7.1.1. El nivel del mRNA de HIF-1 $\alpha$  no presenta diferencias entre los subgrupos de MB pediátrico.

Con el propósito de realizar la subclasificación molecular y determinar si existen diferencias en la expresión del mRNA de HIF-1 $\alpha$  en las muestras de los pacientes con meduloblastoma pediátrico, se realizó la cuantificación por qRT-PCR utilizando Arreglos de multiplacas de PCR RT2, previa extracción de RNA y la síntesis de cDNA de las biopsias parafinadas de los pacientes.

En la figura 5a se presenta la clasificación de las muestras de 41 pacientes con MB pediátrico por subgrupo molecular (67), a través de la amplificación de genes ya reportados para su clasificación, los cuales, corresponden a 4 WNT, 16 SHH, 13 Grupo 3 y 8 a Grupo 4.

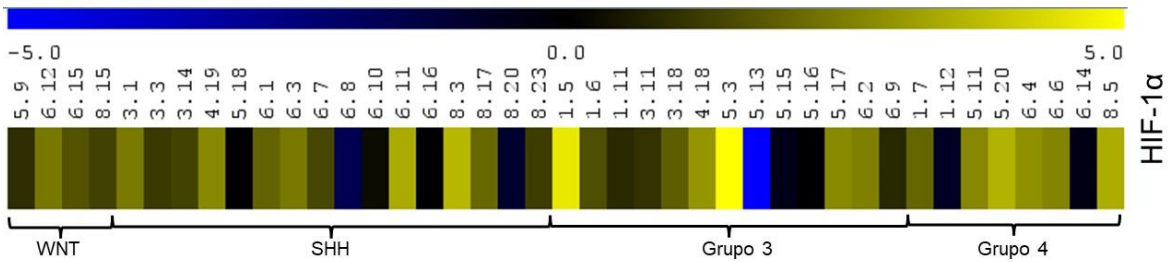
Además de estos pacientes, se muestra en la Figura 5b en un “Heatmap” (mapa de calor) de la expresión del mRNA para HIF-1 $\alpha$ , agrupados por subgrupo molecular, mientras que en la figura 5c se observa la representación gráfica de los niveles del mRNA ajustados con el nivel basal del mensajero de HIF-1 $\alpha$  en los cerebelos sanos (indicada en 0 por la línea roja), en donde no se encontraron diferencias significativas en los niveles de mRNA entre MB vs. Cerebelo sano ni entre subgrupos moleculares.



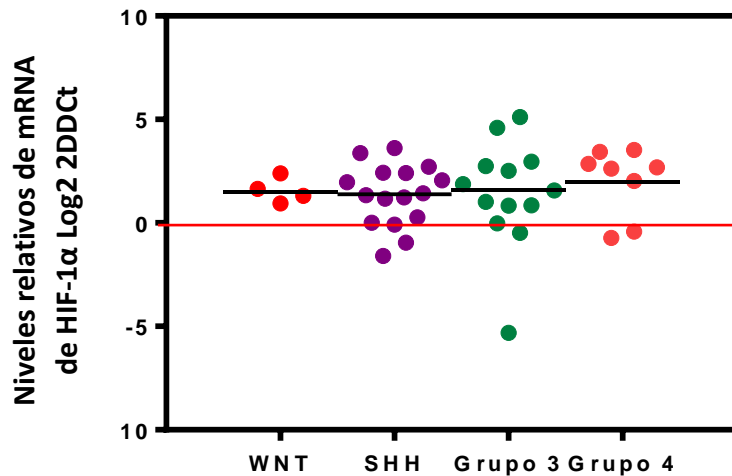
a)

Subgrupo molecular	Número de pacientes	%
WNT	4	9.0
SHH	16	43.18
Grupo 3	13	29.54
Grupo 4	8	18.18
	41	100

b)



c)



	WNT	SHH	Grupo 3	Grupo 4
Media	1.570	1.336	1.405	1.996
Desviación Estándar	0.6188	1.492	2.599	1.658
Error Estándar	0.3094	0.3731	0.7210	0.5861

Figura 5. Subclasificación molecular de los pacientes con MB y niveles de expresión de mRNA de HIF-1 $\alpha$  en tejidos de pacientes con MB.

a) Agrupación de los pacientes por subgrupo molecular WNT, SHH Grupo 3 y Grupo 4 de acuerdo con la amplificación de genes (67). b) Heatmap de la expresión del mRNA para HIF-1 $\alpha$ , agrupadas por subgrupo, c) representación gráfica de los niveles de mRNA de HIF-1 $\alpha$  en los diferentes pacientes comparados con el basal de cerebelos sanos (indicada por la línea roja 0), en la tabla se muestran los datos de la media, desviación estándar y el error de la media.

## **Objetivo 2. Evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ en tejidos de pacientes pediátricos con meduloblastoma.**

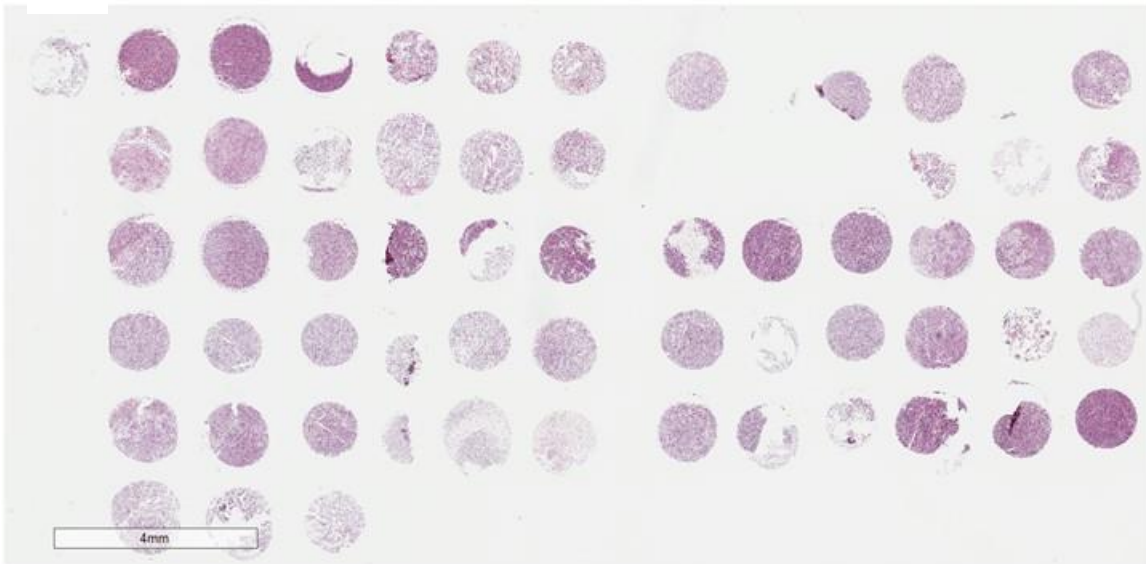
7.2.1. Inmunoreactividad diferencial de la proteína HIF-1 $\alpha$  en muestras de pacientes pediátricos con meduloblastoma.

Con el propósito de evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  se realizó la tinción de inmunohistoquímica en los microarreglos de tejidos (Figura 4) de pacientes pediátricos con meduloblastoma previamente construidos (68), en las cuales se realizó la determinación por IHQ de HIF-1 $\alpha$  (en la figura 5a y 5b se muestran micrografías representativas de la tinción de H&E y la tinción de IHQ de HIF-1 $\alpha$  respectivamente). Sin embargo, al final sólo se tomaron en cuenta en el estudio 41 pacientes que cumplían con los parámetros de datos clínicos y la determinación tanto del mRNA de HIF-1 $\alpha$  como la proteína por IHQ, así como el dato de clasificación molecular.

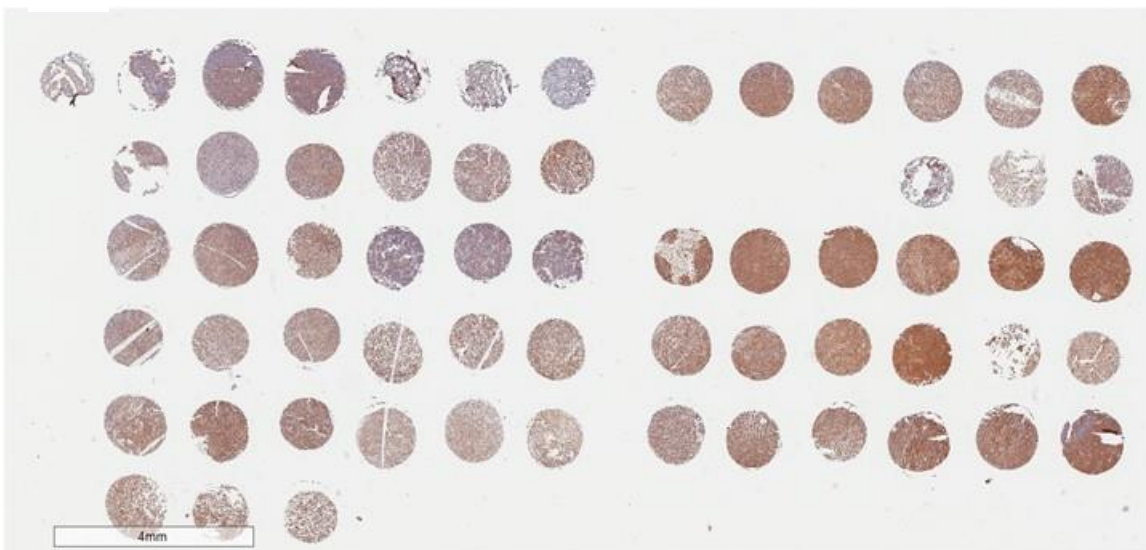
Como parte de nuestros resultados se observan diferencias entre pacientes en la tinción de IHQ de la proteína HIF-1- $\alpha$ , en la Figura 7a se puede apreciar los diferentes patrones de tinción observados, en el aumento del lado izquierdo, podemos observar una tinción principalmente citoplasmática con escasa tinción nuclear, en tanto que en la esquina superior derecha esta expresión nuclear es más abundante, finalmente en el aumento central se aprecia que la presencia de HIF-1 $\alpha$  es nuclear.

Por otra parte, se observan diferencias en la tinción de HIF-1 $\alpha$  entre subgrupos moleculares, donde el subgrupo WNT es el que presenta una mayor tinción seguido por Grupo 4, SHH y por último el Grupo 3 es el que presenta una menor tinción a comparación del resto (Figura 7b).

a)



b)

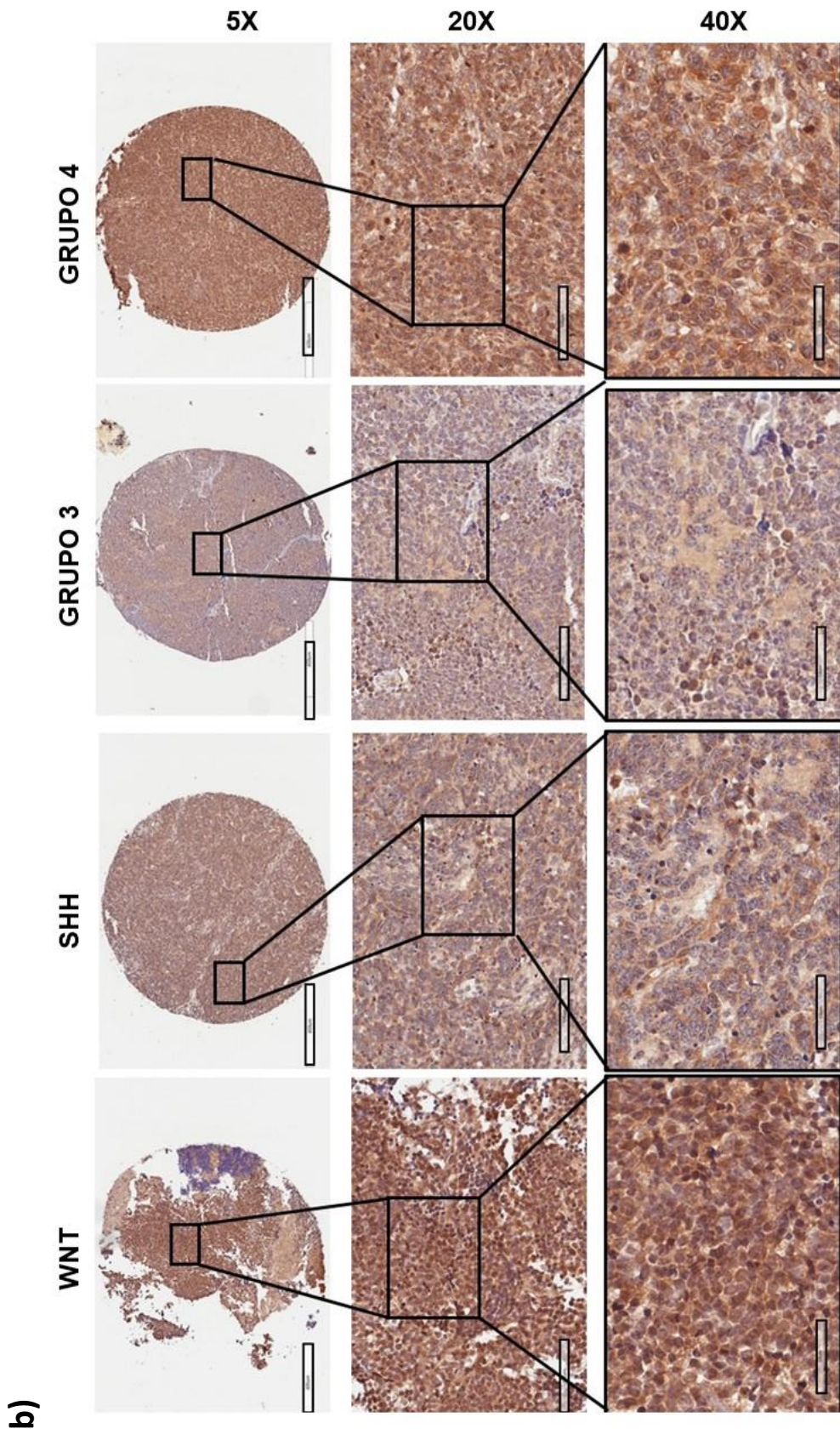


**Figura 6. Tinciones de H&E e inmunorreactividad de la proteína HIF-1 en muestras de meduloblastoma pediátrico.**

Micrografías representativas del microarreglo 3 teñido con a) H&E y la b) IHQ de HIF-1 $\alpha$ , en donde se puede apreciar la expresión diferencial de esta proteína entre los diferentes pacientes (triplicado de forma horizontal).



a)



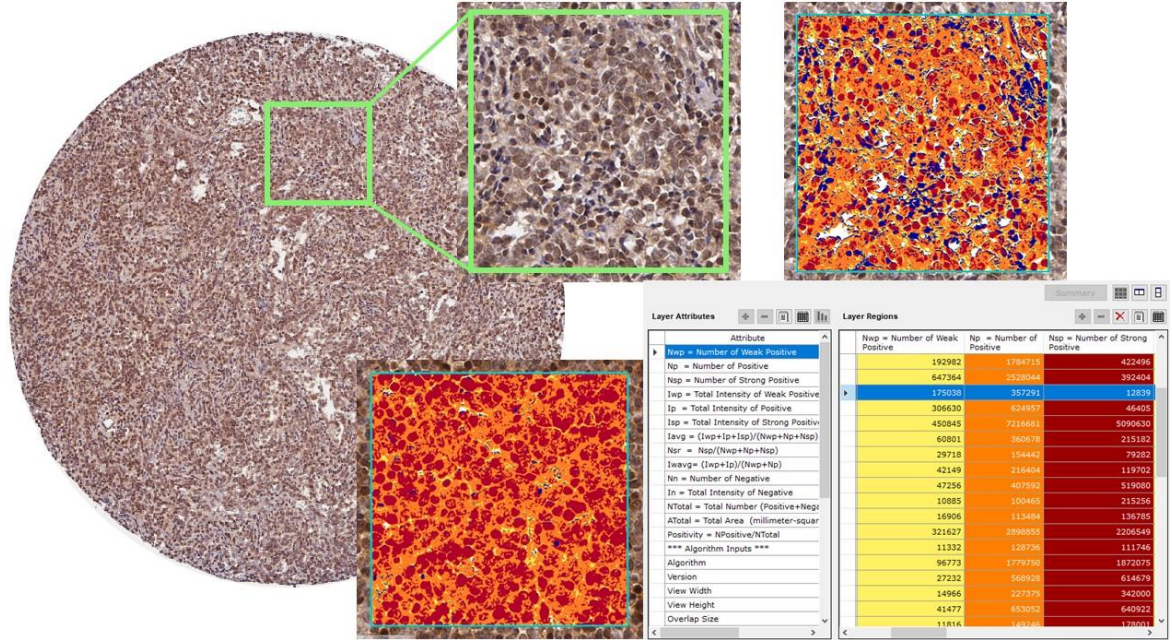
### **Figura 7. Inmunorreactividad de la proteína HIF-1 en muestras de meduloblastoma pediátrico.**

a) Ejemplos en aumentos de 10X (círculo) y 20X (recuadro), en donde se evidencia la diferencia existente de la expresión de HIF-1 $\alpha$  entre los pacientes. b) Estas diferencias en los patrones de expresión se pueden apreciar también al analizarlos por subgrupo molecular.

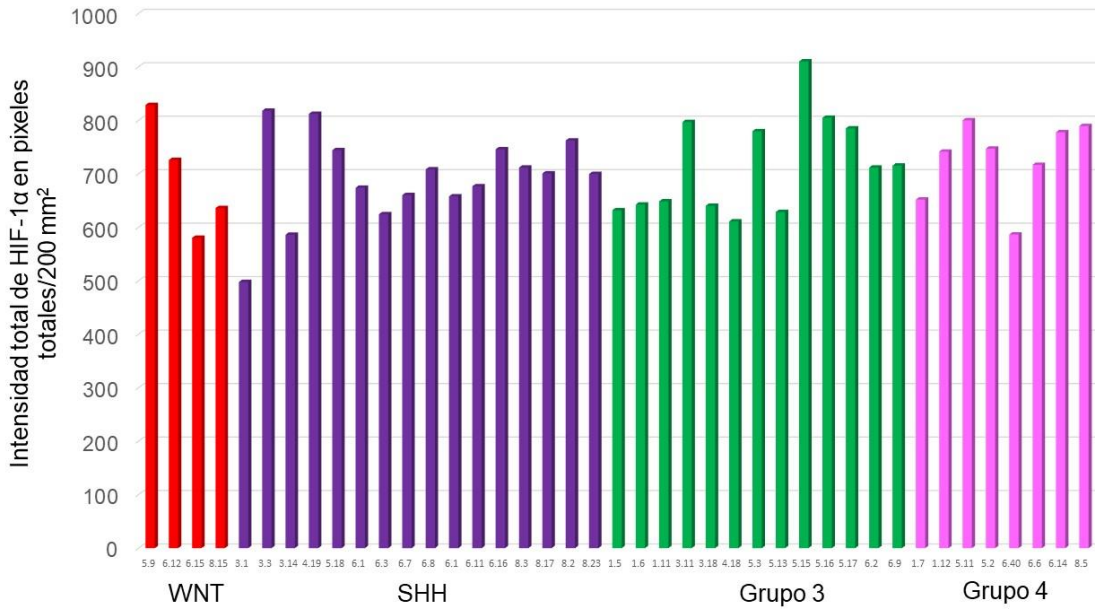
#### 7.2.2 La proteína HIF-1 $\alpha$ no presenta expresión diferencial en pacientes pediátricos con meduloblastoma.

Con el propósito de analizar las diferencias en la intensidad de expresión de HIF-1 $\alpha$  entre los pacientes, las laminillas previamente digitalizadas se analizaron cuantitativamente con el programa de análisis ImageScope (APERIO®, Leica), para ello se marcaron en el tejido de los 3 spots 5 cuadros de 200 $\mu\text{m}^2$  en los que se delimitaría solo áreas tumorales, y de ellos se cuantificó las intensidades leve, moderada y severa de cada cuadro, de estas tres intensidades se obtuvo la intensidad total por cuadro y estos fueron promediados, obteniendo así la intensidad total de cada paciente en (píxeles/200 $\mu\text{m}^2$ ) (Figura 8a). Estas fueron graficadas por cada paciente (Figura 8b) y se agruparon por subgrupo molecular (Figura 8c), no se observó ninguna tendencia y tampoco diferencias estadísticamente significativas (ANOVA) del análisis de intensidad de tinción entre subgrupos moleculares al emplear el software, esto último se observa en la Figura 8d.

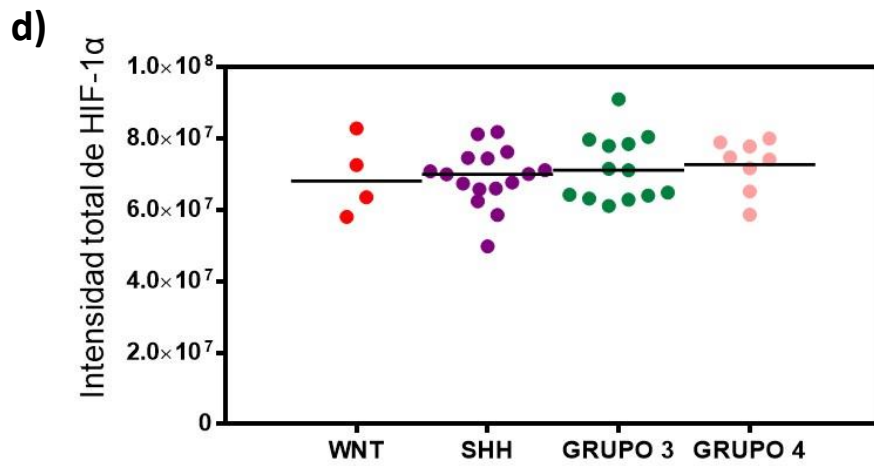
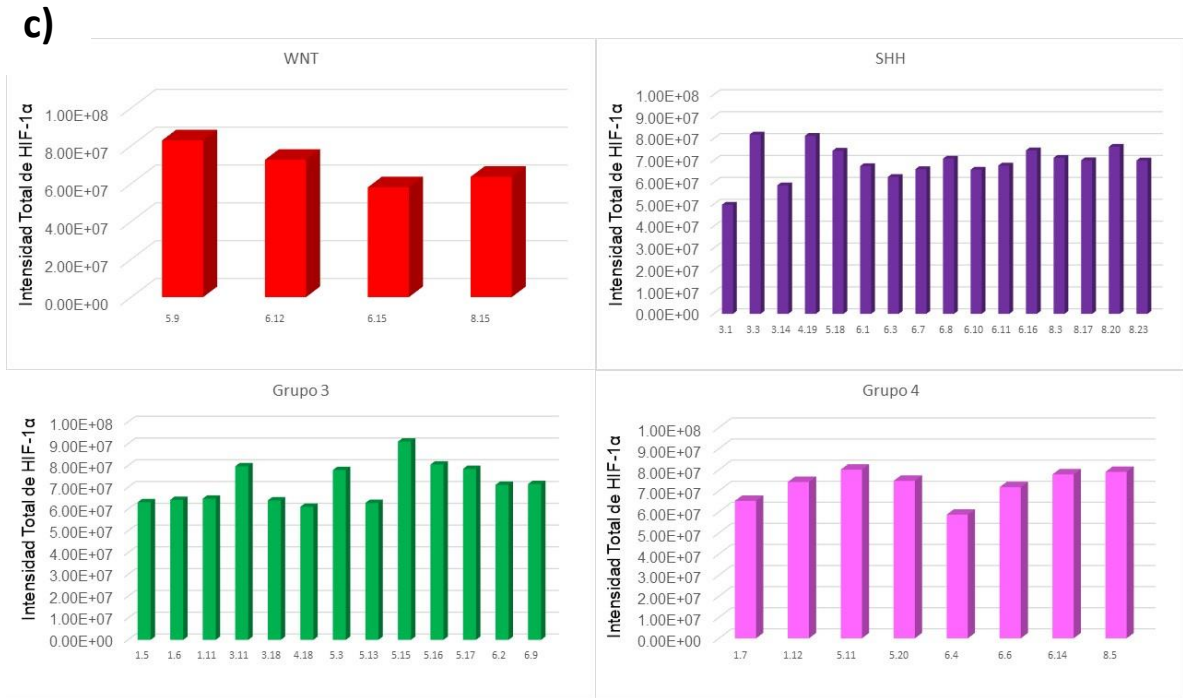
a)



b)







WNT	SHH	GRUPO 3	GRUPO 4
6.928e+007	6.925e+007	7.159e+007	7.264e+007
1.087e+007	8.083e+006	9.240e+006	7.360e+006
5.435e+006	2.021e+006	2.563e+006	2.602e+006

**Figura 8. Determinación de la intensidad de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en muestras de pacientes pediátricos con meduloblastoma.**

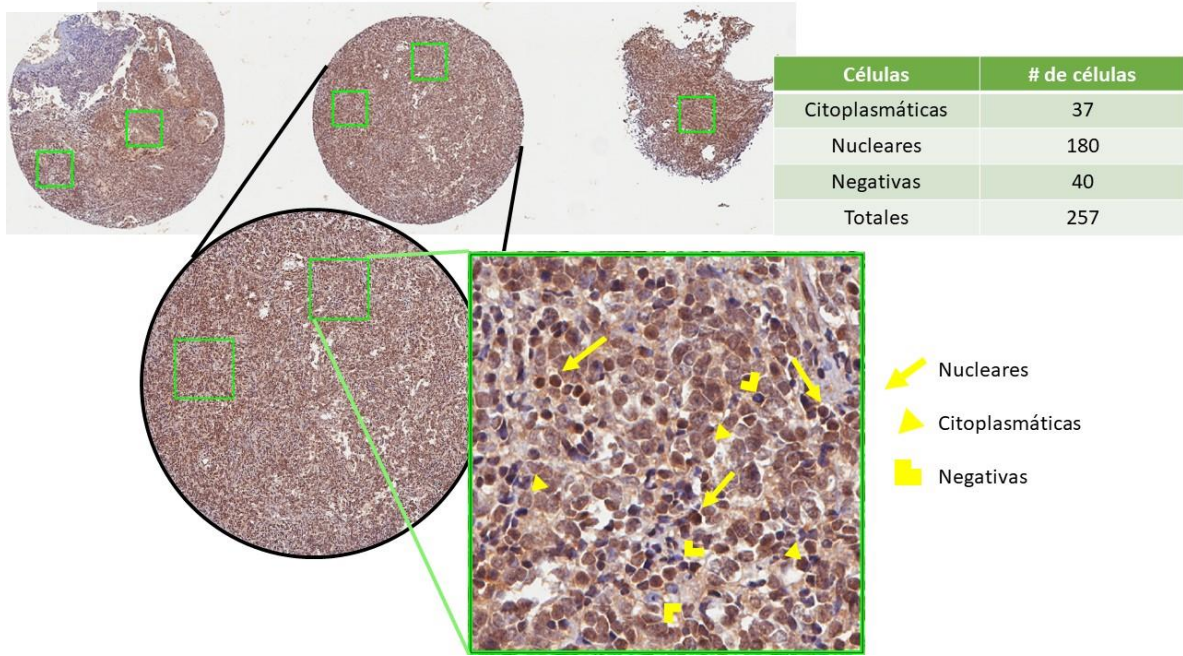
a) Representación del análisis cuantitativo en 200  $\mu\text{m}^2$  de la intensidad total, el rojo marca la intensidad fuerte, el naranja la moderada, el amarillo la leve y en azul está lo negativo.

En el recuadro superior se observan las 4 tonalidades y en el inferior principalmente el rojo y el amarillo, además los datos que el programa arroja con las tres intensidades de las que se realizó la sumatoria. En b) se graficaron estas sumatorias por paciente en (píxeles/ $200\mu\text{m}^2$ ), estos resultados se agruparon de acuerdo con los subgrupos moleculares y observamos en c) los WNT, SHH, Grupo 3 y Grupo 4. La dispersión de estos se presenta en d). No se aprecia diferencia estadística.

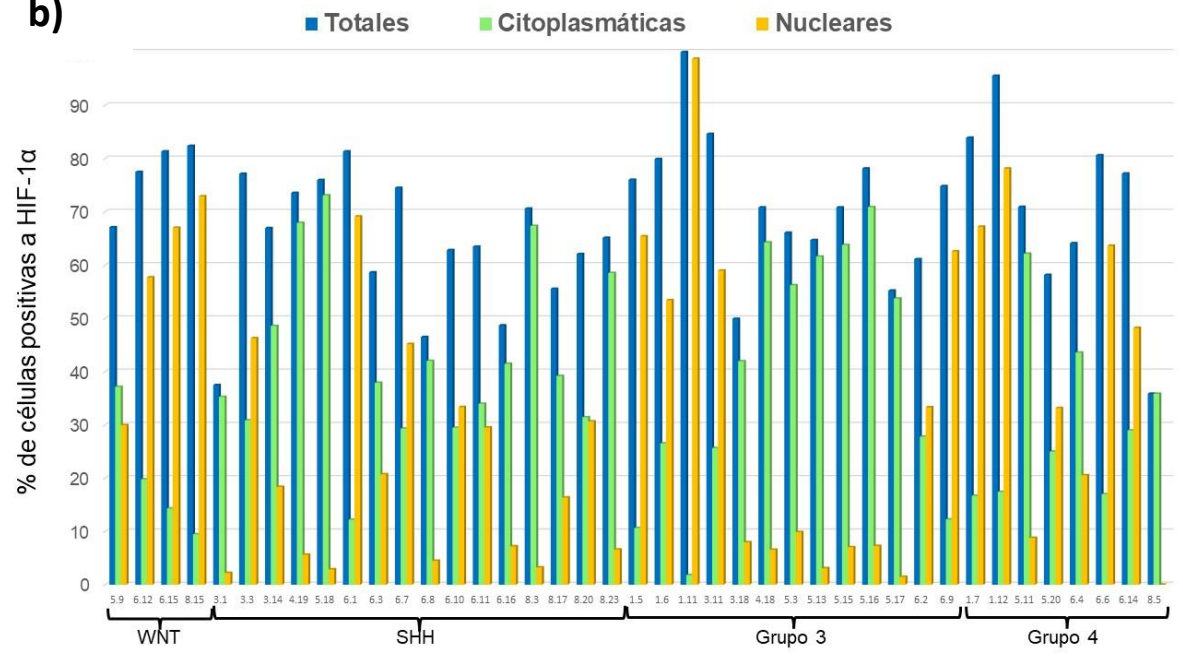
7.2.3. Los subgrupos moleculares presentan diferencias en el porcentaje de células HIF-1 $\alpha$  núcleo positivas.

Debido a que no se encontraron diferencias significativas con el análisis empleando el software, se procedió a realizar un análisis más específico, en las áreas previamente seleccionadas para el análisis de la intensidad, se cuantificó el número de células positivas solo en el citoplasma y las positivas en citoplasma y núcleo, esto debido a que HIF-1 sólo puede regular transcripcionalmente a sus genes blanco cuando la fracción  $\alpha$  ha traslocado al núcleo para unirse con la fracción  $\beta$ , por lo tanto, realizar el conteo diferencial distingue cuales células tienen a HIF-1 regulando a sus genes, y cuáles solo lo tienen acumulado, pero sin regular sus genes blanco. De las áreas contadas, se hizo la sumatoria para obtener las totales positivas y de los 5 recuadros se sacó el promedio. Finalmente, se obtuvo el porcentaje de los diferentes parámetros (Figura 9a), estos se graficaron por paciente (Figura 9b) y por medias de cada subgrupo molecular (Figura 9c), se puede observar que son muy variables los porcentajes de células entre los mismos pacientes, y entre las medias de cada subgrupo molecular, sobre todo en esta última se aprecia como el subgrupo molecular WNT presenta mayor porcentaje de células nucleares, seguido por Grupo 4, SHH y en último lugar se encuentra Grupo 3 con el menor porcentaje de células nucleares. Por otra parte, se aprecia como son diferentes los porcentajes de células nucleares positivas a HIF-1 $\alpha$  entre cada subgrupo, los datos se agruparon en la Figura 9d) los WNT, 9e) SHH, 9f) Grupo 3 y 9g) Grupo 4.

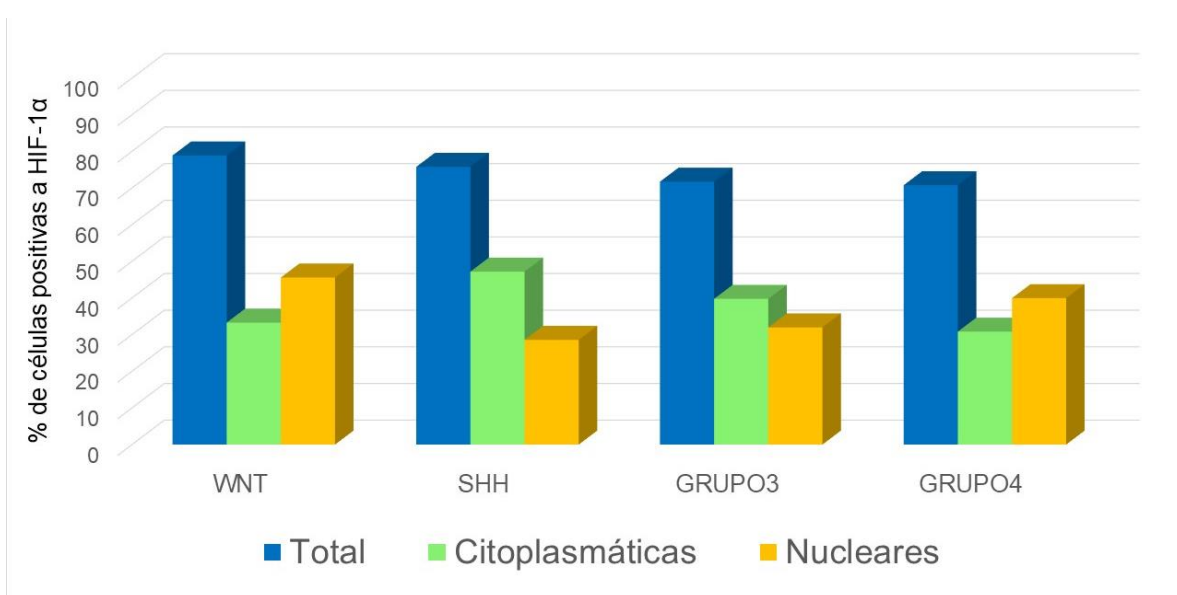
a)



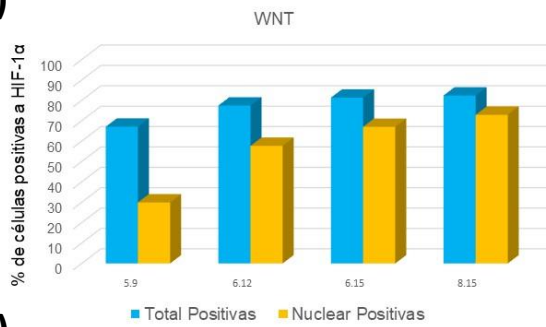
b)



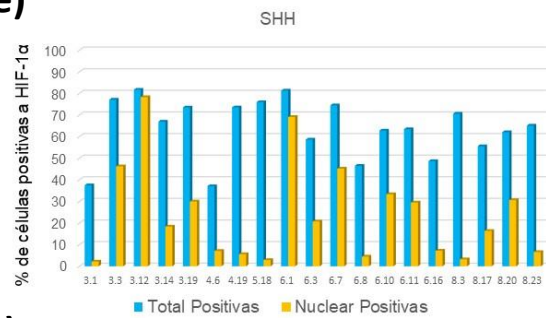
c)



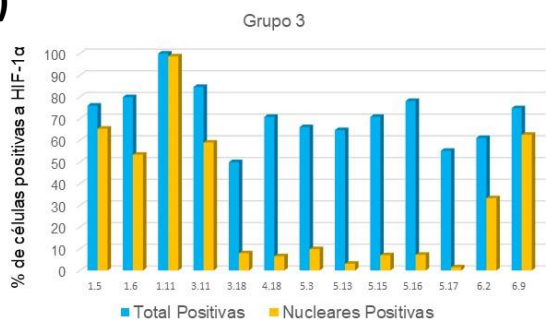
d)



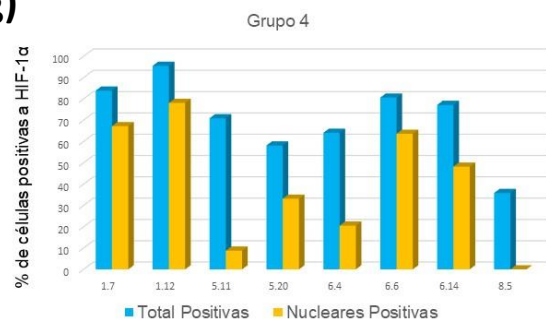
e)



f)



g)



**Figura 9. Determinación del porcentaje de células HIF-1 $\alpha$  nucleares positivas en muestras de pacientes pediátricos con meduloblastoma.**

a) Representación del análisis del % de células positivas a HIF-1 $\alpha$  en citoplasma (cabeza de flecha), núcleo (flecha) y negativas (asterisco) en 5 recuadros de 200  $\mu\text{m}^2$  por paciente. En b) se representa gráficamente el % de las células totales positivas (azul), que es la sumatoria de las citoplasmáticas positivas (verde) y nucleares (amarillo) por cada uno de los pacientes, c) los resultados se agruparon en subgrupo molecular sin mostrar diferencia estadística, y observamos el % de las células nucleares positivas respecto a las totales de cada paciente en d) los WNT, e) SHH, f) Grupo 3 y g) Grupo 4.

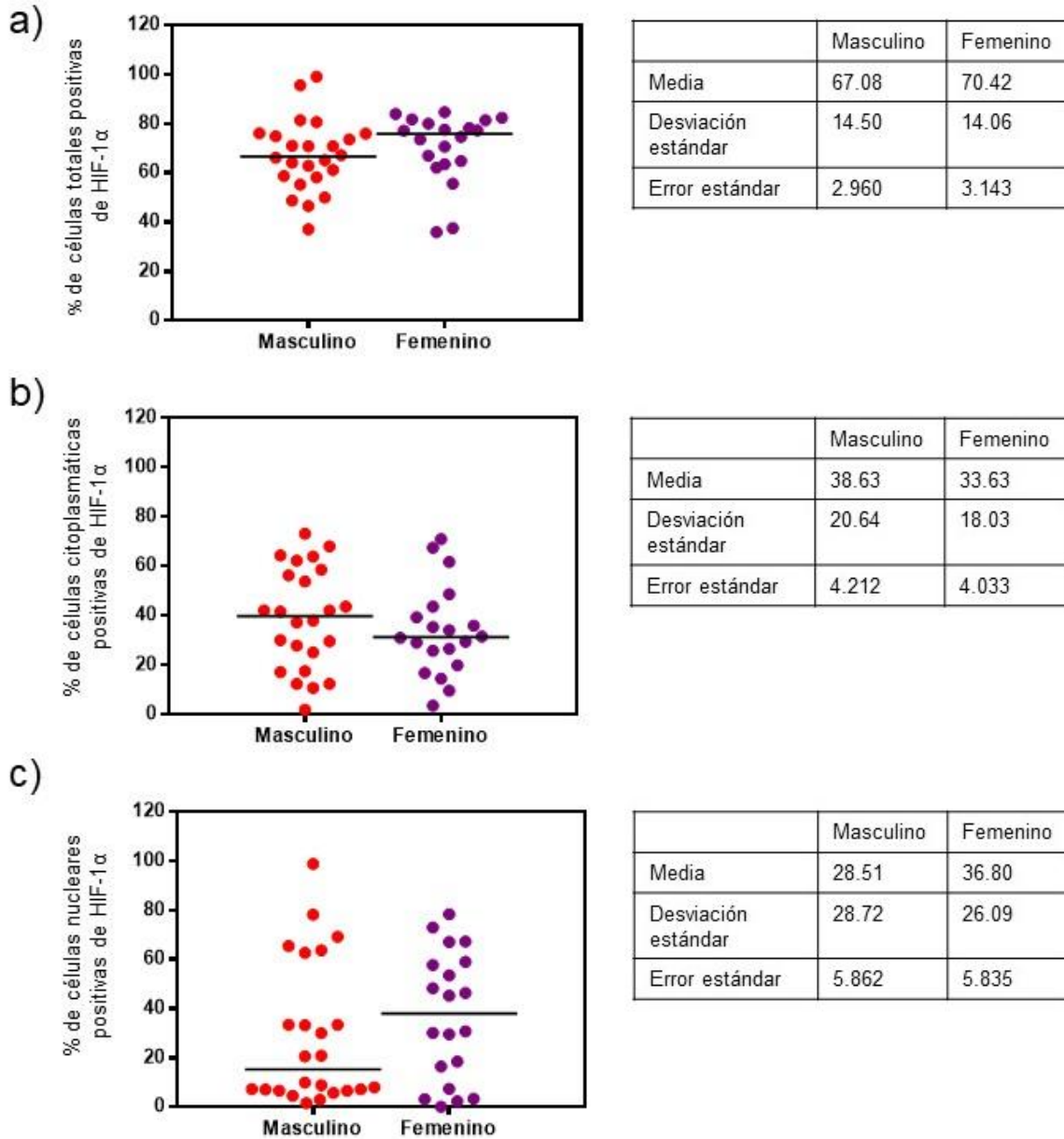
**Objetivo 3. *Evaluar la asociación de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  con los diferentes datos clínicos.***

7.3.1. La expresión nuclear de HIF-1 $\alpha$  se asocia con riesgo estándar y muerte.

Con la finalidad de evaluar una posible asociación de la expresión de HIF-1 $\alpha$  con los datos clínicos de los pacientes se analizó el número de células positivas totales, citoplasmáticas y nucleares, a las cuales se les aplicó la prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$  con los datos demográficos como sexo (Figura 10A), edad (Figura 10B), entre subgrupos moleculares (Figura 10C), asociación con el riesgo (Figura 10D), recaída (Figura 10E) y supervivencia (Figura 10F). Los datos se presentan en gráficas de puntos donde se puede apreciar la dispersión de los datos, siendo significativo una  $p > 0.05$ .

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de sexo, edad, subgrupos moleculares y recaída. Sin embargo, se aprecia una tendencia entre los subgrupos moleculares, donde WNT tiene mayor porcentaje de células nucleares de HIF-1 $\alpha$ , seguido por el subgrupo Grupo 4, SHH y, por último, el Grupo 3 es el que presenta menor porcentaje de células nucleares.

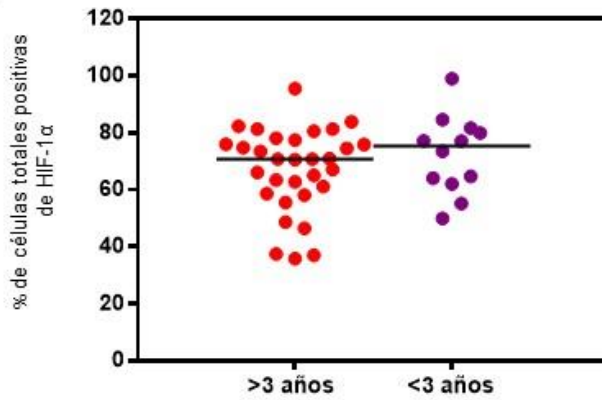
En lo que respecta a los grupos de riesgo, estos se dividen en alto y estándar, los cuáles se clasificaron al momento del diagnóstico en base a la edad del paciente y porcentaje de resección quirúrgica, se obtuvo una diferencia significativa donde se aprecia que los pacientes clasificados como riesgo estándar presentan mayor porcentaje de células nucleares positivas a comparación de aquellos clasificados como alto riesgo. También se encontraron diferencias significativas en los pacientes que fallecieron y los que sobrevivieron, aquellos pacientes que fallecieron presentan mayor porcentaje de células positivas en el núcleo a comparación de los pacientes que sobrevivieron.



**Figura 10. Determinación del porcentaje de células HIF-1 $\alpha$  nucleares positivas, clasificadas por sexo.**

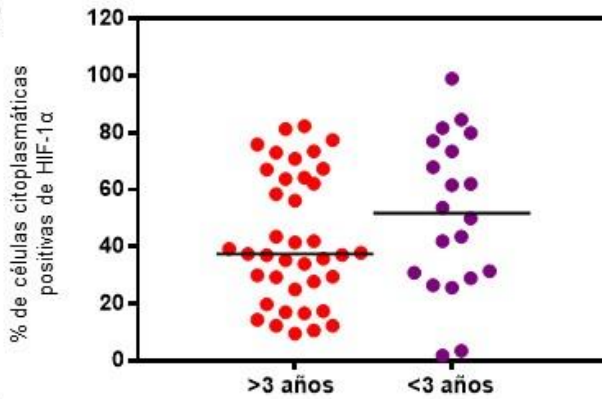
(a) Conteo del porcentaje de células positivas totales, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), (b) Conteo del porcentaje de células citoplasmáticas positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), (c) Conteo del porcentaje de células nucleares positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

a)



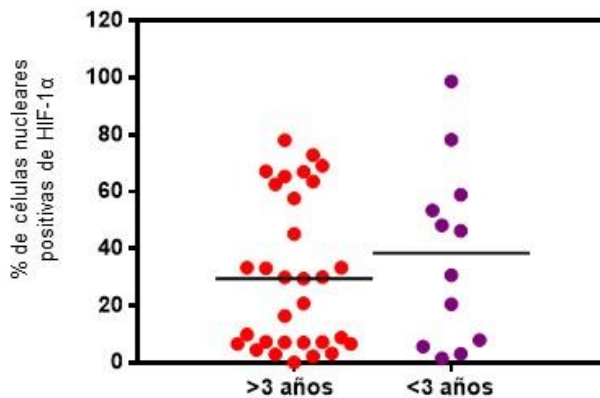
	>3 años	<3 años
Media	67.17	72.42
Desviación estándar	14.59	13.76
Error estándar	2.621	3.973

b)



	Masculino	Femenino
Media	38.63	33.63
Desviación estándar	20.64	18.03
Error estándar	4.212	4.033

c)

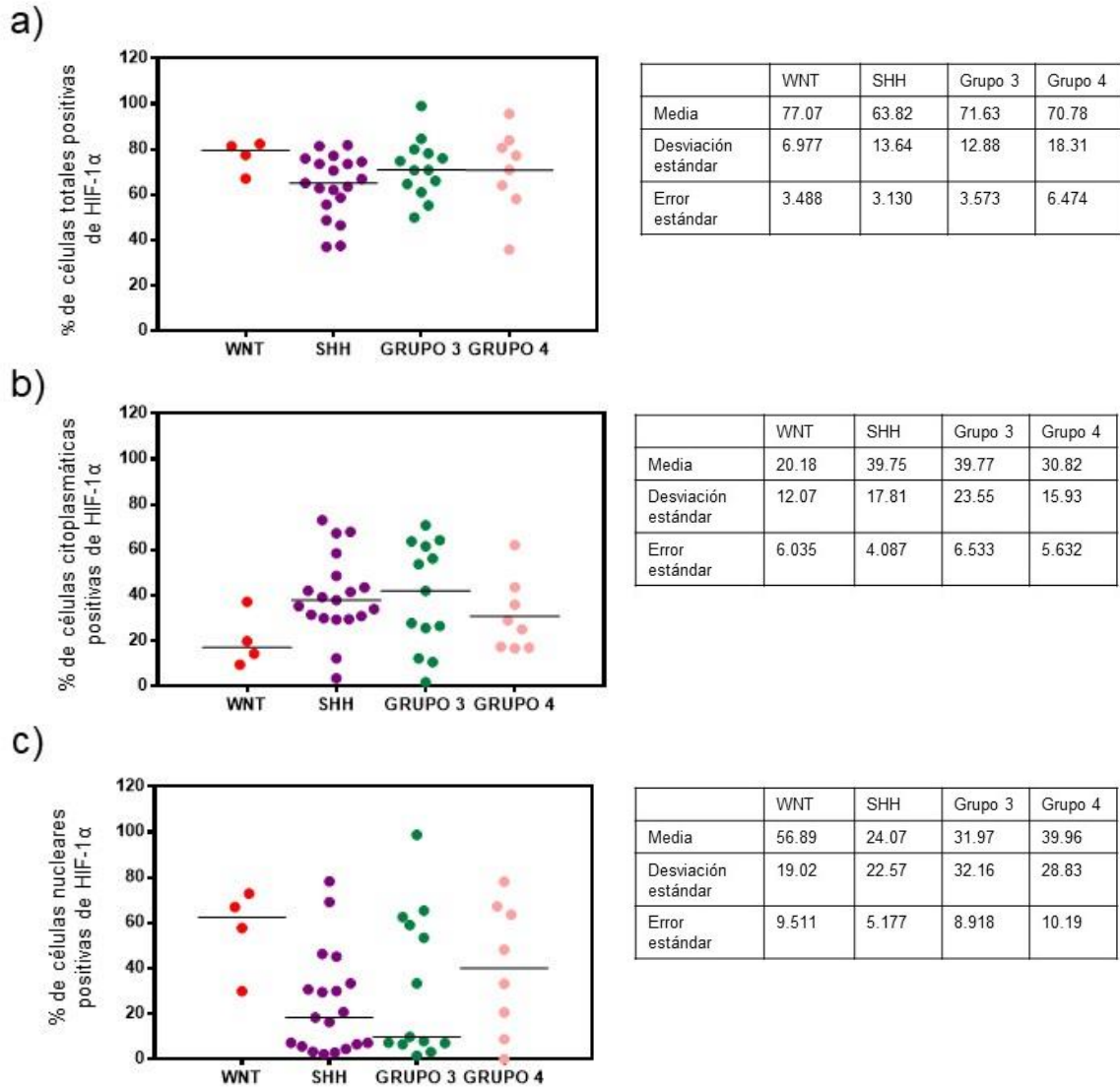


	Masculino	Femenino
Media	28.51	36.80
Desviación estándar	28.72	26.09
Error estándar	5.862	5.835

**Figura 11. Determinación del porcentaje de células HIF-1 $\alpha$  nucleares positivas, clasificado por grupos de edad.**

(a) Conteo del porcentaje de células totales positivas (prueba estadística de U-de Mann Whitney,  $p > 0.05$ ), (b) Conteo del porcentaje de células citoplasmáticas positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ), (c) Conteo del porcentaje de células nucleares positivas (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ).

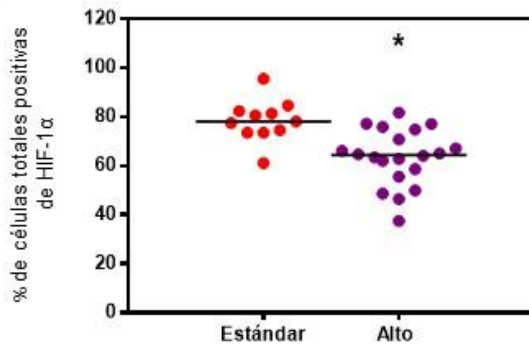




**Figura 12. Determinación del porcentaje de células HIF-1 $\alpha$  nucleares positivas, clasificado por subgrupo molecular.**

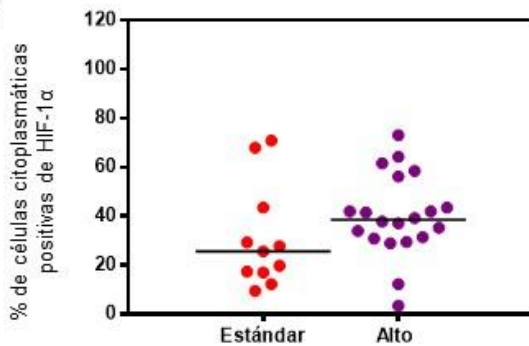
(a) Conteo del porcentaje de células totales positivas, (b) Conteo del porcentaje de células citoplasmáticas positivas, (c) Conteo del porcentaje de células nucleares positivas.

a)



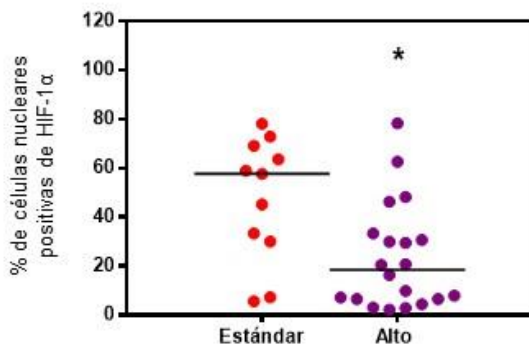
	Estándar	Alto
Media	78.43	63.49
Desviación estándar	8.514	11.53
Error estándar	2.567	2.578

b)



	Estándar	Alto
Media	30.99	40.12
Desviación estándar	21.15	16.78
Error estándar	6.377	3.751

c)

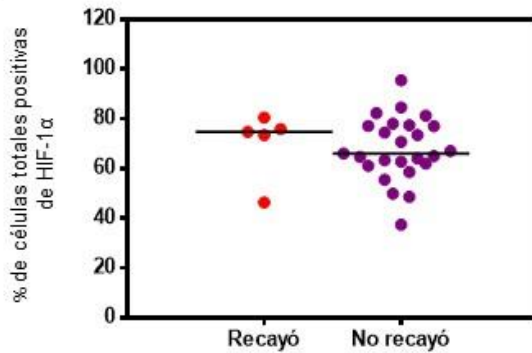


	Estándar	Alto
Media	47.44	23.37
Desviación estándar	25.36	21.61
Error estándar	7.646	4.832

**Figura 13. Determinación del porcentaje de células HIF-1 $\alpha$  nucleares positivas, clasificado por grupo de riesgo.**

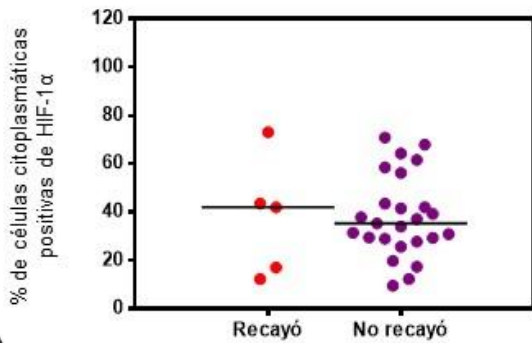
(a) Conteo del porcentaje de células totales positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), (b) Conteo del porcentaje de células citoplasmáticas positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ), (c) Conteo del porcentaje de células nucleares positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

a)



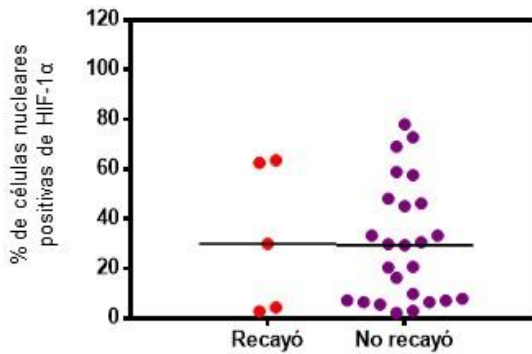
	Recayó	No recayó
Media	70.28	67.98
Desviación estándar	13.56	12.76
Error estándar	6.065	2.551

b)



	Recayó	No recayó
Media	37.56	38.08
Desviación estándar	24.40	16.93
Error estándar	10.94	3.385

c)

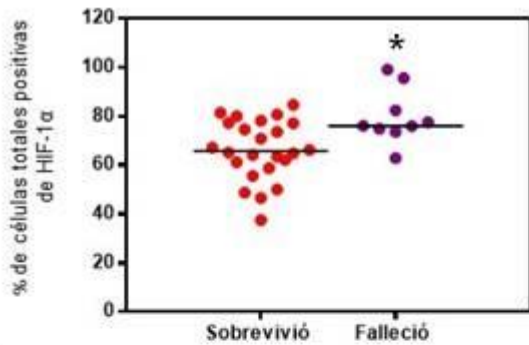


	Recayó	No recayó
Media	32.72	29.89
Desviación estándar	29.75	23.82
Error estándar	13.31	4.764

**Figura 14. Determinación del porcentaje de células HIF-1 $\alpha$  nucleares positivas, clasificado por recaída.**

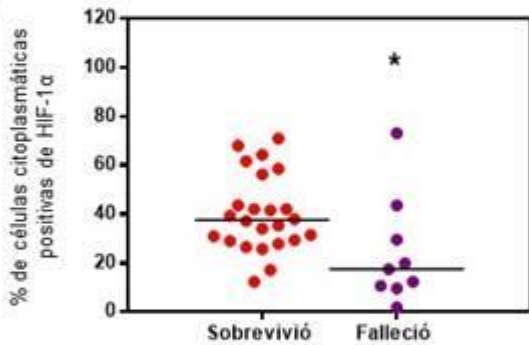
(a) Conteo del porcentaje de células totales positivas (prueba estadística de U-de Mann Whitney,  $p > 0.05$ ), (b) Conteo del porcentaje de células citoplasmáticas positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ), (c) Conteo del porcentaje de células nucleares positivas (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ).

a)



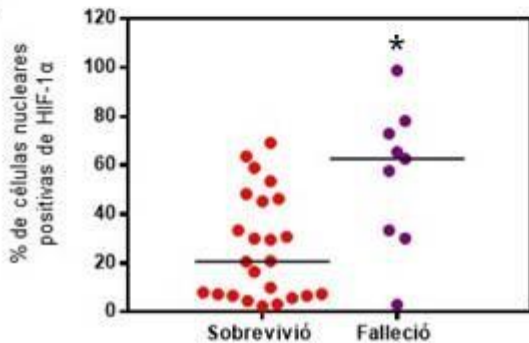
	Sobrevivió	Falleció
Media	66.18	79.72
Desviación estándar	12.35	11.24
Error estándar	2.520	3.747

b)



	Sobrevivió	Falleció
Media	40.06	24.15
Desviación estándar	15.77	22.08
Error estándar	3.219	7.361

c)



	Sobrevivió	Falleció
Media	26.12	55.74
Desviación estándar	21.52	29.04
Error estándar	4.393	9.679

**Figura 15. Determinación del porcentaje de células HIF-1 $\alpha$  nucleares positivas, clasificado por sobrevida.**

(a) Conteo del porcentaje de células totales positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), (b) Conteo del porcentaje células citoplasmáticas positivas, (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ), (c) Conteo del porcentaje de células nucleares positivas (prueba estadística de U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

## 8. Discusión

Las neoplasias del SNC ocupan la tercera causa de cáncer infantil, siendo el meduloblastoma la neoplasia sólida más frecuente y la segunda causa de muerte por cáncer en menores de 15 años. La incorporación de técnicas moleculares para el diagnóstico de estas neoplasias ha significado un gran avance en la clasificación, diagnóstico y tratamiento, sin embargo, estos esfuerzos no son suficientes y es necesario comprender mejor la fisiopatología de este tumor y para ello la participación del microambiente tumoral. Un aspecto crucial en la tumorigénesis es el microambiente hipóxico tumoral, que a través del Factor Inducible en Hipoxia 1 (HIF-1) regula diversos genes que contribuyen en el mantenimiento, progresión y metástasis, por lo que este factor ha sido ampliamente estudiado en diversos tipos de cáncer, mostrando una asociación con mal pronóstico y baja sobrevida (35).

En condiciones normales de oxígeno la subunidad  $\alpha$  es degradada por el proteasoma S26 rápidamente en una modificación postraducciona, en tanto que en hipoxia al no ser degradada esta proteína transloca al núcleo, y se une con la fracción  $\beta$  (ARNT) que es constitutiva, formando así el heterodímero HIF-1 que se unirá con los elementos respondedores de hipoxia (HREs) en el promotor de sus genes blanco (36), de tal modo que la actividad de la subunidad  $\alpha$  es postraducciona no modificando los niveles de su mRNA, sin embargo, existen reportes en los que se ha documentado el aumento del mensajero (70).

Esto es muy relevante en el presente estudio ya que nosotros evaluamos los niveles de mRNA y de proteína de la subunidad HIF-1 $\alpha$  en 41 pacientes con meduloblastoma pediátrico y de 4 cerebelos sanos como controles. En donde observamos, que los niveles de mensajero no presentaron diferencias significativas en comparación con los controles, esto discrepa con lo reportado por Cruzeiro en 2018, en donde reportan una expresión elevada del mensajero de 41 meduloblastomas en comparación con los controles sanos, los cuales fueron 6 cerebelos fetales no-neoplásicos (63), esto podría marcar una diferencia entre ambos estudios ya que en el nuestro incluimos cerebelos de autopsias no fetales.

Respecto a los niveles de la proteína de la subunidad  $\alpha$ , evaluada por tinciones de inmunohistoquímica en los microarreglos de tejidos, se realizó la cuantificación de la intensidad total de la proteína, observando altos niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  en el tejido de los pacientes con meduloblastoma. Ya que la acumulación de la subunidad  $\alpha$  en el núcleo nos sugiere su actividad transcripcional se cuantifico el porcentaje de células positivas totales, citoplasmáticas y nucleares, presentando en todos los pacientes un número elevado de células positivas tumorales pero entre ellos existen diferencias en el porcentaje de células nucleares positivas, este hallazgo correlaciona con lo reportado en el 2016 por Assimakopoulou, evaluando 9 MB describieron el aumento en el porcentaje de células tumorales HIF-1 $\alpha$  positivas (71). Los resultados de ambos análisis se agruparon por subgrupo molecular, en la cuantificación total de la expresión no se presentan diferencias, mientras que para el porcentaje de células nucleares observando una tendencia sin ser significativos; esto puede deberse al número de muestras que se incluyeron en el estudio, no obstante, podemos discutir lo siguiente.

El subgrupo molecular WNT es el que presenta mayor porcentaje de células positivas para HIF-1 $\alpha$  en el núcleo, previamente se ha descrito que en algunos tipos de cáncer HIF-1 tiene la capacidad de regular diversas funciones a través de la activación de la vía WNT/ $\beta$ -catenina, sin embargo, esta activación no es directa, la vía es regulada por genes que a su vez son regulados por HIF-1 (72,73). Ejemplos de ello son: Liu y colaboradores describieron en 2021 que en cáncer de mama HIF-1 tiene la capacidad de regular transcripcionalmente a la calreticulina, proteína involucrada en la homeostasis de calcio, apoptosis y muerte celular inmunogénica; y su sobreexpresión se asocia a mal pronóstico, además de ser un marcador de células madre. Se sabe que la calreticulina promueve los efectos descritos gracias a que activa a la vía WNT/ $\beta$ -catenina, demostrando así la relación de HIF-1 con la vía WNT (72). De igual manera, en 2020 Jiang y colaboradores describieron en adenocarcinoma pulmonar la sobreexpresión del miR-1275, correlacionando con baja sobrevida y sobrevida libre de recurrencia, al promover células madre. Este

miRNA es regulado por HIF-1 y sus efectos son efectuados por la co-activación de la vía NOTCH, así como de WNT/ $\beta$ -catenina (73).

Posteriormente, se encuentra al subgrupo molecular SHH en porcentaje de células positivas nucleares para HIF-1 $\alpha$ , este subgrupo se caracteriza por tener mutaciones en genes involucrados en la vía SHH (74). Se ha reportado en diversos tipos de cáncer que HIF-1 tiene la capacidad de regular y sobreexpresar a la vía SHH. Células de cáncer de páncreas tienen la capacidad de secretar a la proteína SHH en condiciones de hipoxia, dependiendo de la sobrerregulación, expresión y eficiencia de la secreción de HIF-1, adicionalmente observaron que la secreción de SHH por las células tumorales estimulan el crecimiento de los fibroblastos en co-cultivo, promoviendo el enriquecimiento del estroma tumoral (75). En otro reporte donde se evalúan 71 tejidos de pacientes con neuroblastoma (NB), se describe que los niveles de HIF-1 $\alpha$  y de componentes de la vía SHH como PTCH1 y GLI están elevados en estadios avanzados, de igual manera evaluando las líneas celulares IMR32 y SH-SY5Y de NB, se llegó a la conclusión de que la proliferación, migración y la capacidad de invasión de las células se ven aumentadas con la presencia de HIF-1 $\alpha$ , lo cual demuestra la importancia de este factor en este tipo de cáncer (76).

En cuarta posición tenemos al Grupo 3, este último se caracteriza por la sobrerregulación del factor de transcripción C-Myc (77,78). En este caso se ha descrito que HIF-1 y C-Myc son factores de transcripción antagonistas en la regulación metabólica y en la proliferación celular, HIF-1 tiene la capacidad de inhibir a C-Myc, lo cual puede explicar la razón por la que los MB de Grupo 3 tengan niveles bajos de HIF-1 debido a que estos tienen niveles exacerbados de C-Myc y su sobreexpresión en este subgrupo molecular no se vea afectada por HIF-1 al no expresarse muchas células positivas en el núcleo a la fracción  $\alpha$  (79,80). En 2005 Corn y colaboradores describieron al evaluar las líneas celulares HeLa (cáncer cervicouterino), H460 (carcinoma de pulmón de células grandes) y SW480 (adenocarcinoma colorrectal) que Mxi1, una proteína represora del factor de

transcripción c-Myc, es regulado transcripcionalmente por HIF-1, además de que en condiciones de hipoxia (0.1% de O<sub>2</sub>/ 48 horas) HIF-1 promueve la sobreexpresión de Mxi1 el cual tiene la capacidad de inhibir la apoptosis promovida por c-Myc, uniéndose Mxi1 con MAX, compitiendo con c-Myc (80).

Asimismo, dentro de nuestros resultados se encontraron diferencias significativas entre los pacientes que sobrevivieron y fallecieron, encontrando un mayor número de células positivas en el núcleo a HIF-1 $\alpha$  en los pacientes que fallecieron, lo cual puede sugerir que HIF-1 pueda ser un marcador de baja supervivencia como en otros tipos de cáncer como cáncer de cérvix, glioblastoma, cáncer de hígado, de mama, de próstata y de pulmón (49,51,52,56,58,60).

Respecto a lo que se ha reportado en MB relacionado con el factor de transcripción HIF-1, este puede tener un papel importante. Se observó la sobreexpresión de HIF-1 en 41 muestras congeladas de pacientes pediátricos con MB y en células UW402 (subgrupo molecular SHH) y que a su vez se incrementan diversos genes blancos como VEGF, GLUT1 y la anhidrasa carbónica 9 (CA9). También se encontró en ese mismo estudio que al inhibir la expresión de HIF-1 $\alpha$  decrece la proliferación celular, confirmando de esta manera que HIF-1 puede tener un papel muy importante para la proliferación y la supervivencia de las células tumorales de MB (63).

En otros tumores (47) se ha reportado el aumento en los niveles de proteína y la localización nuclear de HIF-1 $\alpha$ ,

En otro trabajo se demostró que células DAOY expuestas a hipoxia generan resistencia a fármacos al inhibir 3 citocromos, consecuencia de la sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$ . Y que inhibiendo a HIF-1 $\alpha$  con el fármaco 2-metoxiestradiol (2ME) se eliminaban los efectos de quimiorresistencia, de esta forma reforzando la aseveración de que HIF-1 promueve resistencia a fármacos (64).



Por otra parte, el grupo de Blazek demostró que la hipoxia incrementa la expresión de CD133 en células DAOY confiriéndoles radioresistencia (83), posteriormente, Pistollato observó en tejido de pacientes con MB que la hipoxia a través de HIF-1 $\alpha$  mantiene a Notch1 en su forma activa, preservando la viabilidad y expansión de células madre neuronales neoplásicas (81).

Todos estos estudios demuestran la participación de HIF-1 como un factor pro tumoral, no obstante, de manera contraria, existen otro estudio que reportan lo contrario, como es el caso que en las líneas celulares DAOY y D283 sometidas a hipoxia por cámara de hipoxia (82), no mostraron un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$ , además de que diversos efectos promovidos por HIF-1, como la proliferación celular, migración o expresión de genes blanco como VEGF y c-MYC, no tenían un cambio o este no era significativo (82). De esta manera, los autores concluyeron que no hay sobreexpresión de HIF-1 en el MB, y que la inducción de hipoxia no cambia dramáticamente el efecto que pueda tener este factor de transcripción sobre las células tumorales. Sin embargo, no se puede descartar que se pueda existir una inducción de HIF-1 a través de diversas vías y en diferentes condiciones a las hipoxia (82) por lo que es necesario analizando los patrones de expresión de HIF-1 $\alpha$ , tanto en las células tumorales así como en residentes, en regiones perinecroticas y perivasculares y realizar más estudios para comprender las implicaciones del factor HIF-1 en el meduloblastoma.

## 10. Resumen de resultados

Se encontró una tendencia del conteo de células positivas en el núcleo a HIF-1 $\alpha$  entre subgrupos moleculares, el grupo con mayor conteo fue WNT, seguido de Grupo 4, Grupo 3 y SHH.

No se encontraron diferencias significativas del conteo de células positivas a HIF-1 $\alpha$  en el núcleo y el citoplasma entre los diferentes datos clínicos como grupos de edad (<3 años, >3 años), sexo (masculino, femenino), recaída (recayó, no recayó).

Por otra parte, se lograron ver diferencias significativas entre grupos de riesgo, todos los pacientes que se clasificaron como Riesgo estándar presentan mayor conteo de células positivas en el núcleo a HIF-1 $\alpha$  en comparación con los pacientes clasificados como Alto riesgo y finalmente, se encontraron diferencias significativas entre los pacientes que sobrevivieron y fallecieron, aquellos pacientes que fallecieron presentaron mayores niveles de células positivas en el núcleo a HIF-1 $\alpha$ .

## 11. Conclusiones

En el presente trabajo se logró evaluar la expresión génica y proteica de HIF-1 $\alpha$  en 41 muestras pediátricas con MB, observando que no existe una diferencia significativa en el mRNA entre los pacientes con MB y los casos de cerebelo sano.

Además, se encontraron diferencias en los niveles de células nucleares positivas entre subgrupos moleculares de MB, teniendo al subgrupo molecular WNT como el que presentó los niveles más elevados, seguido por Grupo 4, SHH y Grupo 3. También se observaron diferencias entre los pacientes que fallecieron y sobrevivieron, en donde aquellos pacientes que fallecieron tuvieron niveles nucleares altos de la subunidad  $\alpha$ , y que una mayor expresión citoplasmática de HIF-1 $\alpha$  se relaciona con la sobrevivencia de los pacientes. Por último, se encontraron diferencias entre los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  de los pacientes con riesgo estándar y alto riesgo, observando que todos aquellos pacientes clasificados como riesgo estándar presentaron mayor expresión nuclear de HIF-1.

## 12. Perspectivas

Evaluar la expresión de HIF-1 en líneas celulares de MB, induciendo la hipoxia por medio de fármacos y empleando una cámara de hipoxia, analizando por técnicas de Western Blot e inmunocitoquímica los niveles de proteína de HIF-1 $\alpha$  en hipoxia y normoxia, así como el mRNA.

Realizar la evaluación de diferentes genes blanco de HIF-1, tales como VEGF1, CCL20 y CCR6.

Para poder realizar una posible correlación con los datos clínicos. Realizar co-cultivos con células líneas celulares de astrocitos y/o microglía, evaluando el efecto de la inducción de HIF-1.

Por último, realizar un modelo de xenotrasplante murino en ratones Nu/Nu desnudos, inoculando células DAOY vía intradérmica, promoviendo la inducción e inhibición de HIF-1 $\alpha$  y monitoreando el crecimiento tumoral y sobrevida.

## 13. Referencias

1. Um P. Cancer, Definition. In: Highlander SK, Rodriguez-Valera F, White BA, editors. Encyclopedia of Metagenomics: Environmental Metagenomics [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2015. p. 65. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7475-4\\_106](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7475-4_106)
2. OMS | Cáncer. WHO [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 18]; Available from: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
3. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. International Agency for Research on Cancer 2020. Glob Cancer Obs Cancer Today [Internet]. 2020;419:1–2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>

4. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. Globocan 2020: México. *Int Agency Res Cancer*. 2020;929:29–30.
5. Secretaria de Salud. Programa de Acción Específico. Cáncer en la infancia y la adolescencia 2013-2018. Programa Sectorial de Salud. 2014.
6. Burstein R, Henry NJ, Collison ML, Marczak LB, Sligar A, Watson S, et al. Mapping 123 million neonatal, infant and child deaths between 2000 and 2017. *Nature* [Internet]. 2019;574(7778):353–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1545-0>
7. Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, et al. Medulloblastoma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2019;5(1):1–20. Available from: [10.1038/s41572-019-0063-6](https://doi.org/10.1038/s41572-019-0063-6)
8. Gupta K, Jogunoori S, Satapathy A, Salunke P, Kumar N, Radrota BD, et al. Medulloblastoma with myogenic and / or melanotic differentiation does not align immunohistochemically with the genetically defined molecular subgroups. *Hum Pathol* [Internet]. 2018;75:26–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.01.014>
9. López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rivera-Márquez H, Siordia-Reyes G, Betanzos-Cabrera Y, Cerecedo-Díaz F, et al. Clinical and Molecular Parameters for Risk Stratification in Mexican Children with Medulloblastoma. *Arch Med Res* [Internet]. 2007;38(7):769–73. Available from: [10.1016/j.arcmed.2007.04.012](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.04.012)
10. Doussouki M El, Gajjar A, Chamdine O. Molecular genetics of medulloblastoma in children : diagnostic , therapeutic and prognostic implications. *Futur Neurol* [Internet]. 2019;14(1):20–33. Available from: <https://doi.org/10.2217/fnl-2018-0030>
11. Louis DN, Ohgaki H, Wiestier OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed. Louis DN, Ohgaki H, Wiestier OD, Cavenee WK, editors. Lyon: IARC; 2016. 408 p.

12. de la Cruz Pabón JR, Patiño Hoyos MA, Quiceno Restrepo E, Toro Montoya AE. Medulloblastoma : de la clasificación histológica a la molecular. Med UPB [Internet]. 2018;37(1):47–54. Available from:  
<https://doi.org/10.18566/medupb.v37n1.a06>
13. Bailey P, Cushing HW. Medulloblastoma cerebelli: a common type of midcerebellar glioma of childhood. J Nerv Ment Dis [Internet]. 1925;14:192–224. Available from: 10.1001/ARCHNEURPSYC.1925.02200140055002
14. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. Cancer Cell [Internet]. 2017;31(6):737-754.e6. Available from:  
10.1016/j.ccell.2017.05.005
15. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. Acta Neuropathol [Internet]. 2012;123(4):465–72. Available from:  
10.1007/s00401-011-0922-z
16. Kuzan-Fischer CM, Juraschka K, Taylor MD. Medulloblastoma in the molecular era. J Korean Neurosurg Soc [Internet]. 2018;61(3):292–301. Available from: 10.3340/jkns.2018.0028
17. Kijima N, Kanemura Y. Molecular classification of medulloblastoma. Neurol Med Chir (Tokyo) [Internet]. 2016;56(11):687–97. Available from:  
10.2176/nmc.ra.2016-0016
18. Łastowska M, Trubicka J, Karkucińska A, Magdalena W, Tarasińska M, Perek M, et al. Immunohistochemical detection of ALK protein identifies APC mutated medulloblastoma and differentiates the WNT-activated medulloblastoma from other types of posterior fossa childhood tumors. Brain Tumor Pathol [Internet]. 2018;36(1):1–6. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10014-018-0331-2>
19. Kaur K, Kakkar A, Kumar A, Mallick S, Julka PK, Gupta D, et al. Integrating Molecular Subclassification of Medulloblastomas into Routine Clinical

- Practice: A Simplified Approach. *Brain Pathol* [Internet]. 2016;26(3):334–43. Available from: [10.1111/bpa.12293](https://doi.org/10.1111/bpa.12293)
20. Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, et al. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle*. 2006;5(22):2666–70.
  21. Skowron P, Ramaswamy V, Taylor MD. Genetic and molecular alterations across medulloblastoma subgroups. *J Mol Med* [Internet]. 2015;93(10):1075–84. Available from: [10.1007/s00109-015-1333-8](https://doi.org/10.1007/s00109-015-1333-8)
  22. Ramaswamy V, Nör C, Taylor MD. Erratum to: P53 and Medulloblastoma, (*Cold Spring Harb Perspect Med*, (2016) 6, a026278). *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2016;6(4):a029579. Available from: [10.1101/cshperspect.a029579](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029579)
  23. Cambruzzi E. Medulloblastoma, WNT-activated/SHH-activated: clinical impact of molecular analysis and histogenetic evaluation. *Child's Nerv Syst* [Internet]. 2018;34(5):809–15. Available from: [10.1007/s00381-018-3765-2](https://doi.org/10.1007/s00381-018-3765-2)
  24. Lacroix M, Riscal R, Arena G, Linares LK, Le Cam L. Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and cancer. *Mol Metab* [Internet]. 2020;33(October 2019):2–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.10.002>
  25. Menyhárt O, Giangaspero F, Gyorffy B. Molecular markers and potential therapeutic targets in non-WNT/non-SHH (group 3 and group 4) medulloblastomas. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2019;12(1):1–17. Available from: [10.1186/s13045-019-0712-y](https://doi.org/10.1186/s13045-019-0712-y)
  26. Ospina Pérez M, Muñetón Peña CM. Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. *Iatreia* [Internet]. 2006;24(1):5–15. Available from: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/84>

27. Banka S, Lederer D, Benoit V, Jenkins E, Howard E, Bunstone S, et al. Novel KDM6A (UTX) mutations and a clinical and molecular review of the X-linked Kabuki syndrome (KS2). *Clin Genet* [Internet]. 2015;87(3):252–8. Available from: 10.1111/cge.12363
28. Cassia G de S e A, Pinheiro Ferreira CA, Taranath A, Sgarbi López N, Oztekin O, Guimarães Gonçalves F, et al. Childhood Medulloblastoma Revisited. *Top Magn Reson Imaging*. 2018;27(6):479–502.
29. Pollack IF, Agnihotri S, Broniscer A. Childhood brain tumors: Current management, biological insights, and future directions [Internet]. Vol. 23, *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*. 2019. p. 261–73. Available from: 10.3171/2018.10.PEDS18377
30. Thomas A, Noël G. Medulloblastoma: Optimizing care with a multidisciplinary approach. *J Multidiscip Healthc* [Internet]. 2019;12:335–47. Available from: 10.2147/jmdh.s167808
31. Millard NE, De Braganca KC. Medulloblastoma. *J Child Neurol* [Internet]. 2016;31(12):1341–53. Available from: 10.1177/0883073815600866
32. Juraschka K, Taylor MD. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: A review: JNSPG 75th Anniversary invited review article. *J Neurosurg Pediatr* [Internet]. 2019;24(4):353–63. Available from: 10.3171/2019.5.PEDS18381
33. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2016;131(6):821–31. Available from: 10.1007/s00401-016-1569-6
34. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2007 Jun;26(2):225–39. Available from: 10.1007/s10555-007-9055-1
35. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet].

2003;3(10):721–32. Available from: 10.1038/nrc1187

36. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2001;13(2):167–71. Available from: 10.1016/S0955-0674(00)00194-0
37. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* [Internet]. 2012 Jul;92(3):967–1003. Available from: 10.1152/physrev.00030.2011
38. Pereira T, Zheng X, Poellinger L. Degradation of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ : Where does it happen? *Cell Cycle* [Internet]. 2006 Dec;5(23):2720–2. Available from: 10.4161/cc.5.23.3536
39. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2014;9:47–71. Available from: 10.1146/annurev-pathol-012513-104720
40. Harris AL. Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2002;2(1):38–47. Available from: 10.1038/nrc704
41. Jun JC, Rathore A, Younas H, Gilkes D, Polotsky VY. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. *Curr Sleep Med Reports* [Internet]. 2017;3(1):1–10. Available from: 10.1007/s40675-017-0062-7
42. Baay-Guzman GJ. El Factor de Transcripción Inducible en Hipoxia (HIF-1) promueve la inflamación alérgica pulmonar [Tesis de Doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
43. Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): A novel transcription factor in immune reactions. *J Interf Cytokine Res*. 2005;25(6):297–310.
44. Dengler VL, Galbraith M, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 2013/10/07. 2014;49(1):1–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24099156>



45. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in tumors: Pathogenesis-related classification, characterization of hypoxia subtypes, and associated biological and clinical implications. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2014;812:19–24. Available from: 10.1007/978-1-4939-0620-8\_3
46. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 1999 Nov;59(22):5830–5.
47. Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R. Tumor hypoxia: The role of HIF. *Actas Urol Esp* [Internet]. 2009;33(9):941–51. Available from: 10.1016/S0210-4806(09)72891-8
48. Fu Z, Chen D, Cheng H, Wang F. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protects cervical carcinoma cells from apoptosis induced by radiation via modulation of vascular endothelial growth factor and p53 under hypoxia. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2015 Jan;21:318–25.
49. Lu ZH, Wright JD, Belt B, Cardiff RD, Arbeit JM. Hypoxia-inducible factor-1 facilitates cervical cancer progression in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Am J Pathol* [Internet]. 2007 Aug;171(2):667–81. Available from: 10.2353/ajpath.2007.061138
50. Lin D, Wu J. Hypoxia inducible factor in hepatocellular carcinoma: A therapeutic target. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Nov;21(42):12171–8. Available from: 10.3748/wjg.v21.i42.12171
51. Wilson GK, Tennant DA, McKeating JA. Hypoxia inducible factors in liver disease and hepatocellular carcinoma: current understanding and future directions. *J Hepatol* [Internet]. 2014 Dec;61(6):1397–406. Available from: 10.1016/j.jhep.2014.08.025
52. Vleugel MM, Greijer AE, Shvarts A, van der Groep P, van Berkel M, Aarbodem Y, et al. Differential prognostic impact of hypoxia induced and diffuse HIF-1 $\alpha$  expression in invasive breast cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2005 Feb;58(2):172–7. Available from: 10.1136/jcp.2004.019885

53. Zhang H, Wong CCL, Wei H, Gilkes DM, Korangath P, Chaturvedi P, et al. HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene*. 2012 Apr;31(14):1757–70.
54. Jin X, Dai L, Ma Y, Wang J, Liu Z. Implications of HIF-1 $\alpha$  in the tumorigenesis and progression of pancreatic cancer. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2020;20(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01370-0>
55. Chan N, Milosevic M, Bristow RG. Tumor hypoxia, DNA repair and prostate cancer progression: new targets and new therapies. *Future Oncol* [Internet]. 2007 Jun;3(3):329–41. Available from: 10.2217/14796694.3.3.329
56. Vergis R, Corbishley CM, Norman AR, Bartlett J, Jhavar S, Borre M, et al. Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2008 Apr;9(4):342–51. Available from: 10.1016/S1470-2045(08)70076-7
57. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, et al. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* [Internet]. 2001 Sep;85(6):881–90. Available from: 10.1054/bjoc.2001.2018
58. Swinson DEB, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J, et al. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2003 Feb;21(3):473–82. Available from: 10.1200/JCO.2003.11.132
59. Chou C-W, Wang C-C, Wu C-P, Lin Y-J, Lee Y-C, Cheng Y-W, et al. Tumor cycling hypoxia induces chemoresistance in glioblastoma multiforme by

- upregulating the expression and function of ABCB1. *Neuro Oncol* [Internet]. 2012 Oct;14(10):1227–38. Available from: 10.1093/neuonc/nos195
60. Liu Q, Cao P. Clinical and prognostic significance of HIF-1 $\alpha$  in glioma patients: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(12):22073–83.
61. Marampon F, Gravina GL, Zani BM, Popov VM, Fratticci A, Cerasani M, et al. Hypoxia sustains glioblastoma radioresistance through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1 $\alpha$  functional interplay. *Int J Oncol* [Internet]. 2014 Jun;44(6):2121–31. Available from: 10.3892/ijo.2014.2358
62. Mayer A, Schneider F, Vaupel P, Sommer C, Schmidberger H. Differential expression of HIF-1 in glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Oncol* [Internet]. 2012 Oct;41(4):1260–70. Available from: 10.3892/ijo.2012.1555
63. Cruzeiro GAV, Dos Reis MB, Silveira VS, Lira RCP, Carlotti CGJ, Neder L, et al. HIF1A is Overexpressed in Medulloblastoma and its Inhibition Reduces Proliferation and Increases EPAS1 and ATG16L1 Methylation. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 2018;18(3):287–94. Available from: 10.2174/1568009617666170315162525
64. Valencia-Cervantes J, Huerta-Yepez S, Aquino-Jarquín G, Rodríguez-Enriquez S, Martínez-Fong D, Arias-Montañón JA, et al. Hypoxia increases chemoresistance in human medulloblastoma DAOY cells via hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -mediated downregulation of the CYP2B6, CYP3A4 and CYP3A5 enzymes and inhibition of cell proliferation. *Oncol Rep* [Internet]. 2019;41(1):178–90. Available from: 10.3892/or.2018.6790
65. Bosco MC, Puppo M, Santangelo C, Anfosso L, Pfeffer U, Fardin P, et al. Hypoxia Modifies the Transcriptome of Primary Human Monocytes: Modulation of Novel Immune-Related Genes and Identification Of CC-Chemokine Ligand 20 as a New Hypoxia-Inducible Gene. *J Immunol* [Internet]. 2006;177(3):1941–55. Available from: 10.4049/jimmunol.177.3.1941

66. Barrera Velázquez CD. Clasificación Molecular de Meduloblastomas Pediátricos por RT-qPCR [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2022.
67. Northcott PA, Shih DJH, Remke M, Cho YJ, Kool M, Hawkins C, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2012;123(4):615–26. Available from: 10.1007/s00401-011-0899-7
68. Anaya Estrada D. Determinación de la expresión de las proteínas B-Catenina, YAP1, GAB1 Y P53 como marcadores moleculares en microarreglos de tejidos de pacientes pediátricos con meduloblastoma [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2021.
69. Baay-Guzman G, Bebenek I, Zeidler M, Hernandez-Pando R, Vega M, Garcia-Zepeda E. HIF-1 expression is associated with CCL2 chemokine expression in airway inflammatory cells: implications in allergic airway inflammation. *Respir Res*. 2012;13:60.
70. Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* [Internet]. 2001 Sep 1;22(9):1363–71. Available from: <https://doi.org/10.1093/carcin/22.9.1363>
71. Assimakopoulou M, Androutsopoulou C, Zolota V, Matsoukas J. Immunoexpression patterns for Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein, in relation to Hsp90, of human brain tumors. *Histol Histopathol*. 2016 May;31(5):535–46.
72. Liu X, Xie P, Hao N, Zhang M, Liu Y, Liu P, et al. HIF-1-regulated expression of calreticulin promotes breast tumorigenesis and progression through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021 Nov;118(44). Available from: 10.1073/pnas.2109144118
73. Jiang N, Zou C, Zhu Y, Luo Y, Chen L, Lei Y, et al. HIF-1 $\alpha$ -regulated miR-1275 maintains stem cell-like phenotypes and promotes the progression of

LUAD by simultaneously activating Wnt/ $\beta$ -catenin and Notch signaling. Theranostics [Internet]. 2020;10(6):2553–70. Available from: 10.7150/thno.41120

74. Fernandez-L A, Northcott PA, Dalton J, Fraga C, Ellison D, Angers S, et al. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. Genes Dev [Internet]. 2009;23(23):2729–41. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/23/23/2729.full.pdf+html%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=355834403>
75. Katagiri T, Kobayashi M, Yoshimura M, Morinibu A, Itasaka S, Hiraoka M, et al. HIF-1 maintains a functional relationship between pancreatic cancer cells and stromal fibroblasts by upregulating expression and secretion of Sonic hedgehog. Oncotarget. 2018 Feb;9(12):10525–35.
76. Chen S, Zhang M, Xing L, Wang Y, Xiao Y, Wu Y. HIF-1 $\alpha$  contributes to proliferation and invasiveness of neuroblastoma cells via SHH signaling. PLoS One. 2015;10(3):e0121115.
77. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. PLoS One. 2008;3(8).
78. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. J Clin Oncol [Internet]. 2011;29(11):1408–14. Available from: 10.1200/JCO.2009.27.4324
79. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. Cancer Cell. 2007;12(2):108–13.
80. Corn PG, Ricci MS, Scata KA, Arsham AM, Simon MC, Dicker DT, et al. Mxi1 is induced by hypoxia in a HIF-1-dependent manner and protects cells

from c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2005;4(11):1285–94. Available from: 10.4161/cbt.4.11.2299

81. Pistollato F, Rampazzo E, Persano L, Abbadi S, Frasson C, Denaro L, et al. Interaction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and Notch signaling regulates medulloblastoma precursor proliferation and fate. *Stem Cells* [Internet]. 2010 Nov;28(11):1918–29. Available from: 10.1002/stem.518
82. Thompson EM, Whitney NL, Wu YJ, Neuwelt EA. The effect of alpha-v integrin inhibition on the malignant characteristics of medulloblastoma: Laboratory investigation. *J Neurosurg Pediatr*. 2013;11(1):60–7.
83. Blazek ER, Foutch JL, Maki G. Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;67(1):1–5.