



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE HIF-1 EN LA REGULACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE CXCL13 Y SU CORRELACIÓN CON EL TIPO DE LINFOMA
NO HODGKIN EN PACIENTES PEDIÁTRICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. KARLA MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ MALDONADO

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA HUERTA YEPEZ
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
FACULTAD DE MEDICINA**

**DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de febrero de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MÉNDEZ MALDONADO KARLA MARÍA DEL CARMEN** con número de cuenta **404103569**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE HIF-1 EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CXCL13 Y SU CORRELACIÓN CON EL TIPO DE LINFOMA NO HODGKIN EN PACIENTES PEDIÁTRICOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA HUERTA YEPEZ**.

Presidente: DRA. MARTHA PÉREZ RODRÍGUEZ
Vocal: DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Suplente: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Suplente: DR. VICENTE MADRID MARINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 07 de marzo de 2013

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM. Por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto de Maestría, por los maestros que contribuyeron de manera importante en la adquisición de nuevo conocimiento.

A CONACYT, por el apoyo económico recibido durante el periodo 2011-2 a 2013-1 de la Maestría con número (CVU/Becario) 384784/254391

A MI COMITE TUTOR

A la Dra. Sara Huerta Yopez, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su valioso apoyo y dirección para la realización de éste trabajo de tesis. Por el tiempo invertido en mi formación, por la paciencia, los regaños, reconocimientos y observaciones que me ayudaron a aprender y a esforzarme cada día más para la conclusión exitosa de este trabajo.

A la Dra. Rosana Pelayo y a la Dra. Leticia Rocha por haber formado parte de mi comité tutor durante este periodo. Por haber contribuido de manera muy importante a mi formación, con sus consejos, observaciones y con la formulación de preguntas en cada tutorial.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar al término de este trabajo de posgrado, por su presencia en cada momento de flaqueza y desesperación. Por guiarme y darme la fortaleza necesaria.

A mis padres, por creer en mí y apoyarme incondicionalmente para llegar hasta esta instancia de mis estudios. Por sus sabios consejos, por sus ánimos cuando más los necesite, por su infinita paciencia y comprensión cuando no pude estar con ellos. Los quiero mucho y este es el resultado del esfuerzo que han hecho durante toda mi formación personal y académica.

A mis hermanos, por apoyarme en todo momento y comprender las ausencias por cuestiones de trabajo en el laboratorio o de estudio.

A Francisco Javier, por haber estado a mi lado durante la realización de este proyecto de maestría, por sus consejos, por el amor, la paciencia y la comprensión que necesite. Por seguir apoyándome a cada momento, sin importar la distancia.

A mi familia por apoyarme día a día con su comprensión, cuando no pude estar con ustedes.

A Erandi y Norma por haberme brindado su amistad, por sus consejos y por su apoyo incondicional. Gracias niñas.

A mis compañeros de laboratorio de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del HIMFG y de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas del IMSS por el apoyo y las observaciones que realizaron durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Guillermo Aquino por su apoyo y sus consejos durante la realización de este trabajo de tesis.

Este trabajo fue financiado con Fondos Federales 2009. El protocolo tiene el número de registro HIM/2009/009

LUGAR DE REALIZACIÓN

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México Federico Gómez de la Secretaría de Salud.

Para las personas creyentes, Dios está al principio.

*Para los científicos
está al final de todas sus reflexiones.*

Max Planck

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis lo dedico a mi **PADRES**, quienes me han guiado, apoyado e impulsado a conseguir los objetivos propuestos a lo largo de mi vida académica y personal.

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
RESUMEN	16
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN.....	18
1.- OBJETIVOS	20
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
2.- ANTECEDENTES	21
2.1 CÁNCER PEDIÁTRICO	21
2.2 LINFOMA PEDIÁTRICO.....	23
2.2.1 LINFOMA DE BURKITT	24
2.2.2 LINFOMA LINFOBLÁSTICO.....	26
2.2.3 LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES	27
2.2.4 LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES.....	28
2.3 FACTOR INDUCIBLE EN HIPOXIA (HIF-1).....	30
2.3.1 IMPLICACIONES DE HIF-1 EN CÁNCER.....	33
2.3.2 IMPLICACIÓN DE HIF-1 α EN LNH	33
2.3.3 HIF-1 α Y QUIMIOCINAS	34

2.4 QUIMIOCINAS	35
2.4.1 LA QUIMIOCINA CXCL13 Y SU EXPRESIÓN EN LINFOMA	38
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS.....	40
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	41
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
5.1 INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA DEGRADACIÓN DE HIF-1 α	42
5.2 MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN DE HIF-1 α	42
5.3 CLONACIÓN DEL PROMOTOR DE LA QUIMIOCINA CXCL13.	43
5.4 EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR DE CXCL13.	46
5.5 MUTACIÓN SITIO DIRIGIDA DEL PROMOTOR DE CXCL13.....	46
5.6 SECUENCIACIÓN	47
5.7 OBTENCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR DE LINFOMA QUE SOBRE-EXPRESE HIF-1 α	48
5.8 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y CXCL13 MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA.....	48
5.9 DETERMINACIÓN INTRACELULAR DE HIF-1 α Y CXCL13 MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.	49
5.10 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y CXCL13 MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA	50
5.11 DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE HIF-1 α CON EL PROMOTOR DE CXCL13 MEDIANTE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (CHIP).....	51
5.12 MICROARREGLO DE BIOPSIAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LINFOMA NO HODGKIN	52

5.13 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y CXCL13 EN EL MICROARREGLO DE BIOPSIAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LNH MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA	53
6.- RESULTADOS.....	55
6.1 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HIF-1 α EN CÉLULAS PC-3 Y EL EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE CXCL13.	55
6.2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CXCL13 POR HIF-1 α	60
6.3 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CXCL13 EN CÉLULAS DE LINFOMA NO HODGKIN POR HIF-1 α	66
6.4 EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y CXCL13 EN LOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE LNH DE PACIENTES PEDIÁTRICOS.	68
DISCUSIÓN.....	71
CONCLUSIONES.....	77
BIBLIOGRAFÍA.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 PRINCIPALES TIPOS DE CÁNCER DIAGNOSTICADOS EN LAS UNIDADES MÉDICAS ACREDITADAS (UMA) DE LA SECRETARÍA DE SALUD.	22
FIGURA 2 LINFOMA DE BURKITT.....	25
FIGURA 3 LINFOMA LINFOBLÁSTICO.....	27
FIGURA 4 LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES.....	28
FIGURA 5 LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES.....	29
FIGURA 6 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL FACTOR INDUCIBLE EN HIPOXIA (HIF-1).....	31
FIGURA 7 MODELO DEL TRÁFICO DE LINFOCITOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN RESPUESTA A QUIMIOCINAS.	37
FIGURA 8 PLÁSMIDO REPORTERO PLGFP-N1 QUE SE EMPLEÓ PARA CLONAR EL PROMOTOR DE CXCL13.....	45
FIGURA 9 LA INDUCCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE HIF-1 α INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE CXCL13 EN CÉLULAS PC-3.	56
FIGURA 10 LA ACUMULACIÓN DE HIF-1 α INDUCE LA EXPRESIÓN DE CXCL13 A TRAVÉS DEL TIEMPO.....	57
FIGURA 11 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIF-1 α	59
FIGURA 12 ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA GFP BAJO EL PROMOTOR DE CXCL13.	61
FIGURA 13 LAS MUTACIONES DE LOS DIFERENTES SITIOS DE HIF-1 α DISMINUYERON LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE CXCL13.	63
FIGURA 14 ESTANDARIZACIÓN DE LA PCR DE LOS SITIOS DE UNIÓN DE HIF-1 α AL PROMOTOR DE CXCL13.	64
FIGURA 15 HIF-1 α PUEDE INTERACCIONAR CON LOS TRES SITIOS DE UNIÓN EN EL PROMOTOR DE CXCL13.	65

FIGURA 16 LA INDUCCIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE HIF-1 α EN CÉLULAS DE LINFOMA INCREMENTÓ LA EXPRESIÓN DE CXCL13.....	67
FIGURA 17 LA EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y CXCL13 ES MAYOR EN LOS LNH MÁS AGRESIVOS. .	69
FIGURA 18 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE HIF-1 α Y CXCL13 EN LOS DIFERENTES TIPOS DE LNH PEDIÁTRICO.....	70
FIGURA 19 MODELO PROPUESTO DE LA PARTICIPACIÓN DE HIF-1 α Y CXCL13 EN EL LNH...	77

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 CARACTERÍSTICAS DE LOS LNH EN PACIENTES PEDIÁTRICOS.....	24
TABLA 2 SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA AMPLIFICAR POR PCR PUNTO FINAL EL PROMOTOR DE CXCL13.....	45
TABLA 3 SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA REALIZAR LA MUTACIÓN EN LOS POSIBLES SITIOS DE UNIÓN DE HIF-1 α EN PCXCL13-GFP	47
TABLA 4 SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA DETECCIÓN DE LA MUTACIÓN DE LOS POSIBLES SITIOS DE UNIÓN DE HIF-1 α EN PCXCL13-GFP	48
TABLA 5 SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS PARA LA DETECCIÓN POR PCR DE LA INTERACCIÓN DE HIF-1 α AL PROMOTOR DE CXCL13 MEDIANTE CHIP	52

ABREVIATURAS

2-Me	2-metoxiestradiol.
ADN	Acido-desoxirribonucleico.
AKT	Proteína cinasa B.
ALK	Cinasa de linfoma anaplásico.
ARNm	mensajero de Ácido ribonucleico.
bHLH	básico Hélice-Loop-Hélice.
BHI	Brain Heart Infusion Broth.
BSA	Albúmina de suero bovino.
CA IX	Anhidrasa carbónica IX.
CMV	Citomegalovirus.
CSF	Carboxifluoresceína.
DAB	Diamino bencidina.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
EDHB	Etil-3,4-hidroxibenzoato.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EMA	Antígeno de membrana epitelial.
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares.
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter.</i>
FITC	Fluoresceína isotiocianato.
GFP	Proteína verde fluorescente.
HIF-1	Factor inducible en hipoxia-1.
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia.
LACG	Linfoma anaplásico de células grandes.
LB	Linfoma de Burkitt.

LCG	Linfoma difuso de células B grandes.
LH	Linfoma de Hodgkin.
LL	Linfoma linfoblástico.
LNH	Linfoma no Hodgkin.
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno.
MAT	Microarreglo de tejidos.
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information.</i>
NF-κB	Factor nuclear que aumenta la cadena ligera kappa de células B activadas.
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin kinase.</i>
ODDD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PAS	<i>PER(period-clock) ARNT-SIM(single-minded).</i>
PBS	Solución salina regulada con fosfato.
pCMV-GFP	Plásmido reportero con el promotor de citomegalovirus.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pCXCL13-GFP	Plásmido reportero con el promotor de CXCL13.
PE	Ficoeritrina.
PI3K	Fosfatidil inositol 3-cinasa.
pLGFP	Plásmido reportero carente de promotor.
PTEN	Proteína homóloga de tensina y fosfatasa.
pVHL	Proteína Von Hippel-Lindau.
RIPA	Solución amortiguadora de radio-inmunoprecipitación.
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium.</i>
SFB	Suero Fetal Bovino.

SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Humana.
SNC	Sistema Nervioso Central.
UMA	Unidades médicas acreditadas.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.

RESUMEN

Los linfomas son neoplasias clonales de células B y T en sus diferentes estadios de diferenciación. En los linfomas, el tejido afectado son los ganglios linfáticos, éstos se forman por la atracción de células B y T mediante quimiocinas, dentro de éstas se encuentra CXCL13.

HIF-1 es un factor de transcripción que participa en la adaptación celular a cambios de oxígeno. HIF-1 regula la expresión de quimiocinas como CXCL12, CCL20, CCL5, además de algunos de sus receptores como CCR7 y CXCR4. En este trabajo mediante un análisis *in silico* del promotor de CXCL13 se encontraron tres posibles sitios de unión de HIF-1 α , esto sugiere que dicha quimiocina podría estar siendo regulada por HIF-1. Mediante modulación farmacológica de la actividad de HIF-1 α , demostramos que la expresión de CXCL13 se afecta de manera directa, es decir un aumento en la actividad de HIF-1 α incrementa la expresión de CXCL13 y una disminución de la actividad de HIF-1 α disminuye la expresión de CXCL13. Por otro lado, utilizando plásmidos reporteros, mutación sitio dirigida en el promotor de CXCL13 y análisis de la interacción ADN-proteína, demostramos que HIF-1 α regula transcripcionalmente la expresión de la quimiocina CXCL13 de manera directa. De especial interés fue el hallazgo, a través de microarreglos de tejidos e inmunohistoquímica, que HIF-1 α y CXCL13 se encuentran considerablemente más expresados en los linfomas pediátricos de mayor agresividad.

Este estudio demuestra por primera vez que HIF-1 α regula transcripcionalmente de forma directa a la quimiocina CXCL13 y que ambas proteínas se encuentran más expresadas en los linfomas pediátricos más agresivos, sugiriendo su participación de manera importante en la fisiopatogénesis de los LNH pediátricos.

ABSTRACT

Lymphomas are clonal neoplasms of mature and immature B cells and T cells in various stages of differentiation. In lymphomas, the tissues affected are the lymph nodes, these are formed by the homing of B and T cells by chemokines within these is CXCL13. HIF-1 is a transcription factor that plays a major role in cellular adaptation to changes in oxygen. HIF-1 regulates the expression of chemokines such as CXCL12, CCL20, CCL5, as well as some of its receptors CCR7 and CXCR4. In this study using an *in silico* analysis of the promoter of CXCL13 were found three potential binding sites for HIF-1 α , suggesting that this chemokine might be being regulated by HIF-1. By pharmacological modulation of the activity of HIF-1 α , showed that CXCL13 expression is affected directly, an increase in the activity of HIF-1 α expression of CXCL13 increases and decreased HIF-1 α activity decreases CXCL13 expression. Furthermore, using reporter plasmids, site-directed mutation in the promoter of CXCL13 and analysis of the DNA-protein interaction, we demonstrated that HIF-1 α transcriptionally regulates directly the expression of the chemokine CXCL13. Furthermore using tissue microarrays and immunohistochemistry, we found that HIF-1 α and CXCL13 were significantly more expressed in the most aggressive pediatric lymphomas.

This study demonstrates for the first time that HIF-1 α directly regulates transcription of the chemokine CXCL13 and both proteins are expressed in more aggressive pediatric lymphomas, suggesting an important participation in the fisiopatogenesis of pediatric NHL.

INTRODUCCION

Los linfomas son neoplasias de células B y T, son tumores clonales que pueden ser de células B y células T en varios estadios de diferenciación [1]. En México, el linfoma no Hodgkin en niños con frecuencia invade la médula ósea y se presentan en sitios extraganglionares [2].

Existen varias clasificaciones del linfoma no Hodgkin, siendo las más utilizadas la REAL (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms) y la de la Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS clasifica a estas neoplasias de acuerdo a su morfología, inmunofenotipo, características genéticas y características clínicas. En niños, hay menor variabilidad entre los LNH que en adultos y la mayoría de los que se presentan en menores de 17 años son los siguientes: linfoma de Burkitt [2, 3], linfoma de células B grandes ; linfoma linfoblástico y linfoma anaplásico de células grandes [4].

Los ganglios linfáticos están conformados por células B y T, que son atraídas mediante quimiocinas, dentro de estas quimiocinas se encuentra CXCL13, la cual se expresa de manera constitutiva y pertenece a la familia de las quimiocinas CXC [5]. Se sabe que CXCL13 es necesaria para el reclutamiento de los linfocitos B dentro de los folículos de las placas de Peyer, ganglios linfáticos y bazo [6]. Esta quimiocina es producida por células dendríticas foliculares y células estromales [7]. Se ha demostrado que promueve la migración de linfocitos B que expresan el receptor CXCR5 hacia folículos linfoides y centros germinales [8], lo cual le confiere un papel muy importante en la formación de órganos linfoides secundarios [9, 10]. Sin embargo, poco se sabe de la regulación transcripcional de las quimiocinas.

Por otro lado, HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) es un factor de transcripción que juega un papel central en la adaptación celular a cambios de oxígeno [11, 12]. Diversos

estudios en humanos y en modelos animales han revelado una relación directa entre la sobre expresión de HIF-1 y la progresión del tumor, por lo tanto, la sobreexpresión de esta molécula es un indicador de pronóstico desfavorable en diversos cánceres humanos [13]. Se ha reportado que HIF-1 regula la expresión de quimiocinas como CXCL12, CCL20, CCL5, además de algunos de sus receptores como CCR7 y CXCR4 [14]. Sin embargo, se desconoce si regula la expresión de CXCL13 y la importancia de éstas moléculas, HIF-1 α y CXCL13, en el LNH.

1.- OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Evaluar la participación de HIF-1 α en la regulación de la expresión de CXCL13 y determinar la correlación de su expresión con los tipos de LNH.

1.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la participación de HIF-1 α en la regulación transcripcional de CXCL13.
2. Evaluar la expresión de HIF-1 α y CXCL13 en biopsias provenientes de los diferentes tipos de LNH de pacientes pediátricos.
3. Determinar la correlación de la expresión de HIF-1 α y de CXCL13 con el tipo de LNH.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Cáncer pediátrico

En el 2008 la OMS en su reporte de cáncer, indicó que para la población infantil en las regiones de Europa, Norte América y otros países desarrollados, las tasas de incidencia están alrededor de 140 por millón de habitantes. A nivel mundial, se estima aproximadamente unos 160,000 nuevos casos y 90,000 muertes en menores de 15 años de edad, anualmente. En 2008 Rivera Luna R, publicó que la incidencia en México es de 122 casos nuevos por año en población menor de 15 años. En el 2005, en México se creó el Registro de cáncer en niños y adolescentes (RCNA), en donde la población inscrita durante el período 2005-2010 fue de 3 569 pacientes menores de 20 años, cuya distribución por sexo muestra un predominio masculino con el 54.9% del total de casos (datos de CENAVE/DGE/RCNA, 2005-2010). Las causas por las que los niños desarrollan cáncer no están claramente definidas, salvo para algunas condiciones como la exposición a altos niveles de radiación. En esta población, los tumores más frecuentes son las leucemias, los linfomas y los tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) [1].

Basado en los tres tipos de cáncer más frecuentes, dos patrones de presentación de la enfermedad se han descrito: 1) Patrón Norte-América-Europa (1º Leucemias, 2º Tumores del Sistema Nervioso Central y 3º Linfomas); 2) patrón América Latina (1º Leucemias, 2º Linfomas y 3º Tumores del Sistema Nervioso Central). En México, entre los años 1996-2000, la incidencia del linfoma por período fue del 13.2 %, siendo el linfoma no Hodgkin el de mayor incidencia, ocupando el 3er lugar dentro de las neoplasias de mayor incidencia en la edad pediátrica, seguida de las leucemias (55.4%) y los tumores de SNC (14.4%) [15].

En el 2011, la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud, publicó el “Perfil epidemiológico de cáncer en niños y adolescentes en México” en donde podemos encontrar a los principales tipos de cáncer diagnosticados en las Unidades Médicas Acreditadas (UMA) de la Secretaría de Salud, para la atención de niños y adolescentes con cáncer entre 2005 y 2010, ubicando a los linfomas como la 2ª neoplasia en pacientes infantiles, sólo después de las leucemias. **Figura 1.**

Casos de cáncer en menores de 20 años, según el tipo histológico. 2005-2010

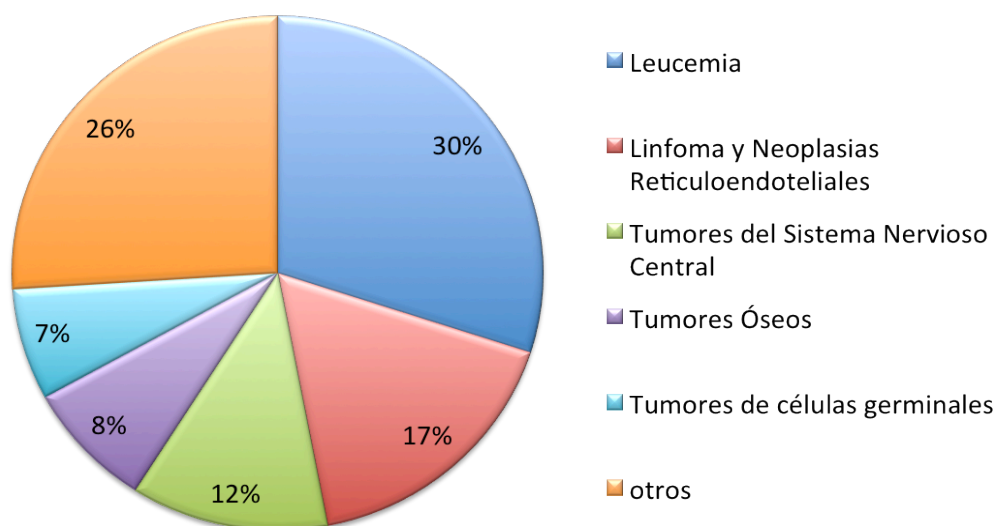


Figura 1 Principales tipos de cáncer diagnosticados en las Unidades Médicas Acreditadas (UMA) de la Secretaría de Salud. Para la atención de niños y adolescentes con cáncer en 2005 a 2010. (CENAVE/DGE/RCNA, 2005-2010).

2.2 Linfoma pediátrico.

Los linfomas son neoplasias debidas a la proliferación de las células linfoides. El primer tipo fue publicado en 1832 por Thomas Hodgkin, quien demostró que las células malignas gigantes (células Reed-Sternberg) son originadas de los linfocitos B [16].

El Instituto Nacional del Cáncer define al linfoma como un tipo de tumor que inicia en las células del sistema inmunitario. Hay dos clasificaciones básicas de linfomas. El linfoma de Hodgkin (LH), que se caracteriza por la presencia de células Reed-Sternberg y el linfoma no Hodgkin (LNH) que carece de este tipo de células. Sin embargo, incluye un grupo grande y diverso de cánceres de las células del sistema inmunitario. Los LNH pueden dividirse a su vez en neoplasias que tienen una evolución o curso indolente (de crecimiento lento) y aquellos que tienen una evolución dinámica (de crecimiento rápido). Estos subtipos se comportan y responden al tratamiento de manera distinta. Tanto los LH como los LNH pueden presentarse en niños y adultos, el pronóstico y tratamiento dependen del estadio y el tipo de linfoma [17, 18].

La OMS adoptó una clasificación más integral, publicada en 1994 por el grupo internacional de estudio de linfomas; esta clasificación incluye una combinación de características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y clínicas. Los 4 subtipos de LNH más frecuentes en niños se muestran en la **Tabla 1** [19].

Tabla 1 Características de los LNH en pacientes pediátricos.

Histología	%	Inmunofenotipo	Presentación clínica
1. Linfoma de células pequeñas no hendidas (Burkitt y aparente Burkitt)	40	Células B 100%	Abdomen, cabeza, cuello, médula ósea, SNC.
2. Linfoma linfoblástico	30	Células T 90 %	Mediastino, ganglio linfático.
		Células B 10 %	SNC, Médula ósea, hueso.
3. Linfoma de células B grandes	20	Células B 100%	Mediastino, abdomen.
4. Linfoma anaplásico de células grandes	10	Células T 70%	Piel, mediastino, hígado, bazo.
		Nulo 20%	Abdomen
		Células B 10%	

2.2.1 Linfoma de Burkitt

El linfoma de Burkitt, denominado previamente indiferenciado tipo Burkitt, no Burkitt o de células pequeñas no hendidas, en la actualidad se considera linfoma de linfocitos B centro folicular. Este linfoma es más común en hombres, con una proporción de 2-3:1. Sus manifestaciones clínicas varían según el sitio anatómico de presentación y su distribución geográfica. Al momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes se encuentran en estadios clínicos avanzados (III y IV), cuando los tumores son más agresivos y mortales. Se reconocen tres variedades: 1) Tipo endémico: se encuentra principalmente en África ecuatorial, Papúa y Nueva Guinea, afecta a niños de cuatro a siete años de edad. Los sitios primarios de aparición más frecuente son los huesos

faciales, incluida la órbita, la región íleo-cecal, los ovarios, riñones y las glándulas mamarias. 2) Tipo esporádico no endémico: tiene amplia distribución geográfica, especialmente en países del hemisferio occidental y en particular, en países en vías de desarrollo. El sitio de aparición primaria más frecuente es el íleon terminal, sobre todo la región íleo-cecal; también puede afectar a los ovarios, riñones y a las glándulas mamarias. 3) Tipo asociado con inmunodeficiencias: aparece, principalmente, en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o con síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Los ganglios linfáticos periféricos, el SNC y la médula ósea son las localizaciones primarias más frecuentes. Las tres variedades clínicas se caracterizan, histológicamente, al momento de su diagnóstico por lo siguiente: arquitectura difusa (aún cuando inicialmente es folicular) con numerosas mitosis, áreas de necrosis y abundantes macrófagos entremezclados que le confieren el característico patrón de “cielo estrellado”. **Figura 2.**

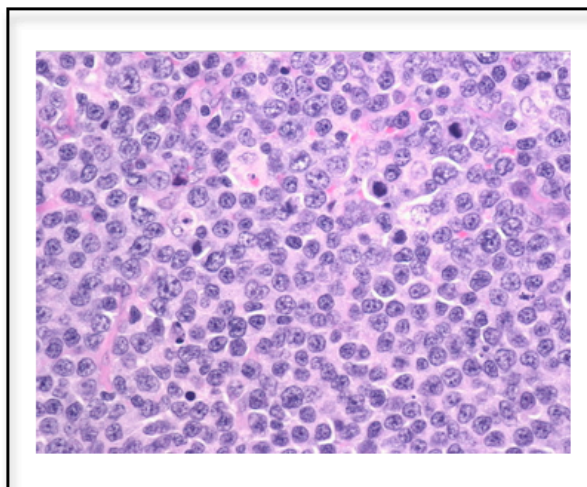


Figura 2 Linfoma de Burkitt. Tinción con Hematoxilina y Eosina. Se observan células tumorales uniformes con múltiples nucléolos pequeños y cromatina dispersada en el núcleo. (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008).

En el tipo relacionado con inmunodeficiencias, las células neoplásicas tienen, con frecuencia, aspecto plasmocitoide, mayor irregularidad nuclear y uno o dos nucléolos prominentes. El inmunofenotipo de estas células tumorales corresponde a linfocitos B, son positivas para IgM, kappa o lambda, CD19, CD20, CD22, CD10, BCL6, Y LPM-1y y Ki-67; negativas para CD5, CD23, TdT y Bcl2. En cuanto a su genotipo, muestran re-arreglo clonal de los genes en las cadenas pesadas y ligeras. En la mayoría de los casos se puede observar la translocación t(8;14) y en menor proporción, las translocaciones t(8;22) y (2;8). El genoma del virus Epstein-Barr coexiste en la mayoría de los casos endémicos, en 25 a 40% de los relacionados con el VIH o SIDA y en menos de 30% con los esporádicos [20-23].

2.2.2 Linfoma linfoblástico.

El linfoma linfoblástico, antes denominado linfosarcoma de la infancia, sarcoma de Sternberg y linfoma de linfocitos T hendidos, es uno de los linfomas no Hodgkin más frecuentes en los niños. La mayoría de las veces se localiza en la parte anterior del mediastino y con menor frecuencia, en los ganglios linfáticos periféricos, la piel, las gónadas, la glándula mamaria, el SNC y el hígado. Las manifestaciones clínicas dependen de la localización y extensión del tumor. El inmunofenotipo de este tipo de linfoma muestra generalmente positividad con los marcadores de linfocitos T, principalmente CD3 y CD7. En la mayoría de los casos con linfoma linfoblástico de linfocitos B hay inmunorreactividad para HLA-DR, CD19, CD79a, CD10 y CD24; la expresión de CD20 y CD22 es variable y la de CD45 negativa. Ambos inmunofenotipos muestran positividad para TdT y CD99 [24-26]. **Figura 3**

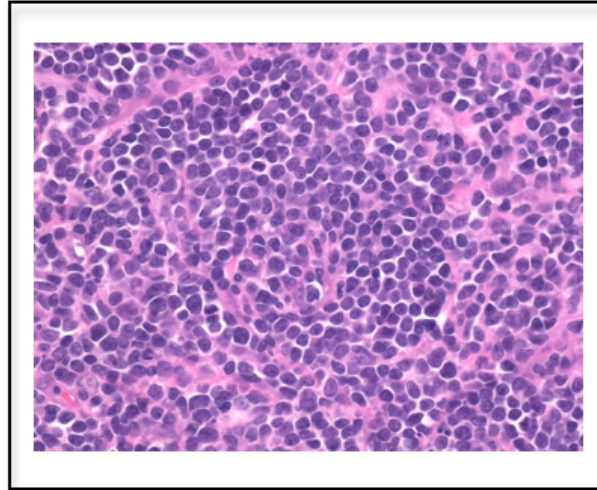


Figura 3 Linfoma linfoblástico. Tinción con Hematoxilina y Eosina. Los linfoblastos tienen una alta relación núcleo: citoplasma, numerosas mitosis, cromatina finamente punteada y nucléolos discretos. (Web pathology.com)

2.2.3 Linfoma difuso de células B grandes

Los linfomas no Hodgkin difusos de células B grandes ocupan el tercer lugar en frecuencia en los pacientes pediátricos, no tienen preferencia por edad o sexo, pueden ser inicialmente ganglionares o extraganglionares y su localización es variada. Los sitios extraganglionares afectados con más frecuencia son el íleon terminal, sobre todo la región íleo-cecal, la piel, los huesos y el sistema nervioso central. Independientemente de su localización, su histología es de células tumorales que pueden tener núcleos hendidos o no hendidos, aspecto plasmocitoide o pleomórfico y ser o no esclerosantes. Con respecto a su inmunofenotipo, la mayoría muestra características de linfocitos B, positivos para kappa o lambda, CD19, CD20, CD22 y CD79a, en algunos casos para Bcl2, CD5, CD30 y Ki-67, ocasionalmente para p53 y CD138 [27, 28]. **Figura 4**

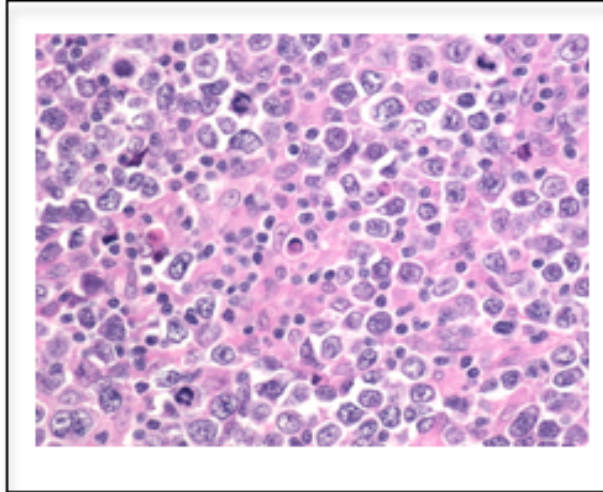


Figura 4 Linfoma difuso de células B grandes. Tinción con hematoxilina y eosina. Las células neoplásicas tienen escaso citoplasma, núcleos irregulares vesiculosos y nucléolos prominentes. (WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008)

2.2.4 Linfoma anaplásico de células grandes

Los linfomas anaplásicos de células grandes (LACG) solían ser denominados comúnmente como histiocitosis maligna. Causan aproximadamente el 10% a 15% de los linfomas pediátricos y se caracterizan por la implicación de ganglios linfáticos abdominales, mediastínicos ó periféricos, con síntomas generales frecuentes (fiebre) y frecuentes afecciones viscerales y cutáneas. El LACG se caracteriza por la proliferación de células grandes pleiomórficas, células con inmunofenotipo de T o nulas que tienden a invadir los senos de los ganglios linfáticos y expresan el antígeno CD30 (KI-1 o BERH 2) y antígenos EMA en células malignas. Se ha descrito la translocación t(2;5)(p23;q35) en más del 80% de los linfomas anaplásicos pediátricos de células grandes [29]. **Figura 5**

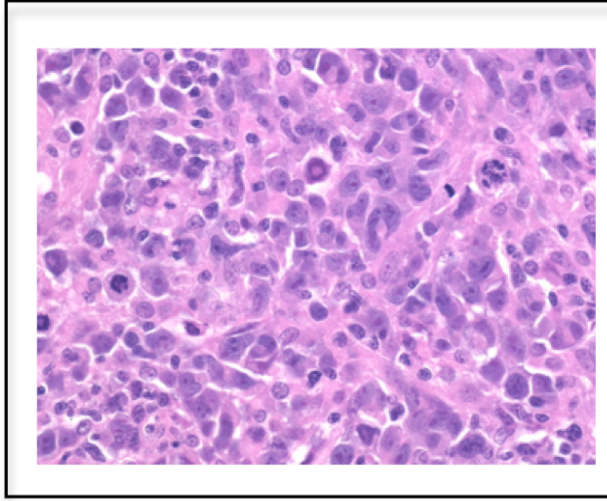


Figura 5 Linfoma anaplásico de células grandes. Tinción con hematoxilina y eosina. Se caracteriza por la presencia de células bizarras y altamente anaplásicas, pueden estar dispuestas en láminas cohesivas simulando carcinoma. Las células más grandes atípicas pueden parecerse a las Reed-Sternberg. Las células tumorales muestran citoplasma abundante, múltiples nucléolos y mitosis atípicas frecuentes.

Se ha demostrado la participación de diversas moléculas involucradas en linfomagénesis, incluyendo factores de transcripción que regulan funciones vitales para la célula. Los factores de transcripción Pax-5, Oct-1, Oct-2, BOB.1 y PU.1, por mencionar algunos ejemplos, están expresados en la mayoría de los linfomas de células B y en linfomas de Hodgkin [30]. Además, el factor inducible en hipoxia (HIF-1), otro factor importante en la regulación de genes involucrados en el metabolismo energético, angiogénesis y apoptosis [31] que posiblemente esté implicado en la linfomagénesis.

2.3 Factor inducible en hipoxia (HIF-1)

Los organismos aeróbicos requieren de O₂ para producir energía y su privación provoca un estrés significativo en las células. Durante condiciones de poco O₂ denominado hipoxia, las células activan respuestas adaptativas para suplir el O₂ en demanda, mediante procesos metabólicos, bio-energéticos y redox. Esta adaptación es mediada por la activación de la respuesta a proteínas de desplegamiento “unfolded”, señalización de mTOR y regulación de genes por factores inducibles en hipoxia (HIF) [32].

HIF-1 es un factor de transcripción, compuesto por un heterodímero, HIF-1 α (826 aa) y HIF-1 β (789 aa). HIF-1 α es regulado de una manera dependiente de oxígeno y la subunidad HIF-1 β está expresada constitutivamente. Estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas bHLH-PAS, bHLH (básico hélice-loop-hélice) y el dominio PAS [PER(Period clock)-ARNT-SIM(single-minded)], los cuales son esenciales para la formación del heterodímero y su unión específica al ADN en los elementos de respuesta a hipoxia (HRE). La subunidad HIF-1 α , en la región C-terminal contiene dos dominios de trans-activación (estimulación de la transcripción), N-terminal (N-TAD) y C-terminal (C-TAD) y una señal de localización nuclear. En la parte central de HIF-1 α se encuentra el dominio Pro-Ser-Thr de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) del aa 401 a 603, los cuales son los responsables de la estabilidad de HIF-1 α . Este factor de transcripción regula un gran número de genes requeridos para la respuesta a hipoxia a través de la unión específica a las regiones promotoras, denominadas elementos de respuesta a hipoxia (HRE) [33-36]. Además HIF-1 regula la expresión de genes que participan en procesos biológicos involucrados en el cáncer, como angiogénesis, metabolismo de glucosa, supervivencia celular, invasión y progresión del

hidroxilasas dentro de los ODDD, la hidroxilación se lleva a cabo en los residuos de Pro-402 y Pro-564, los cuales promueven la unión de la proteína von Hippel-Lindau (pVHL), un componente del complejo de ubiquitin ligasa E3, que es blanco para la subsecuente degradación por el proteasoma [37]. **Figura 6**

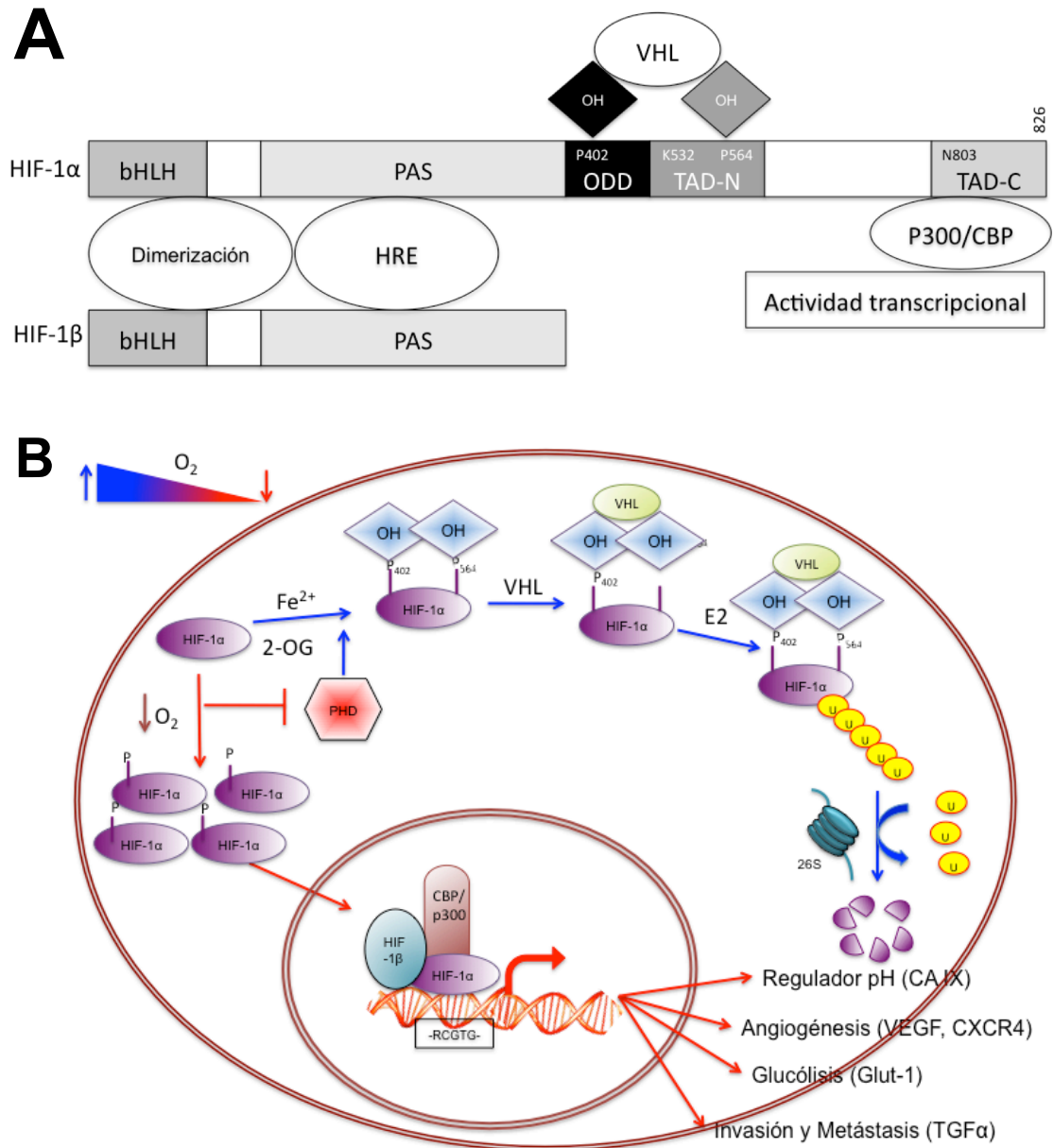


Figura 6 Estructura y función del factor inducible en hipoxia (HIF-1).

A) Estructura molecular de HIF-1 α y HIF-1 β (modificado de Shi YH [38]) B) Bajo condiciones de hipoxia, la reacción de hidroxilación de las prolinas es inhibida y la interacción pVHL-HIF-1 α es eliminada, teniendo como resultado la acumulación en el núcleo y la dimerización con HIF-1 β . [38-40].

Múltiples vías de señalización contribuyen a la regulación de la transcripción del gen inducible en hipoxia. Algunas de estas vías incluyen la de Ras/cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la cascada de p38- proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) [41, 42], la vía de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la vía de señalización de mTOR [43]. Además de la hipoxia, otras vías oncogénicas incluyendo las vías de señalización de factores de crecimiento o pérdida genética de genes supresores de tumores, como VHL y PTEN, regulan positivamente la actividad de HIF [44, 45]. La vía de ERK1/2, dos proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK), han sido implicadas en la activación de HIF-1 [46]. También se ha demostrado que la vía de señalización de ERK1/2 está involucrada en la fosforilación de HIF-1 α en un proceso que no requiere oxígeno. La fosforilación de HIF-1 α por esta vía de señalización es directamente dependiente de la disponibilidad de la proteína y por lo tanto indirectamente regulada por la hipoxia. La regulación de HIF-1 α también ocurre a nivel de ARNm, e involucra la vía de transducción de señales de PI(3)K/AKT [47]. Además de la adaptación a la hipoxia, diversos estudios han sugerido que HIF-1 α podría ser fundamental en la embriogénesis promoviendo la vascularización. Prueba de esto es que los ratones homocigotos para la deficiencia de HIF-1 α mueren a la mitad de la gestación (10.5 días), debido a los defectos cardiacos, vasculares y formación del tubo neural [48, 49]. La deficiencia heterocigota de HIF-1 α no es letal en la etapa embrionaria, pero afecta la respuesta a la hipoxia crónica, indicando que no hay redundancia en la función de HIF-1 α [50].

2.3.1 Implicaciones de HIF-1 en cáncer

HIF-1 juega un papel muy importante en la biología del cáncer, participando en procesos como: angiogénesis, mantenimiento de las células troncales, reprogramación metabólica, señalización autócrina de factores de crecimiento, transición epitelio-mesénquima, invasión, metástasis y resistencia a la terapia de radiación y quimioterapia. En diversos estudios se ha demostrado que la actividad de HIF-1 incrementa, por la hipoxia intra-tumoral, por la pérdida de función de los genes supresores de tumores (VHL) y por la ganancia de función de los oncogenes y genes virales transformantes (p53). Esta actividad sugiere que el incremento de la actividad de HIF-1 representa una vía final común en la patogénesis del cáncer y que es la selección clonal la que favorece a las células cancerosas, en donde la actividad de HIF-1 está incrementada [51]. Los niveles de HIF-1 α correlacionan con el crecimiento del tumor, vascularización y metástasis tanto en modelos animales como en estudios clínicos [52, 53].

2.3.2 Implicación de HIF-1 α en LNH

La presencia de áreas hipóxicas es una característica común de los tumores malignos, incluyendo los linfomas [54]. En el 2002 se realizó un estudio con biopsias de pacientes adultos con diferentes tipos de linfoma no Hodgkin, en donde evaluaron la expresión por inmunohistoquímica de HIF-1 α así como de genes blanco de HIF-1 tales como CA IX y VEGF. Encontrando que éste factor de transcripción estaba expresado en 60 de los 85 casos de linfoma estudiados, preferentemente localizado en los centros germinales [55]. También se ha evaluado la participación de HIF-1 α en linfomas difusos de células B grandes de pacientes adultos, en donde se observó que su expresión está

involucrada en la regulación de genes de matriz extracelular como BGN, COL1A2, COL5A1 y PLOD2 [56]. En el 2011, Wang y cols. demostraron que HIF-1 α tiene un papel importante en el mantenimiento de la población troncal de células de cáncer en el ratón con linfoma, pues la inhibición de HIF-1 α erradicó eficientemente el linfoma en este modelo experimental [57]. Por otro lado, en ese mismo año, Marzec y cols, reportaron que la proteína de fusión nucleofosmina-quinasa de linfoma anaplásico (NPM/ALK), en donde ALK se presenta en los linfomas anaplásicos de células grandes, puede inducir la expresión de HIF-1 α mediada por la sobre-regulación de su transcripción y la señalización a través de STAT3, el cual se une al promotor de HIF-1 α . [58].

2.3.3 HIF-1 α y Quimiocinas

En el 2007 Piován y cols. demostraron que condiciones de hipoxia median la regulación positiva de una manera selectiva del receptor de la quimiocina CXCR4, a través de la estabilización de HIF-1 α en células B normales y células B neoplásicas, de diferentes tipos de linfoma no Hodgkin. También demostraron que la hipoxia puede regular a HIF-1 α a nivel post-traducciona por un proceso de redistribución del receptor CXCR4 a través de su ligando, la quimiocina CXCL12 [59]. En el 2007, Maxwell y cols. demostraron que HIF-1 y NF- κ B regulan positivamente la expresión de CXCR1 y CXCR2 promoviendo la supervivencia de las células de cáncer de próstata en condiciones de hipoxia [60]. Mojsilovic-Petrovic y cols. demostraron en un modelo de neuroinflamación, en donde esta patología se caracteriza por la hipoxia y la isquemia, que la simulación de condiciones de hipoxia inducen la sobre-expresión de HIF-1 α así como también de las quimiocinas inflamatorias CCL2 (MCP-1) y CCL12 (MCP-5),

involucrada en la inducción transcripcional de estas dos quimiocinas en astrocitos en condiciones de hipoxia [61]. Por otro lado, también se ha visto la participación de HIF-1 α en respuesta a la acidosis, en donde Melchionna R. y cols. identificaron al receptor de quimiocina, CXCR4 como un receptor importante en la respuesta a un pH ácido, mostrando por primera vez, que los elementos de respuesta a hipoxia no solo son efectores en condiciones bajas de O₂, sino que también son elementos de respuesta a acidosis. En otro estudio se publicó que macrófagos en condiciones de hipoxia sobreexpresaron diferentes moléculas, entre ellas quimiocinas y receptores de quimiocinas como: CXCL12, CCL10, CXCL1, CCR7, CCL3 y CXCR4 [14].

2.4 Quimiocinas

Las quimiocinas son una familia de proteínas pequeñas que son definidas por sus cuatro residuos de cisteínas conservados. Estas proteínas activan receptores acoplados a proteínas G e inducen la migración celular a través de un gradiente de concentración [62]. Hasta el momento alrededor de 50 quimiocinas han sido identificadas en humanos, las cuales se unen a 18 receptores de quimiocina diferentes. Inicialmente, estas proteínas fueron identificadas como moduladoras de la respuesta inmune. Posteriormente se encontró que regulan la migración celular durante el desarrollo embrionario [63]. Las quimiocinas pueden ser clasificadas de acuerdo a la manera en que son expresadas, en constitutivas e inducibles. Las quimiocinas constitutivas están involucradas en la homeostasis del sistema linfóide y están involucradas en la formación de la estructura de órganos linfoides secundarios. Las quimiocinas inducibles son expresadas en respuesta a procesos de inflamación, reclutando linfocitos en el sitio de daño [64].

La secreción de quimiocinas inducibles de manera no controlada, puede llevar a infiltrados linfocitarios inapropiados en el tejido en donde se expresan sus receptores. Mientras que las quimiocinas secretadas constitutivamente, pero de manera no controlada dentro de los órganos linfoides secundarios podrían ser la causa de la invasión del órgano por células neoplásicas [65].

El reclutamiento y posicionamiento de los linfocitos y células dendríticas en el ganglio linfático está dirigido por la expresión compartimentalizada de las quimiocinas linfoides. La familia de quimiocinas linfoides incluye CCL19, CCL21 y CXCL13 y dos receptores CCR7 y CXCR5. Las quimiocinas CCL19 y CCL21 son expresadas constitutivamente por las células estromales de la zona de T y responden al receptor CCR7, las cuales promueven el reclutamiento de células T *naïve* y de memoria, así como células dendríticas en la zona de T. CXCL13 está expresada constitutivamente en células estromales foliculares y es requerida para el reclutamiento de células B CXCR5⁺ y un pequeño subconjunto de células T del compartimento folicular [66]. Diversas quimiocinas han sido implicadas en procesos de linfomagénesis, considerando su papel en la organización de los tejidos linfoides, ejemplo de ellas son: CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13 [5]. **Figura 7**

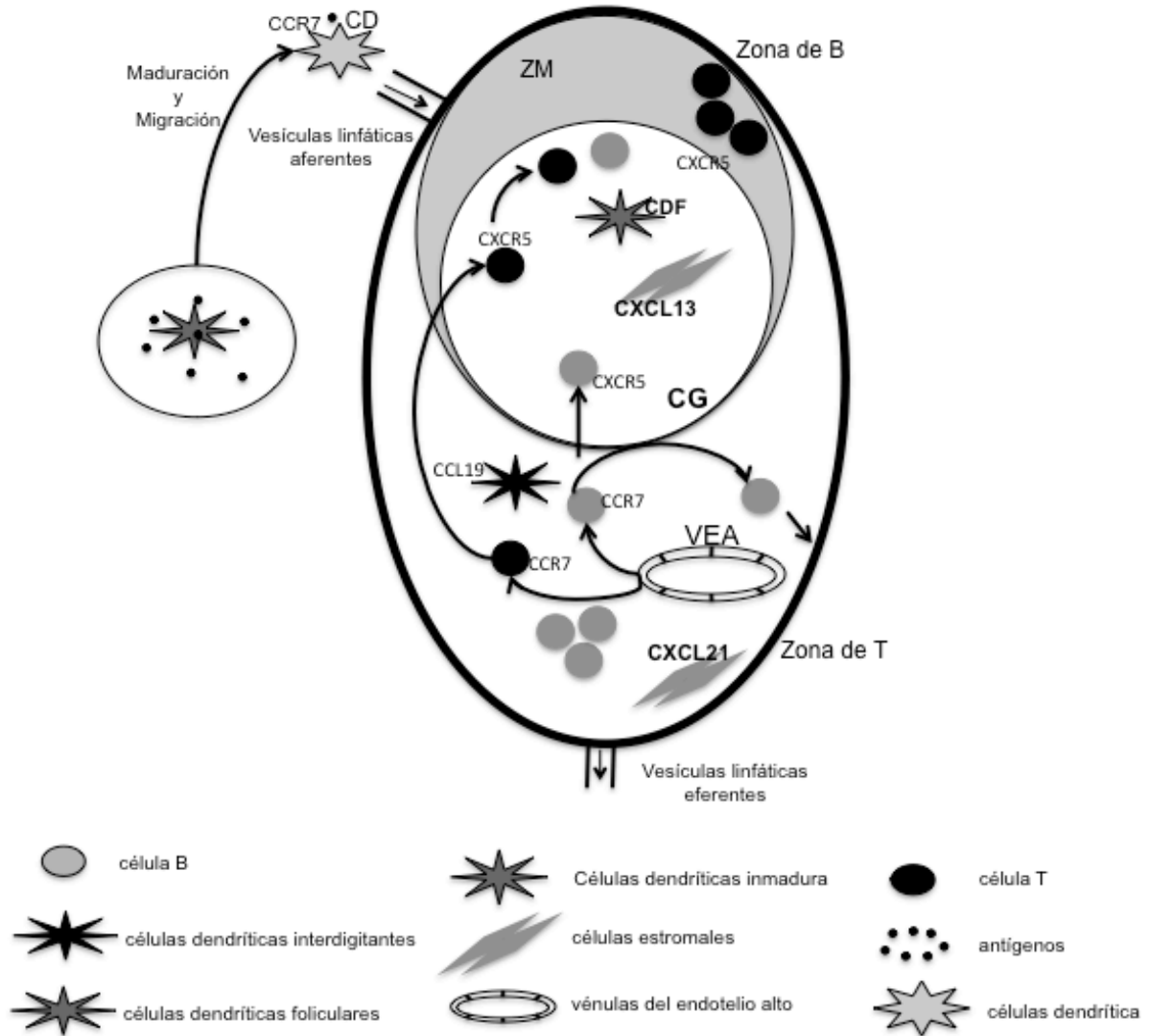


Figura 7 Modelo del tráfico de linfocitos y células dendríticas en respuesta a quimiocinas.

Migración a través de los ganglios linfáticos secundarios durante la respuesta inmune. CD (células dendríticas), ZN (zona del manto), CG (centro germinal), VEA (vénulas del endotelio alto). Modificado de Muller, 2002 [65].

La participación de las quimiocinas en el mantenimiento de las diferentes zonas del ganglio linfático o de otro tejido linfoide secundario es muy importante ya que mantienen a los linfocitos B o T normales dentro del tejido. La quimiocina CXCL13 está fuertemente expresada en los folículos de las placas de Peyer, bazo y ganglios

foliculares adyacentes [7]. Estudios en modelos murinos han demostrado que la unión de CXCL13 con su receptor CXCR5 es requerida para la organización de las células B en los folículos linfoides y para el desarrollo de ganglios linfáticos y placas de Peyer [7, 9]. Esta evidencia demuestra que la participación de esta quimiocina es de gran importancia para la formación de la zona de B del tejido linfoide secundario.

2.4.1 La quimiocina CXCL13 y su expresión en linfoma

CXCL13 es una quimiocina de 88 aa que pertenece a la familia de las quimiocinas CXC [67] y es necesaria para el reclutamiento de los linfocitos B dentro de los folículos de las placas de Peyer, ganglios linfáticos y bazo [6]. Esta quimiocina es producida por células dendríticas foliculares y células estromales foliculares adyacentes [7]. Se ha demostrado que promueve la migración de linfocitos B que expresan el receptor CXCR5 hacia folículos linfoides y centros germinales [8, 68] lo cual le confiere un papel muy importante en la formación de órganos linfoides secundarios [9].

La expresión de CXCL13 en células B malignas sólo se ha reportado en linfomas gástricos extra-nodales de zonal marginal, en donde se demostró que las células B neoplásicas son la fuente principal de CXCL13 [69]. Por otro lado, en el linfoma folicular de adultos, se ha estudiado la participación de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 [70]. En el 2002, Husson y cols. demostraron mediante ensayos de migración, que las células del linfoma folicular presentaron una migración significativa en respuesta a CXCL13 y muy poca migración en respuesta a CXCL12. Lo cual sugiere que la producción de CXCL13 por las células del linfoma folicular presentan una interacción específica con su receptor CXCR5, permitiendo así la acumulación de células B neoplásicas dentro de los tejidos linfoides y promoviendo así la enfermedad

Si bien se ha documentado la participación de CXCL13 en tumorigénesis, los mecanismos que regulan la sobre-expresión de ésta y otras quimiocinas implicadas en los diferentes tipos de neoplasias no han sido totalmente elucidados. Al respecto, se ha descrito que algunos factores de transcripción tales como HIF-1 α y NF- κ B que se encuentran sobre-expresados en algunos tumores están involucrados en la regulación de quimiocinas tumorigénicas [61, 72].

Como ya se mencionó, poco se sabe sobre la regulación de la quimiocina CXCL13, en el 2009 se publicó que el promotor de CXCL13 tiene sitios de unión que son blanco para la vía alterna de NF- κ B, siendo ésta vía la responsable de desarrollar y mantener la estructura de los órganos linfoides, así como una óptima respuesta inmune [72]. Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo, mostraron que la inhibición de la degradación de HIF-1 α indujo la expresión de la quimiocina CXCL13, lo que nos llevó a realizar un análisis bio-informático en las bases de datos TESS y Genomatix, encontrando que el promotor de CXCL13 tiene tres posibles sitios de unión para HIF-1 α . Por lo anterior, es razonable pensar que el factor de transcripción HIF-1 esta regulando la expresión de la quimiocina CXCL13, y que esta regulación participa de manera importante en la fisiopatogénesis del LNH.

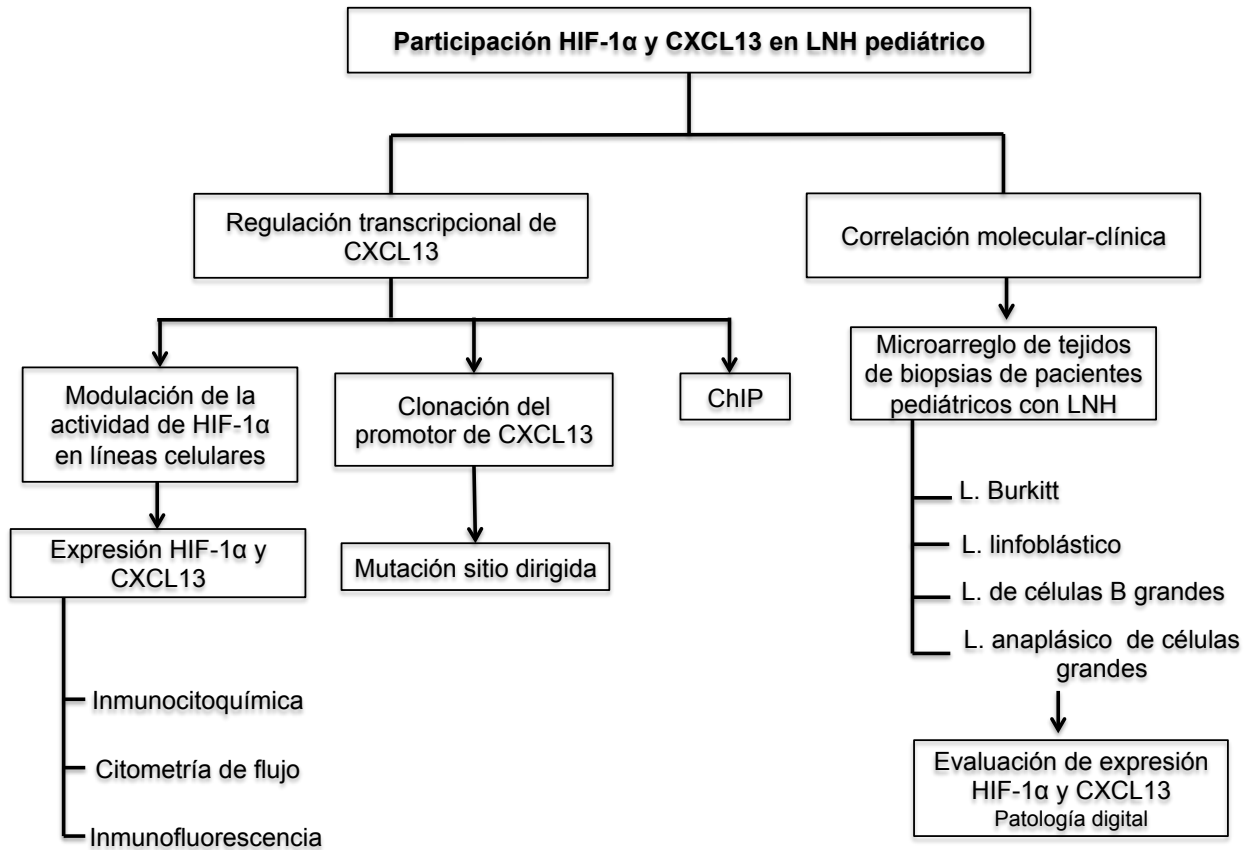
3. JUSTIFICACIÓN

- ◆ Se ha documentado la participación de la quimiocina CXCL13 y del factor de transcripción HIF-1 α en la fisiopatogénesis de diversos tipos de cáncer.
- ◆ Hay evidencia de que HIF-1 α regula la expresión de algunas quimiocinas y algunos de sus receptores.
- ◆ No se tiene conocimiento suficiente de la participación de estas dos moléculas en LNH.
- ◆ No se sabe si HIF-1 α está regulando la expresión de CXCL13 y si la expresión pudiera impactar en la progresión de los LNH en niños.

4. HIPÓTESIS

El factor de transcripción HIF-1 regula de manera transcripcional la expresión de la quimiocina CXCL13 y el incremento de ambas proteínas se asocian directamente con el tipo más agresivo de LNH.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Inhibición farmacológica de la degradación de HIF-1 α .

2×10^5 células de cáncer de próstata (PC-3) fueron tratadas con diferentes concentraciones (25, 50 y 100 μM), del inhibidor de la degradación de HIF-1 α , etil-3,4-hidroxibenzoato (EDHB) o con el diluyente del fármaco (DMSO). Las células se mantuvieron en cultivo durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ y fueron cosechadas empleando Tripsina-EDTA. Se prepararon laminillas con 2×10^4 células de cada concentración para evaluar la expresión de HIF-1 α y CXCL13 mediante inmunocitoquímica.

Por otro lado, 2×10^5 células PC-3 fueron tratadas con 25 μM de EDHB y se mantuvieron en cultivo durante 1.5, 3, 6, 12, 18 y 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron cosechadas y se realizó la tinción para HIF-1 α y CXCL13 con anticuerpos específicos acoplados a un fluorocromo, 9 μL de HIF-1 α -CSF y 9 μL de CXCL13-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN), para cada uno de los tiempos. La expresión de cada proteína se evaluó mediante citometría de flujo, normalizando con respecto al diluyente del fármaco (DMSO).

5.2 Modulación farmacológica de la expresión de HIF-1 α

4×10^4 células PC-3 fueron colocadas en una laminilla labtek de 8 pozos para cultivo celular (Thermoscientific) en 800 μL de medio RPMI advaced (GIBCO) con 3% de SFB. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Las células PC-3 fueron tratadas con 25 μM del inhibidor de la degradación de HIF-1 α , EDHB (Sigma, St. Louis, MO), con 1 μM del inhibidor de la actividad de HIF-1 α , 2-metoxiestradiol (Sigma, St.

Louis, MO) o con el diluyente del fármaco (DMSO). Las células se mantuvieron en cultivo durante 24 h con medio RPMI advanced suplementado con 3% de SFB a 37 °C y 5% de CO₂. Se retiró el medio y las células se lavaron cuidadosamente con PBS, posteriormente fueron fijadas con acetona fría durante 10 minutos. La laminilla se colocó en un vaso couplin con PBS para realizar dos lavados durante 5 minutos en agitación, para posteriormente realizar la tinción. Las laminillas se almacenaron por un periodo máximo de 5 días en PBS a 4 °C antes de realizar la tinción para inmunofluorescencia.

5.3 Clonación del promotor de la quimiocina CXCL13.

A partir de un análisis bio-informático en las bases de TESS y Genomatix, se identificó la región promotora de la quimiocina CXCL13. Se tomaron 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y se verificó que la secuencia del promotor de CXCL13 fuera la correcta, utilizando la base de datos del NCBI. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del promotor (997 pb). Se realizó la amplificación del promotor de CXCL13 con oligonucleótidos específicos y se clonó el promotor en el sitio múltiple de clonación de un plásmido reportero. El plásmido reportero que se empleó fue pEGFP-N1, el cual tiene un promotor eucarionte de cytomegalovirus (CMV) y el promotor procarionte SV40, también contiene un casete de resistencia a kanamicina/neomicina, un casete de selección con puromicina y el origen de replicación pUC, así como un sitio de multi-clonación que contiene diferentes sitios de restricción. Entre los sitios de restricción se encuentran los sitios para las enzimas de restricción *Pst*I y *Bam*HI. Previamente en nuestro grupo de trabajo, se realizó la delección del promotor de CMV del plásmido pEGFP-N1, obteniendo un plásmido carente de promotor que se le denominó pLGFP (4141 pb). En el plásmido pLGFP se

favorecer la clonación del promotor de CXCL13 en el plásmido pLGFP, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el promotor de CXCL13 con secuencias para sitios de restricción, en donde las enzimas *Pst* I y *Bam*HI llevaron a cabo el corte enzimático y generaron un fragmento con extremos cohesivos para la clonación del promotor de CXCL13. **Figura 8**

Para amplificar el promotor se utilizaron 100 ng de ADN de células mononucleares de sangre periférica de humano. El ADN fue obtenido con el kit QIamp DNA mini kit (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 95°C, 3 min/ 35 ciclos (95°C 30 s; 62.3° 30 s; 72°C 1 min)/ 72° C 2 min. El producto de amplificación del promotor de CXCL13 que se esperaba era de 997 pb. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la **Tabla 2**.

Bacterias DH5 α fueron utilizadas para expresar el plásmido con el promotor de CXCL13. Las bacterias transformadas fueron inoculadas en agar BHI con el antibiótico de selección, Kanamicina 30 μ g/ μ L y se incubaron a 37°C. 18 horas después de la incubación, las colonias resistentes al antibiótico fueron seleccionadas para proliferar en medio BHI con kanamicina para extraer el ADN plasmídico y corroborar por patrón de digestión enzimática con *Pst* I y *Bam*H I que la inserción del promotor de CXCL13 se haya llevado a cabo.

Se obtuvo el ADN plasmídico mediante mini-prep, a la construcción se le denominó pCXCL13-GFP. El ADN plasmídico purificado se utilizó para transfectar células PC-3 utilizando lipofectamina® 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Los controles de la transfección y de la expresión que se emplearon fueron el plásmido sin promotor (pLGFP, control negativo) y el plásmido con el promotor de citomegalovirus (pCMV-EGFP, control positivo).

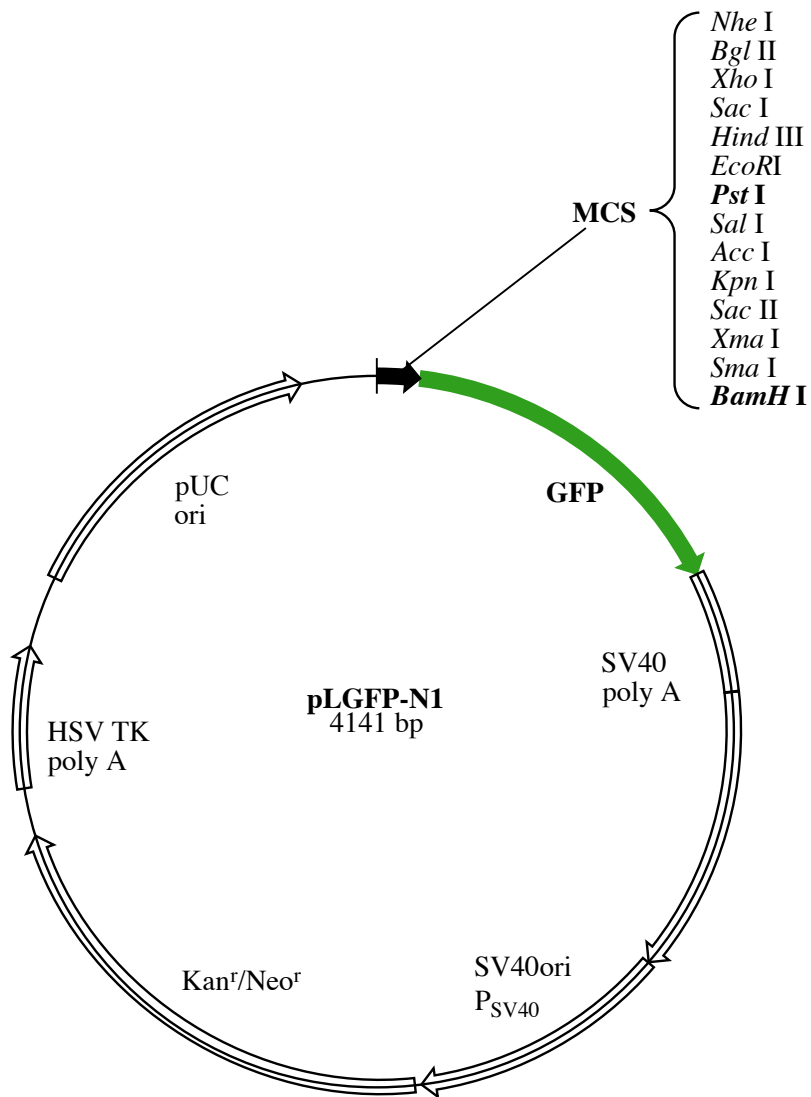


Figura 8 Plásmido reportero pLGFP-N1 que se empleó para clonar el promotor de CXCL13

Tabla 2 Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar por PCR punto final el promotor de CXCL13

Oligonucleótido		Sitio de restricción	T _m (°C)
Sentido	5'-CGA TCT GCA GGG CAG TTT AGT GGT ACT CTA G-3'	<i>Pst</i> 1	64.6
Antisentido	5'- AC GGA TCC AAC TTC ATT CTG TCT GGA GGT A -3'	<i>Bam</i> H1	64.1

5.4 Evaluación de la funcionalidad del promotor de CXCL13.

2x10⁵ células PC-3 fueron transfectadas con 0.8 µg de ADN plasmídico, utilizando lipofectamina 2000. Las células se mantuvieron en cultivo durante 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente las células fueron cosechadas utilizando tripsina-EDTA 0.025% (GIBCO) y se lavaron con PBS. Se fijaron con 4% de *p*-formaldehído y se evaluó la expresión de la proteína GFP mediante citometría de flujo (FACS Calibur, Hospital de Especialidades del CMN SXXI).

5.5 Mutación sitio dirigida del promotor de CXCL13.

Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos específicos para cada mutación. De acuerdo a las especificaciones del kit *Quick Change II XL Site Directed*, las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 3**.

A partir de 100 ng de ADN plasmídico de pCXCL13-GFP se llevó a cabo la mutación sitio dirigida. La PCR para cada mutación se realizó con los reactivos y bajo las instrucciones del fabricante del Kit Platinum® *Pfx* DNA Polymerase. El programa de la PCR que se utilizó para realizar las mutaciones fue el siguiente: 95°C 1 min; 18 ciclos de 95 °C 50 s; 60 °C 50 s; 68 °C 1 min y; 68 °C 7 min.

Tabla 3 Secuencia de oligonucleótidos para realizar la mutación en los posibles sitios de unión de HIF-1 α en pCXCL13-GFP.

NOMBRE	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	SILVESTRE MUTANTE
M1 CXCL13 (-678 pb)	Sentido 5'- CTC CCT TCA TGC AGA <u>AAA AGG</u> CAC ACA AAG CAG GG -3'	CACAG
	Anti-sentido 5'-CCC TGC TTT GTG TGC CTT TTT CTG CAT GAA GGG AG -3	AAAAG
M2 CXCL13 (-447 pb)	Sentido 5' TCC ACA TGC TAG <u>GGT TTT TAT</u> GCG CTC GAC GG - 3'	ACGTG
	Anti-sentido 5`- CCG TCG AGC GCA TAA AAA CCC TAG CAT GTG GA -3'	TTTTT
M3 CXCL13 (-47 pb)	Sentido 5'- TGG TAC TGC AAA <u>CCT TTT GCC</u> TGG ACT CAG AGC - 3'	CACAG
	Anti-sentido 5'- GCT CTG AGT CCA GGC AAA AGG TTT GCA GTA CCA- 3	TTTTG

5.6 Secuenciación

Para secuenciar cada uno de los fragmentos obtenidos en las mutaciones, primero se realizó la PCR con el kit Big Dye Terminator v3.1 utilizando oligonucleótidos específicos de acuerdo a la región en donde se llevó a cabo la mutación. Para la PCR de cada uno de los sitios se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la **Tabla 4**. Brevemente, a partir de 400 ng de ADN plasmídico obtenido de cada mutante, se realizó la PCR con Big Dye 3.1. El programa para la PCR fue el siguiente: 96°C 1 min; 25 ciclos de 96 °C 10 s; 50 °C 5 s; 60 °C 4min y 4 °C. Para la reacción de

secuenciación se utilizó un secuenciador ABI Prism 310 (Departamento de Genética CINVESTAV, IPN).

Tabla 4 Secuencia de oligonucleótidos para la detección de la mutación de los posibles sitios de unión de HIF-1 α en pCXCL13-GFP

Sitio mutado	Secuencia de oligonucleótidos	Tm (°C)
- 687 pb	5' G TTT ATG TCA GAC TGT AAT ATG G 3'	48.1
- 447 pb	5' AGA GAT GGA AAA GAC TGG TAG G 3'	53.5
- 47 pb	5' CAA ATT TAT AAA GTT TGC AAG AGA AG 3'	50.1

5.7 Obtención de una línea celular de linfoma que sobre-exprese HIF-1 α

Células de linfoma de Burkitt (células Ramos) fueron tratadas con 25 μ M de EDHB y cultivadas en medio RPMI advanced suplementado con 3% de SFB a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 meses, hasta obtener una clona que sobre-expresara HIF-1 α y se le denominó RsRs. Las células RsRs se mantuvieron en cultivo con 25 μ M de EDHB.

5.8 Determinación de la expresión de HIF-1 α y CXCL13 mediante inmunocitoquímica

Se empleó la técnica de inmunocitoquímica para evaluar la expresión de HIF-1 α y CXCL13 utilizando anticuerpos específicos. El anticuerpo monoclonal de ratón anti-HIF-1 α humano (R&D Systems, Minneapolis, MN) 0.2 mg/mL se utilizó una dilución 1:100 y su respectivo control de isotipo IgG normal de ratón (Santa Cruz, California, USA), el anticuerpo policlonal de conejo anti-CXCL13/BLC/BCA-1 humano (R&D Systems,

Minneapolis, MN) 0.2 mg/mL se utilizó una dilución 1:100 y su respectivo control de isotipo IgG normal de cabra (Santa cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Brevemente, las laminillas se colocaron en una solución reguladora de citrato de sodio 0.01M y se incubaron en baño maría durante 20 minutos para recuperar la estructura antigénica, se bloquearon los receptores Fc con suero normal de cerdo durante 2 h y se agregaron los anticuerpos de interés. Las preparaciones se incubaron toda la noche a 4 °C en cámara húmeda con el anticuerpo primario. Se utilizaron controles de isotipo según correspondió, normal de ratón o normal de cabra, como anticuerpo secundario se utilizó el link universal biotinilado (Dako) y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (Dako). El color fue generado mediante la adición del sustrato diamino bencidina (DAB) durante 1 a 2 minutos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina. Finalmente las células fueron deshidratadas bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol al 70%, etanol al 90%, etanol al 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

5.9 Determinación intracelular de HIF-1 α y CXCL13 mediante citometría de flujo.

Se evaluó la expresión intracelular de HIF-1 α y CXCL13 utilizando el kit Foxp3 *Fixation/Permeabilization* (eBiosciences). Brevemente, se fijaron y permeabilizaron 2×10^5 células PC-3, Ramos y RsRs con la solución reguladora para la permeabilización y fijación, preparado de acuerdo a las indicaciones del fabricante, durante 1.5 horas a 4 °C en oscuridad. Se lavaron las células con solución reguladora para permeabilizar 1X. Se realizó la tinción de HIF-1 α y CXCL13 con los anticuerpos específicos acoplados a un fluorocromo, anti-HIF-1 α acoplado a fluoresceína y anti-CXCL13 acoplado a ficoeritrina (R&D, Systems, Minneapolis, MN), empleando una dilución 1:10.

Los anticuerpos se incubaron durante 1 hora a 4 °C en oscuridad. Las células se lavaron 2 veces con solución reguladora para permeabilizar 1X. Se resuspendieron en PBS y se cuantificó la intensidad media de fluorescencia en un citómetro FACS Calibur (Hospital de Especialidades del CMN SXXI).

5.10 Determinación de la expresión de HIF-1 α y CXCL13 mediante inmunofluorescencia

Las células PC-3 fueron fijadas con acetona fría durante 10 minutos. Se lavaron 2 veces con PBS. Se permeabilizaron las células y se bloquearon los receptores Fc con la solución reguladora para permeabilizar (0.1% Tritón X-100 y 0.02% de BSA en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda y en agitación. Las células se lavaron 2 veces con PBS, en agitación durante 5 minutos. Se realizó la tinción para cada una de las proteínas con anticuerpos específicos, los anticuerpos primarios se incubaron durante 1 hora a 4 °C en cámara húmeda y en agitación. La dilución del anticuerpo que se empleó fue 1:20 del anticuerpo monoclonal de ratón HIF-1 α y 1:20 del anticuerpo monoclonal de cabra CXCL13. Los anticuerpos secundarios, 1:100 anti-ratón biotina y 1:100 de estreptavidina-Alexa fluor 594 y 1:500 de anti-cabra-FITC, se incubaron durante 40 min a 4°C en cámara húmeda y en agitación. El reactivo DRAQ7 se empleó para teñir los núcleos y se montaron las laminillas con vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La inmunofluorescencia se observó y se fotodocumentó en un microscopio confocal Zeiss Axiovert 100M (Hospital de Especialidades del CMN SXXI).

5.11 Determinación de la interacción de HIF-1 α con el promotor de CXCL13 mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Células PC-3 fueron cultivadas en condiciones de normoxia a 37°C y 5% de CO₂. Las células fueron cosechadas con Tripsina-EDTA (GIBCO) y 2x10⁶ células fueron fijadas con 1% de formaldehído durante 10 min a temperatura ambiente y 5 min a 37 °C. El ChIP se realizó utilizando el kit MAGnify™ Chromatin Immunoprecipitation System (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron lisadas y sonicadas para obtener fragmentos de ADN entre 600 y 1000 pb. Se acopló el anticuerpo anti-HIF-1 α (R&D Systems, Minneapolis, MN) ó anti-HIF-1 α (Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) o IgG de ratón (Invitrogen, Carlsbad, CA) a las perlas magnéticas protein A/G durante 3.5 horas a 4 °C.

La cromatina fragmentada fue diluida como lo indica el fabricante e incubada con el anticuerpo anti-HIF-1 α (R&D Systems) o IgG de ratón (Invitrogen, Carlsbad, CA) acoplado con las perlas magnéticas durante toda la noche a 4 °C. Los inmunocomplejos fueron colectados, lavados y eluidos. Los fragmentos eluidos fueron digeridos con proteinasa K (20 mg/mL) a 55°C durante 15 min y el entrecruzamiento fue revertido mediante calor a 65 °C durante 20 min. Los inmuno-precipitados de ADN fueron recuperados con perlas magnéticas para purificación de ADN (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se realizó PCR de punto final para amplificar los sitios de interés. Los oligonucleótidos para la PCR se muestran en la tabla 5. El programa para la PCR fue el siguiente: 94 °C 5 min; 35 ciclos de 94 °C 30 s; 56-62 °C 30 s; 68 °C 5 min ; 4 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.9% y se utilizó bromuro de etidio para visualizar con luz UV los productos de la amplificación, utilizando un transiluminador y un fotodocumentador para obtener la imagen resultante.

Tabla 5 Secuencia de los oligonucleótidos para la detección por PCR de la interacción de HIF-1 α al promotor de CXCL13 mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Sitio (pb)	Secuencia oligonucleótido	Tm (°C)
-678	Sentido 5' G TTT ATG TCA GAC TGT AAT ATG G 3'	56.0
	Anti-sentido 5' CAG ATC CTA ACG CTG ATT ATG 3'	
- 447	Sentido 5' AGA GAT GGA AAA GAC TGG TAG G 3'	61.0
	Anti-sentido 5' GCT TGG AAG CTC CAA AGC AC 3'	
- 47	Sentido 5' AGA GAT GGA AAA GAC TGG TAG G 3'	62.0
	Anti-sentido 5' CTT CAT TCT GTC TGG AGG TAG 3'	

5.12 Microarreglo de biopsias de pacientes pediátricos con linfoma no Hodgkin

La construcción de un microarreglo de tejidos, permite evaluar una mayor cantidad de muestras en una sola laminilla, disminuyendo el error experimental desde el inicio de la tinción hasta el revelado de la misma. Se disminuye el tiempo experimental, así como también el gasto de reactivos. Por estas razones, se construyó un microarreglo de tejidos con 58 biopsias de pacientes pediátricos con Linfoma. Los cortes para el microarreglo de tejidos fueron obtenidos de ganglios linfáticos embebidos en parafina de paciente pediátricos que asistieron al Hospital Infantil de México Federico Gómez entre los años 2000 a 2006, quienes fueron diagnosticados con cualquiera de los tipos de LNH. Las biopsias fueron de pacientes sin tratamiento previo a la extirpación del ganglio y fueron arreglados según la técnica de microarreglos, empleando un sistema semiautomático ATA-100 Chemicon (Chemicon's Advanced Tissue Array). Los cortes de cada biopsia para el microarreglo fueron de 4 μ m y se realizaron de forma seriada.

De los 58 linfomas que se incluyeron en el Microarreglo: 11 fueron de linfoma linfoblástico, 13 de linfoma de Burkitt, 6 de linfoma de células grandes y 4 de linfoma anaplásico de células grandes.

5.13 Análisis de la expresión de HIF-1 α y CXCL13 en el microarreglo de biopsias de pacientes pediátricos con LNH mediante inmunohistoquímica

Para la inmunotinción de las biopsias del microarreglo, se realizaron cortes de 4 μ m sobre una laminilla de vidrio cubiertas con adhesivo especial (Apex™ Superior adhesive slides, Leica microsystems). Brevemente, se desparafinó el microarreglo mediante calentamiento a 62°C por 1 h, después el tejido fue hidratado con el siguiente procedimiento: 3 baños en xileno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 8 minutos.

Se realizó la recuperación antigénica sumergiendo las laminillas en citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) que se colocaron en baño maría a 90 °C durante 20 minutos. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos. La unión no específica de los anticuerpos al tejido fue bloqueada, sumergiéndolos durante 60 minutos en una mezcla de bloqueador universal y albúmina sérica bovina al 2%. Las secciones de tejido se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpos anti-HIF-1 α 1:100 (R&D Systems, Minneapolis, MN) y anti-CXCL13 1:100 (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se realizaron lavados con PBS 1X durante 5 minutos y se agregó el anticuerpo universal Link conjugado a Biotina (Dako) y posteriormente con streptavidina conjugada a HRP, por último el color fue generado mediante la adición del substrato DAB durante 1 a 2 minutos; la reacción se

detuvo con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina. Posteriormente el tejido fue deshidratado bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

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

6.- RESULTADOS

6.1 Modulación de la expresión de HIF-1 α en células PC-3 y el efecto en la expresión de CXCL13.

Para evaluar el efecto que tiene la acumulación de HIF-1 α en citoplasma en la expresión de la quimiocina CXCL13, células PC-3 fueron tratadas con el inhibidor de la degradación de HIF-1 α , EDHB, a diferentes concentraciones (25, 100 y 250 μ M), durante 24 h. Posteriormente se evaluó, mediante inmunocitoquímica con anticuerpos específicos la expresión de ambas proteínas, los resultados demostraron que la acumulación de HIF-1 α (**Figura 9 b-e**) tuvo un efecto en la expresión de CXCL13 (**Figura 9 f-i**) aumentando de manera significativa cuando las células fueron tratadas con 25 (**Figura 9 c y g**) y 100 μ M de EDHB (**Figura 9 d y h**) en comparación con las células no tratadas (**Figura 9 b y f**). Los resultados anteriores sugieren que la expresión de CXCL13 aumenta de manera directa a la acumulación de HIF-1 α . Sin embargo, la expresión de ambas proteínas se ve disminuida a una concentración 250 μ M de EDHB (**Figura 9 e, i**). Esta disminución en la acumulación de HIF-1 α puede deberse a la muerte celular observada en la inmunotinción.

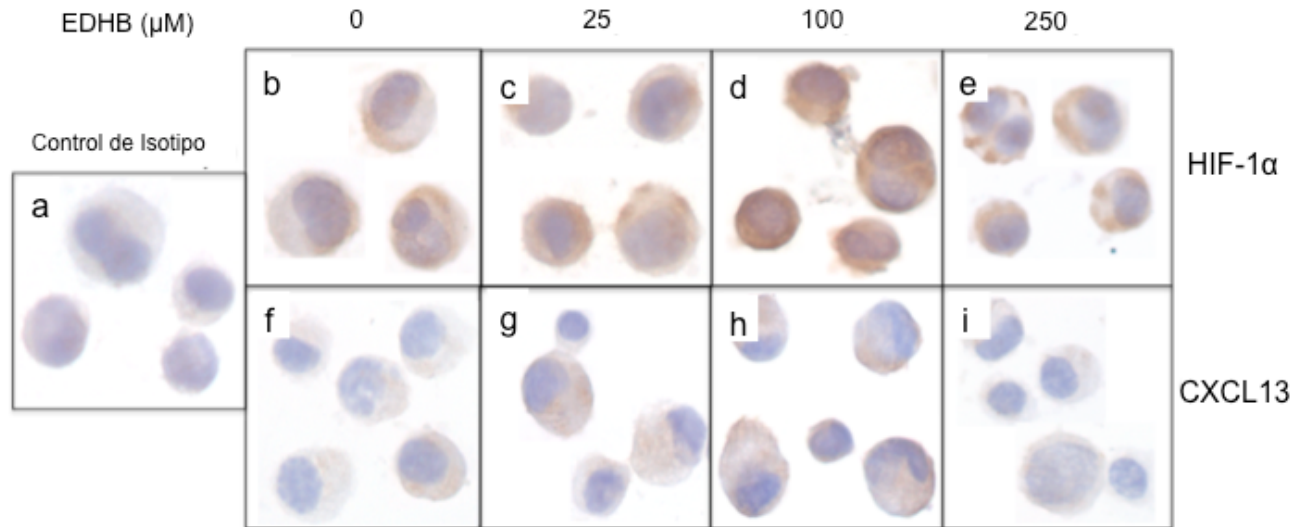


Figura 9 La inducción de la acumulación de HIF-1 α incrementa la expresión de CXCL13 en células PC-3.

Células PC-3 fueron tratadas durante 24h con diferentes concentraciones 25, 100 y 250 μM . del inhibidor de la degradación de HIF-1 α (EDHB). La expresión de HIF-1 α y CXCL13 se evaluó mediante inmunocitoquímica, utilizando anticuerpos específicos anti-HIF-1 α y anti-CXCL13 a) control de isotipo (células tratadas con el DMSO), b,f) células sin tratar, c,g) células tratadas con 25 μM de EDHB, d,h) células tratadas con 100 μM de EDHB, e,i) células tratadas con 250 μM de EDHB. Amplificación 100X

Después de haber encontrado las concentraciones óptimas, en donde se observó que la acumulación de HIF-1 α mediada por el fármaco EDHB induce la expresión de CXCL13, lo siguiente fue evaluar cual era el tiempo óptimo de tratamiento con EDHB, para inducir la expresión de CXCL13. Para lo cual se realizó una cinética de tiempo, en donde células PC-3 fueron tratadas con 25 μM de EDHB a diferentes tiempos (1.5, 3, 6, 12, 18 y 24 h), posteriormente se llevó a cabo la inmunotinción para evaluar la expresión de HIF-1 α y CXCL13 en cada tiempo mediante citometría de flujo (**Figuras 10A y 10B** respectivamente). Cabe señalar que para cada uno de los tiempos de tratamiento con EDHB, se tuvo su control del vehículo correspondiente (DMSO). Considerando como el 100% a la intensidad media de fluorescencia dada por las

células, que fueron incubadas sólo con el vehículo en cada punto de la cinética de tiempo. En la **Figura 10A** se muestran los resultados de la expresión total de HIF-1 α , la cual aumentó de manera significativa a las 12 h de tratamiento. Sin embargo en este tiempo, la expresión de CXCL13 es mínima (**Figura 10B**), la expresión de esta quimiocina se ve aumenta de manera significativa a partir de las 18 h y es más evidente a las 24 h. Sin embargo, en éste tiempo la expresión de HIF-1 α empieza a disminuir.

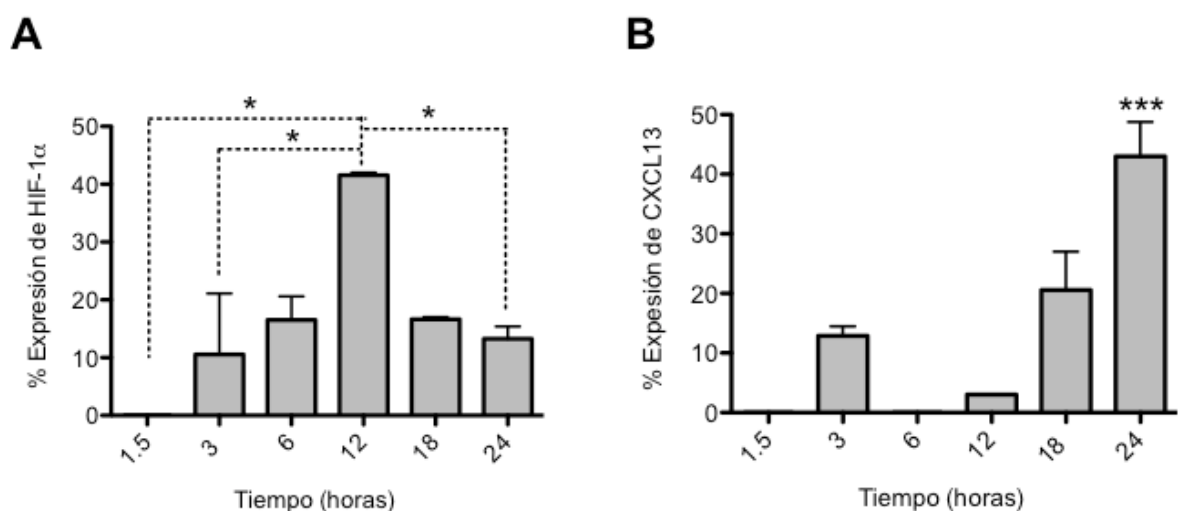


Figura 10 La acumulación de HIF-1 α induce la expresión de CXCL13 a través del tiempo.

La expresión de cada proteína fue cuantificada mediante citometría de flujo. La expresión se normalizó con respecto a la intensidad media de fluorescencia con el disolvente del fármaco, DMSO. Promedio y desviación estándar de los resultados de tres experimentos independientes.

* $p = 0.01$ *** $p = 0.0001$ (ANOVA de una vía).

Para corroborar el efecto que ejerce la modulación de la expresión de HIF-1 α , en la expresión de CXCL13, células PC-3 fueron tratadas con moduladores químicos de su expresión tales como EDHB, que como ya se mencionó inhibe la degradación de HIF-1 α induciendo su acumulación en la célula y el 2-Me, metabolito del 17- β estradiol que bloquea la translocación de HIF-1 α al núcleo por lo que se inhibe su actividad

Después del tratamiento con 25 μM de EDHB o 1 μM de 2-Me se analizó la expresión de HIF-1 α y CXCL13 mediante doble inmunofluorescencia. En la **Figura 11A**, se presentan los resultados en donde se observa que al aumentar la expresión de HIF-1 α (**Figura 11A f**) se induce un aumento de la expresión de CXCL13 (**Figura 11A g**) en comparación con las células tratadas sólo con el vehículo (**Figura 11A b y c** respectivamente). De manera interesante los resultados demuestran que ambas proteínas se encuentran co-localizadas (**Figura 11A d y h**). En la **Figura 11A a y e** se muestra en campo claro las células seleccionadas para la microfotografía representativa de la microscopía confocal.

Por otro lado, el bloqueo de la actividad de HIF-1 α con 2-Me (**Figura 11B f**) induce una clara disminución de la expresión de esta quimiocina (**Figura 11B g**) en comparación con las células tratadas solo con el vehículo (**Figura 11B, b y c** respectivamente). De manera interesante los resultados demuestran que ambas proteínas se encuentran co-localizadas (**Figura 11B d y h**). En la **Figura 11B, a y e**, se muestra en campo claro las células seleccionadas para la microfotografía representativa de la microscopía confocal. Se puede observar que la expresión de HIF-1 α es preferentemente citoplásmica, y la expresión de CXCL13 se ve afectada por los moduladores farmacológicos de la expresión de HIF-1 α .

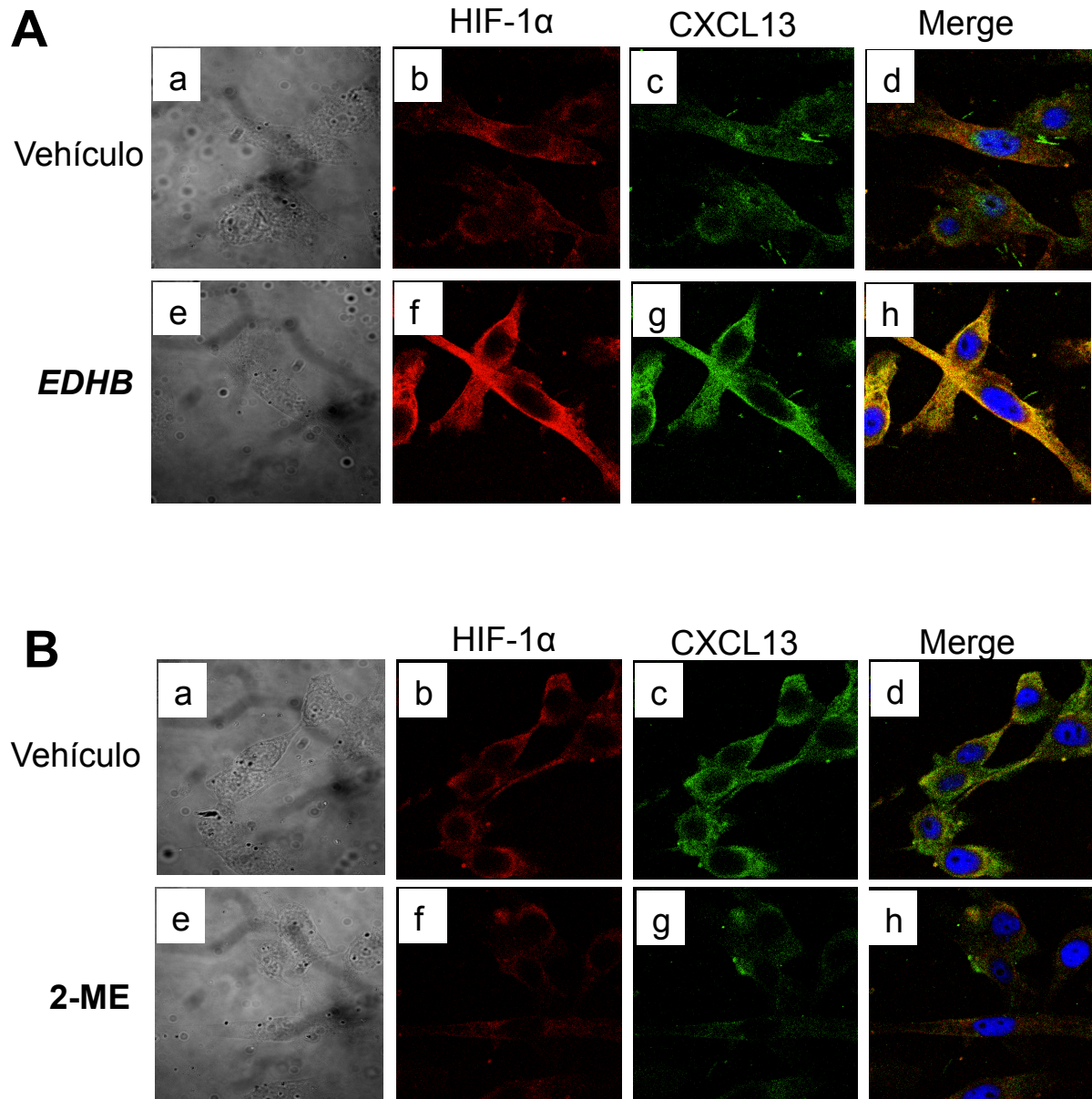


Figura 11 Modulación de la actividad de HIF-1 α . Las células PC-3 fueron tratadas con 25 μ M de EDHB y 1 μ M de 2-metoxiestradiol durante 24 horas. Se evaluó la expresión de HIF-1 α y CXCL13 mediante inmunofluorescencia, la tinción se realizó con anticuerpos específicos para evaluar la expresión de cada una de las proteínas. Los fluorocromos que se utilizaron fueron FITC para CXCL13 y estreptavidina-Alexa fluor 594 para HIF-1 α . El DRAQ7 se utilizó para teñir los núcleos. Amplificación 100X. (Microscopio confocal Zeiss Axiovert 100M, Hospital de Especialidades CMN S.XXI).

6.2 Regulación de la expresión de CXCL13 por HIF-1 α

Después de haber evaluado el efecto directo que tiene el modular la expresión de HIF-1 α , en la expresión de CXCL13 y con la evidencia bio-informática de que el promotor de CXCL13 contiene 3 sitios putativos de unión para HIF-1 α (sitios -47, -447 y -678 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción), se consideró que este factor de transcripción pudiera estar participando en la regulación transcripcional de CXCL13. Con el propósito de evaluar ésta posible participación, se utilizó la tecnología de plásmidos reporteros, clonando el promotor de la quimiocina CXCL13 en el pLGFN1 y obteniendo la construcción que se le denominó pCXCL13-GFP, la cual contiene 5138 pb. **Figura 12A**

La evaluación de la funcionalidad del promotor de CXCL13 se realizó mediante el análisis de la expresión de la proteína reportera GFP (pCXCL13-GFP), por citometría de flujo y en la **Figura 12B** se muestran los resultados de la evaluación por citometría de flujo de la intensidad media de fluorescencia de GFP. Como se esperaba, la expresión de esta proteína se encontró elevada en las células transfectadas con el control positivo pCMV-GFP. El promotor de la quimiocina CXCL13 fue funcional, lo cual se refleja al tener expresión de la proteína GFP en las células transfectadas con el plásmido que contiene el promotor de esta quimiocina (pCXCL13-GFP).

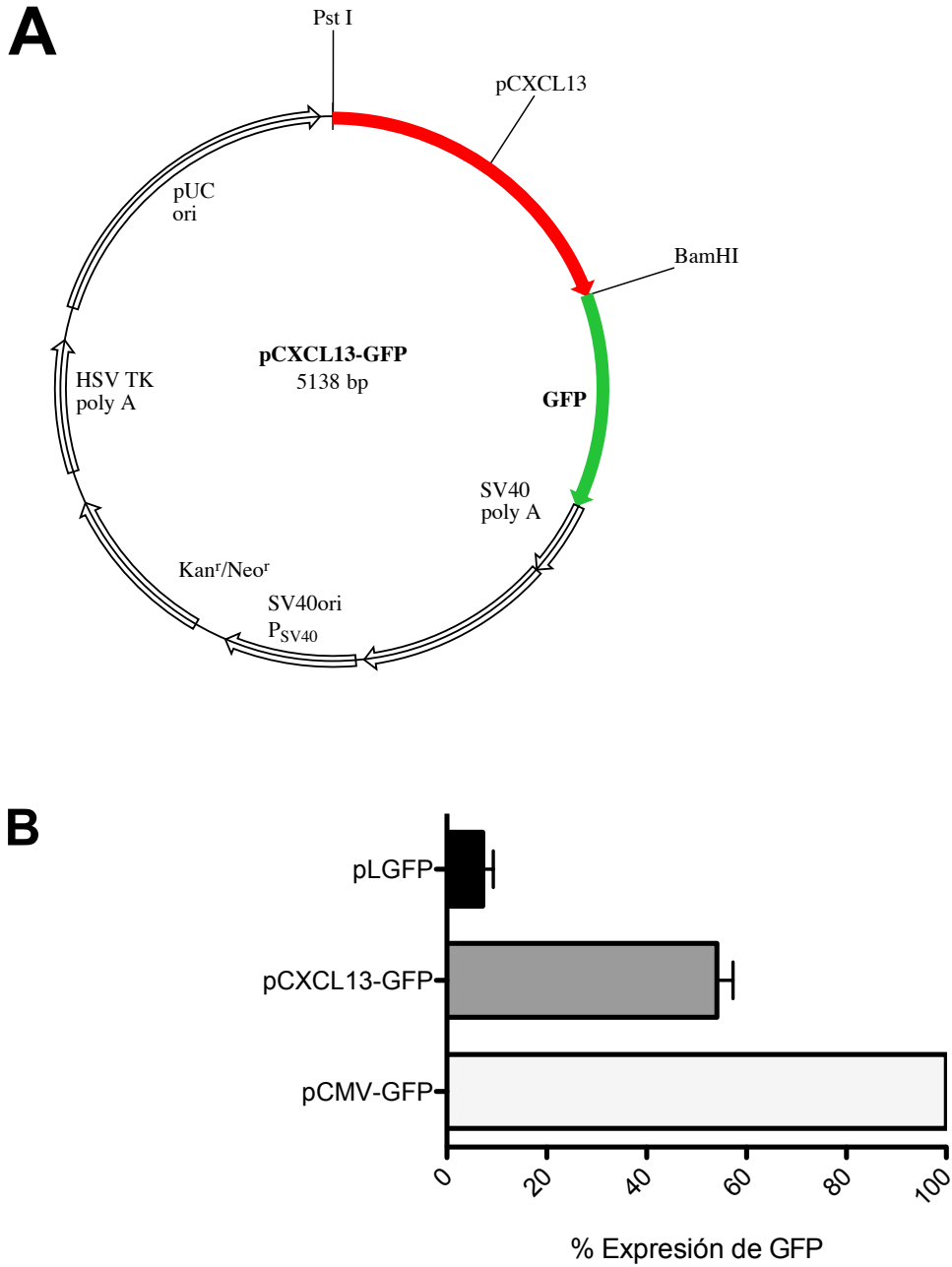
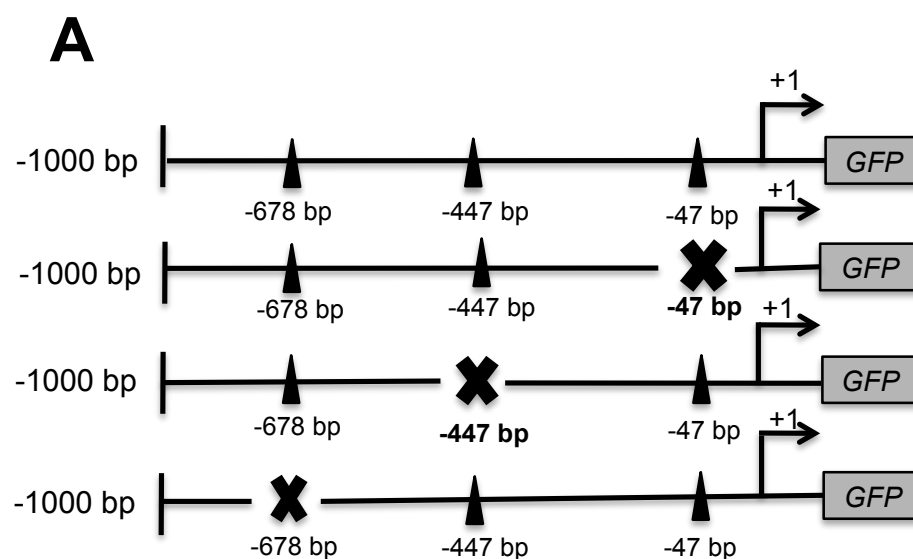
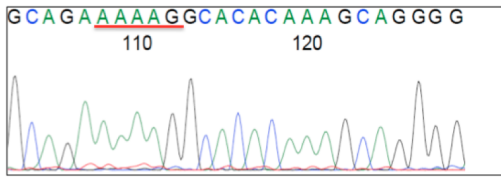
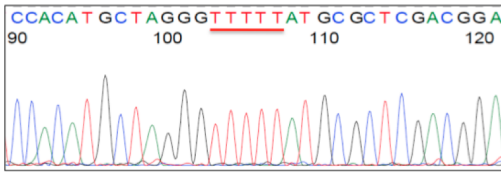
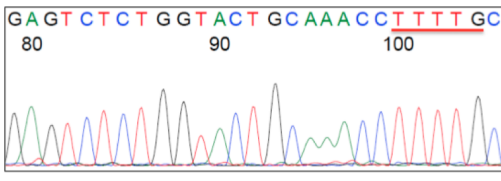


Figura 12 Actividad de la proteína GFP bajo el promotor de CXCL13. A) Mapa del plásmido pLGFP-N1 en donde se llevó a cabo la inserción del promotor de CXCL13. B) Evaluación de la funcionalidad del promotor. Las células PC-3 fueron transfectadas con lipofectamina con cada una de las construcciones y se cuantificó la intensidad media de fluorescencia de la proteína reportera (GFP) utilizando un citómetro de flujo (FACS, Calibur, Hospital de Especialidades, CMN SXXI). La eficiencia de transfección fue de aproximadamente el 30%.

Los resultados anteriores nos permitieron continuar con la evaluación de la importancia de cada uno de los sitios de unión a HIF-1 α , en la regulación del promotor de CXCL13, para lo cual se realizó mutagénesis sitio dirigida en cada uno de estos posibles sitios, como se observa en la **figura 13A**. Posteriormente, la secuencia de las mutantes del promotor de CXCL13 se verificó mediante secuenciación como se describió a detalle en materiales y métodos. Observamos en los histogramas de la **Figura 13B** que la homología fue del 100%. En la **Figura 13C**, se muestran los resultados de la expresión de GFP en las células transfectadas con los plásmidos que contenían cada una de las mutaciones de los sitios de HIF-1 α . En donde se observa que existe una disminución significativa de la expresión de GFP en las células transfectadas con el plásmido que contiene la mutación en el sitio -447, en comparación con las células transfectadas con el plásmido que contiene el promotor completo (pCXCL13). En las células transfectadas con los plásmidos que contenían las mutaciones -47 y -678, se observa una tendencia a ser menor en comparación con las células transfectadas con el plásmido completo, sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa.



B

Silvestre	Mutación	Secuenciación
CAGG <u>CACAG</u> GCAC	AAAAG	
AGGG <u>ACGTG</u> ATGC	TTTTT	
GCAAACC <u>CACAG</u> C	TTTTG	

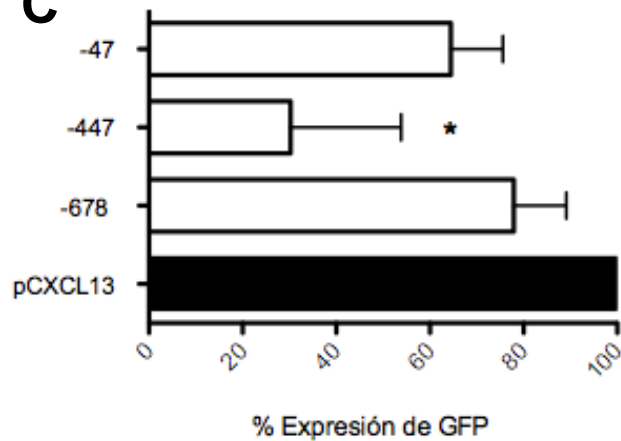
C

Figura 13 Las mutaciones de los diferentes sitios de HIF-1 α disminuyeron la actividad del promotor de CXCL13. A) Esquema del promotor de CXCL13 y posibles sitios de unión de HIF-1 α al promotor. B) Electroferogramas de la secuenciación de cada una de las mutaciones realizadas en el plásmido pCXCL13-GFP. C) Expresión de la proteína reportera GFP de cada una de las mutaciones sitio dirigida en pCXCL13-GFP para cada uno de los posibles sitios de unión de HIF-1 α al promotor de CXCL13. Células PC-3 fueron transfectadas con las diferentes construcciones y la actividad del promotor fue evaluada con la intensidad media de fluorescencia de la proteína reportera GFP mediante citometría de flujo. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. ANOVA * $p < 0.05$.

Después de determinar que HIF-1 α participa de manera importante en la regulación de la expresión de CXCL13, fue de especial interés demostrar si éste factor de transcripción regula la expresión de la quimiocina a nivel transcripcional, uniéndose de manera directa a su promotor. Para ello se empleó la técnica de ChIP. Primero se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada posible sitio de unión de HIF-1 α al promotor de CXCL13, de acuerdo al análisis bio-informático. Posteriormente, para poder identificar los fragmentos de ADN inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-HIF-1 α , se estandarizó la PCR para cada uno de los sitios, empleando ADN genómico de células PC-3, obteniéndose un fragmento de 587 pb (sitio -47), 280 pb (sitio -447) y 320 pb (sitio -678) (**Figura 14**). La cromatina fragmentada de células PC-3 fue utilizada para el ensayo de ChIP, empleando un anticuerpo específico para HIF-1 α , y se realizó la PCR para cada uno de los posibles sitios de unión.

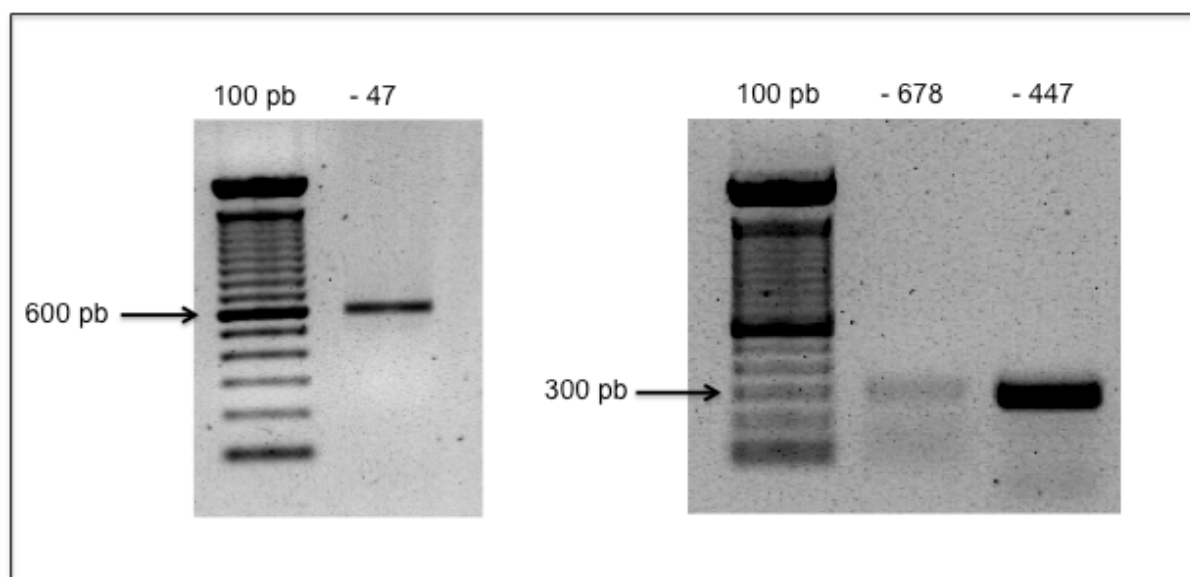


Figura 14 Estandarización de la PCR de los sitios de unión de HIF-1 α al promotor de CXCL13.

Amplicones obtenidos de la PCR para cada uno de los posibles sitios de unión de HIF-1 α al promotor de CXCL13 con los oligonucleótidos correspondientes.

En la **Figura 15** puede observarse que HIF-1 α es capaz de interactuar con el promotor de CXCL13 en los tres sitios encontrados mediante el análisis bio-informático. Los resultados anteriores sugieren que HIF-1 α podría estar regulando a la quimiocina CXCL13 mediante la unión directa a cualquiera de los tres sitios en el promotor de esta quimiocina. Sin embargo, los resultados de la mutación sitio dirigida indicaron que la mutación en el sitio -447 pb resultó ser de mayor importancia para la expresión de esta quimiocina. El Input (cromatina sin fragmentar) fue utilizado como control positivo de la reacción de PCR para cada uno de los sitios de interés.

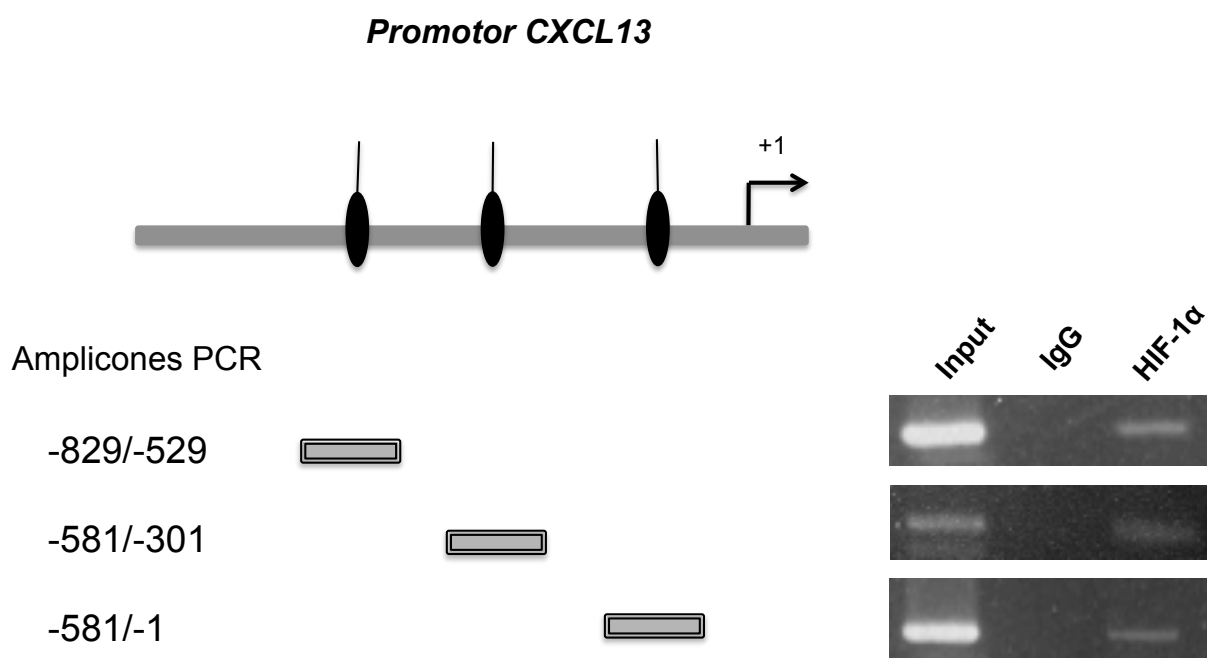


Figura 15 HIF-1 α puede interactuar con los tres sitios de unión en el promotor de CXCL13.

A partir de células PC-3, se llevo a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) con el anticuerpo anti-HIF-1 α . Los sitios de interacción fueron identificados mediante PCR y utilizando oligonucleótidos específicos para cada posible sitio de unión de HIF-1 α en el promotor de CXCL13.

6.3 Regulación de la expresión de CXCL13 en células de linfoma no Hodgkin por HIF-1 α

Como ya se había mencionado, se sabe que la quimiocina CXCL13 juega un papel muy importante en la formación de ganglios linfáticos [9] y que se encuentra altamente expresada en diferentes tipos de linfoma [71]. Por lo que fue de nuestro interés evaluar si la regulación transcripcional de CXCL13 por HIF-1 α podía tener un impacto biológico importante en células de linfoma. Se investigó la expresión de ambas proteínas en células Ramos (linfoma de Burkitt) y expresan HIF-1 α de manera constitutiva y en células RsRs que provienen de las células Ramos. Estas células Ramos, denominadas RsRs, fueron tratadas por un largo periodo de tiempo con el inhibidor de la degradación de HIF-1 α (EDHB), por lo que expresan mayormente a éste regulador transcripcional. En la **Figura 16A** se muestran los resultados de la inmunocitoquímica, en donde se observa que las células que expresan altos niveles de HIF-1 α (RsRs), también expresan altamente CXCL13 en comparación con las células Ramos. La expresión de ambas proteínas también se evaluó mediante citometría de flujo (**Figura 16B**), en donde encontramos que es consistente el hecho de que la sobre-expresión de HIF1- α , tiene un efecto directo en la expresión de CXCL13.

Los resultados anteriores sugieren fuertemente que la expresión de CXCL13 también se ve regulada por HIF-1 α en células de linfoma no Hodgkin.

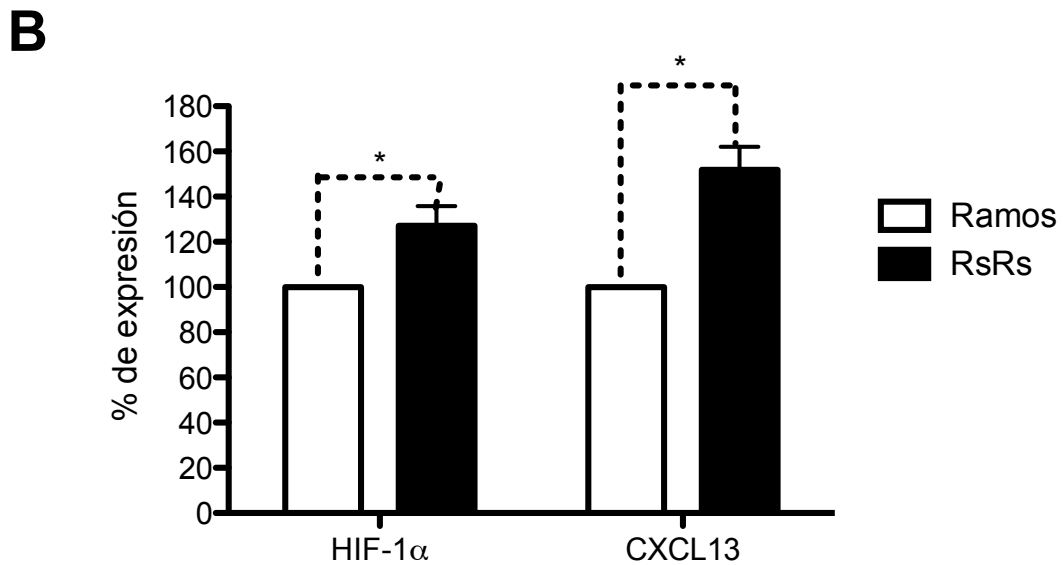
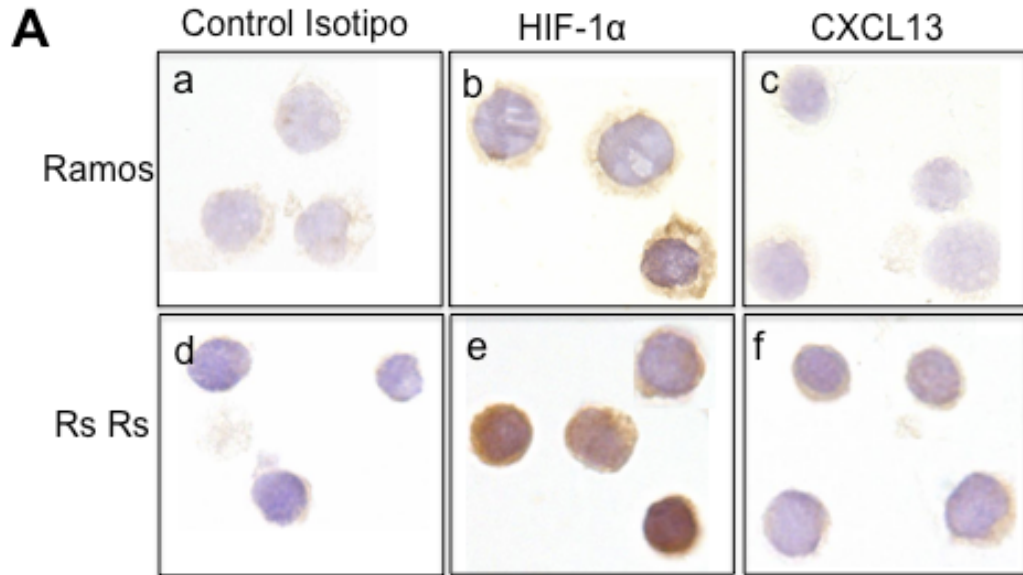


Figura 16 La inducción de la acumulación de HIF-1 α en células de linfoma incrementó la expresión de CXCL13.

A) La expresión se evaluó mediante inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para HIF-1 α y CXCL13, a y d control de isotipo, b,e: expresión de HIF-1 α , c,f: expresión de CXCL13. B) Citometría de flujo. Se realizó la tinción intracelular, en células Ramos y RsRs, para evaluar la expresión HIF-1 α y CXCL13 utilizando anticuerpos específicos acoplados a un fluorocromo. * $p < 0.05$

6.4 Expresión de HIF-1 α y CXCL13 en los subtipos histológicos de LNH de pacientes pediátricos.

Para poder evaluar si la regulación transcripcional de CXCL13 por HIF-1 α puede tener un impacto biológico importante en los pacientes con linfoma, se llevó a cabo el análisis de expresión de ambas proteínas en biopsias de pacientes pediátricos con esta enfermedad. Se evaluó la expresión de HIF-1 α y CXCL13 por inmunohistoquímica en un microarreglo de tejidos con biopsias de pacientes pediátricos incluyendo los cuatro subtipos histológicos de LNH. En la **Figura 17A**, se muestra una microfotografía representativa de los subtipos histológicos de menor agresividad (L. de Burkitt y L. Linfoblástico) en donde se observa que la expresión de ambas proteínas es menor en comparación con los subtipos histológicos de mayor agresividad (L. Anaplásico y L. de células B grandes) (**Figura 17B**). La cuantificación de la expresión de ambas proteínas se realizó mediante el sistema de patología digital y se muestran en la **Figura 18A y 18B**, en donde se puede observar que la expresión de HIF-1 α aumenta de manera significativa en el linfoma de células B grandes comparado con los linfomas menos agresivos (**Figura 18A**), mientras que no se encontró diferencia significativa para la expresión de CXCL13 (**Figura 18B**). Se evaluó la posible correlación entre la expresión de HIF-1 α y CXCL13 para cada tipo de linfoma, se encontró un valor de correlación de r de Spearman de 0.2 para los linfomas menos agresivos.

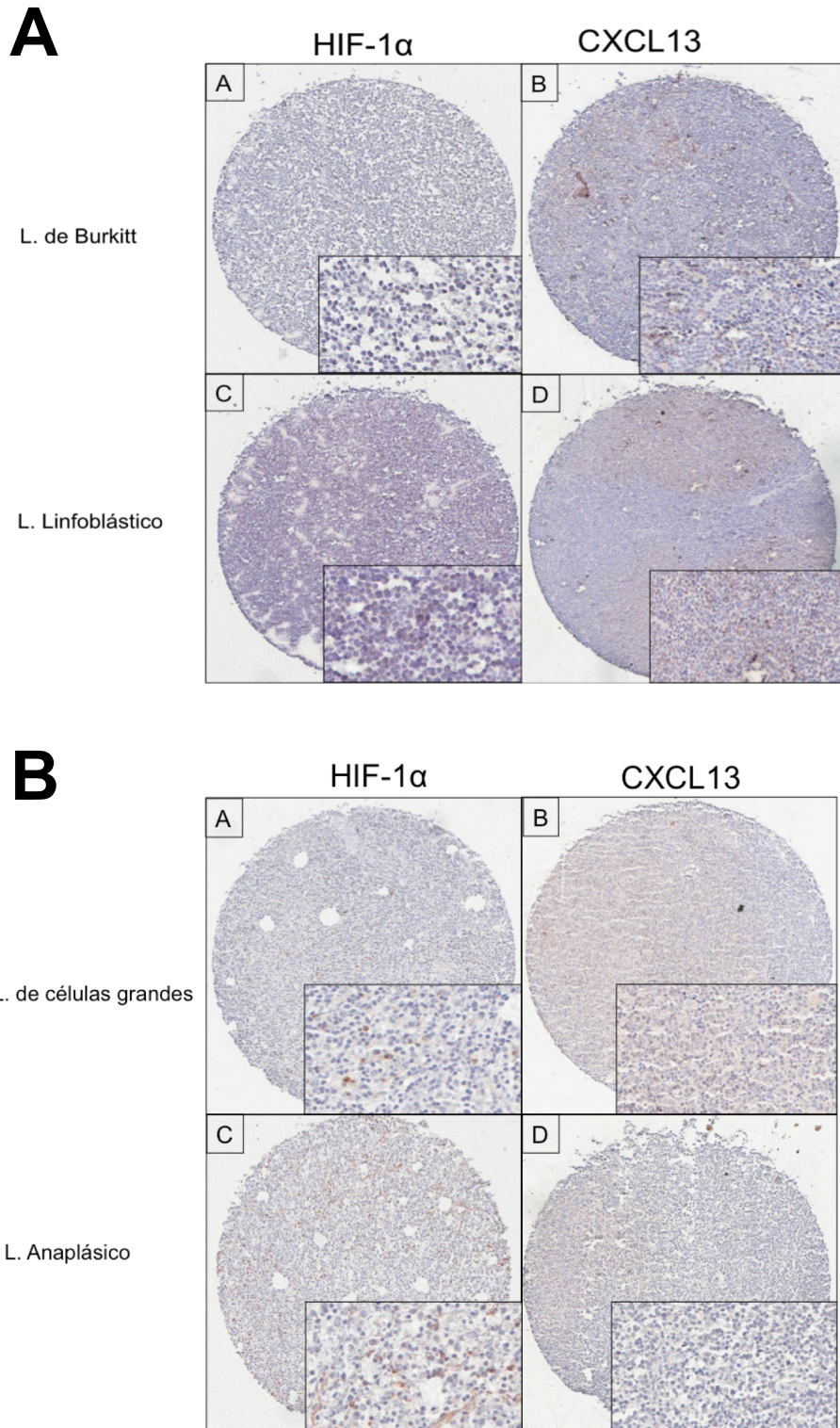


Figura 17 La expresión de HIF-1 α y CXCL13 es mayor en los LNH más agresivos.

La identificación de las proteínas, HIF-1 α y CXCL13, se evaluó mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos A) Linfoma de Burkitt y Linfoma Linfoblástico, B) Linfoma de células B grandes y Linfoma Anaplásico.

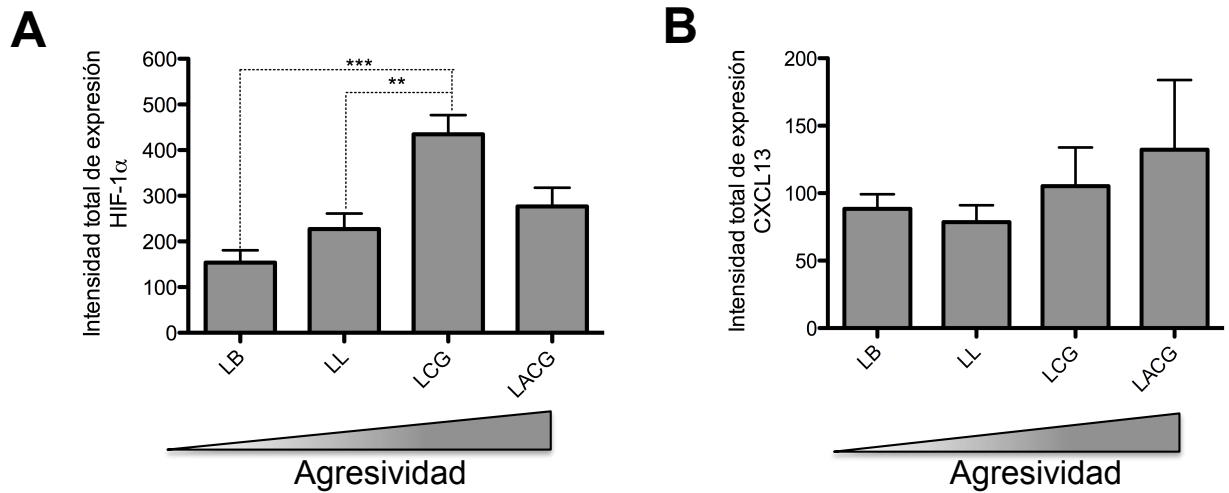


Figura 18 Cuantificación de la expresión de HIF-1 α y CXCL13 en los diferentes tipos de LNH pediátrico. Cuantificación de la intensidad total de expresión de HIF-1 α en cada uno de los subtipos de LNH por patología digital utilizando el digitalizador de imágenes automatizado ScanScope CS (Aperio). A) Expresión de HIF-1 α en los diferentes tipos de LNH pediátrico B) Expresión de CXCL13 en los diferentes tipos de LNH pediátrico. ANOVA ** $p < 0.05$ *** $p < 0.0001$

DISCUSIÓN

CXCL13 es una quimiocina importante en la formación de la zona de B del ganglio linfático, encargada de reclutar células B a los folículos en los ganglios linfáticos así como en el bazo [6]. Se sabe que CXCL13 es requerida para el desarrollo de ganglios linfáticos y placas de Peyer [7]. Las primeras observaciones sobre la probable participación de CXCL13 en cáncer, fueron realizadas en linfomas gástricos producidos por *Helicobacter pylori* [69] y en linfomas no Hodgkin relacionados a SIDA [73]. Estudios posteriores han permitido confirmar que esta molécula se encuentra sobre expresada en diferentes tipos de neoplasias como en el caso de los linfomas de células T angioinmunoblásticas [74], linfoma de MALT [5] y linfomas del sistema nervioso central [75], entre otros. Por otro lado se ha documentado que la cooperación selectiva de CXCL13 y CCL19 (ligandos de CXCR5 y CCR7 respectivamente) está implicada en la resistencia a la apoptosis en células B CD23⁺ CD5⁺ de leucemia linfocítica aguda (B-ALL) y crónica (B-CLL) [76].

Poco se sabe de la regulación transcripcional de las quimiocinas. En el 2009 se publicó que el gen de CXCL13 es un blanco de la vía alternativa de NF- κ B [72]. Por otro lado, realizando un análisis *in silico* del promotor de CXCL13 encontramos tres posibles sitios de unión de HIF-1 α .

HIF-1 es reconocido como un mediador central de la respuesta transcripcional a estrés hipóxico. Además de su función adaptativa en respuesta a estrés celular, trabajos recientes han dado una gran importancia al papel de HIF-1 en procesos tanto fisiológicos, como patológicos [32]. La alta expresión de este factor de transcripción es un indicador de mal pronóstico en diversos tipos de cáncer. Por otro lado, HIF-1 regula alrededor de 150 genes, entre los cuales se encuentran quimiocinas como CCL2, CCL12 y algunos de sus receptores [14, 61]. También se ha reportado que macrófagos

en condiciones de hipoxia inducen una mayor expresión de las quimiocinas CXCL12, CCL10, CXCL1, CCR7 CCL3, CXCR4 [14]. Sin embargo, hasta la fecha no existen publicaciones que indiquen de que HIF-1 α esté participando en la regulación de la quimiocina CXCL13.

Para evaluar la participación de HIF-1 α en la actividad transcripcional de sus diferentes genes blanco, se han empleado diversos métodos, como la inhibición o la sobre-expresión de éste regulador transcripcional. Como terapia contra el cáncer la inhibición de HIF-1 α ha representado una estrategia atractiva contra esta enfermedad. Se ha demostrado que los fármacos que tienen como blanco la inhibición de la polimerización de los microtúbulos como el taxol y el 2-Me, tienen una relevancia clínica pues inhiben la angiogénesis a través de la represión de la actividad de HIF-1 α [77, 78]. Esto se debe a que la inhibición de la polimerización de los microtúbulos, afecta la translocación de HIF-1 α al núcleo, lo cual inhibe significativamente la actividad transcripcional de HIF-1, sugiriendo que los microtúbulos están críticamente involucrados en el tráfico nuclear y en la actividad transcripcional de HIF-1 α [79]. Sin embargo, la cascada de señalización aún no ha sido elucidada por completo. Para promover la sobre-expresión de HIF-1 α , estudios bioquímicos han demostrado que los análogos estructurales del α -cetoglutarato pueden servir como inhibidores potentes competitivos de las prolin-hidroxilasas [80]. Estos análogos compiten por la unión en el sitio activo de la enzima, inhibiendo así su actividad [81]. El EDHB se ha caracterizado como un inhibidor específico, que se une competitivamente a los sitios del ascorbato y α -cetoglutarato que forman parte de la prolin-hidroxilasa [80], evitando la degradación de HIF-1 α , promoviendo su acumulación en el citosol y por tanto su translocación al núcleo y la heterodimerización con HIF-1 β para posteriormente su unión a los genes blanco que contienen los elementos de respuesta a hipoxia (HRE). En este trabajo se

utilizaron el EDHB y el 2-Me como moduladores farmacológicos de la actividad y expresión de HIF-1 α , con el propósito de evaluar el papel de este factor de transcripción en la expresión de la quimiocina CXCL13, los resultados mostraron que el tratamiento de células PC-3 con EDHB a diferentes tiempos, tiene un efecto sobre la expresión de CXCL13. Se observó una acumulación de HIF-1 α así como el aumento en la expresión de CXCL13, después del tratamiento con 25 y 100 μ M de EDHB, con respecto al control de células tratadas sólo con el vehículo. Sin embargo, a la concentración de 250 μ M se observó que la expresión de ambas proteínas disminuyó con respecto al control. Esta disminución en la expresión se asoció al fenotipo de muerte celular, lo cual sugiere que las concentraciones grandes de EDHB son tóxicas para las células, motivo por el cual probablemente se observó menos expresión de estas proteínas. Por esta razón, se decidió utilizar en los experimentos subsecuentes la concentración de 25 μ M, con la que se observó un aumento significativo de HIF-1 α y la viabilidad celular no se afectó de manera sustancial.

Al realizar la cinética de tiempo, se observó que la mayor expresión de HIF-1 α en células PC-3 inducida por 25 μ M de EDHB fue a las 12 h, lo que no sucedió con la expresión de CXCL13, esto sugiere que HIF-1 α se está acumulando en el citoplasma a tiempos más tempranos (12 h), pero que se requiere de tiempos más largos (18 y 24 h) para que HIF-1 α sea translocado al núcleo y se una a los elementos de respuesta a hipoxia en el promotor del gen blanco, en este caso de CXCL13. Sin embargo, esto es solo una especulación debido a que hasta el momento en que realizamos estos experimentos, no habíamos evaluado si realmente CXCL13 era regulado transcripcionalmente por HIF-1 α . Observamos el efecto del EDHB y del 2-Me en la expresión de HIF-1 α y CXCL13 mediante microscopía confocal, confirmando que hay

un aumento de HIF-1 α y CXCL13 en las células PC-3 tratadas con EDHB a una

disminución de la expresión de ambas proteínas en las células tratadas con 2-Me durante 24 h. Sin embargo, llama la atención que la expresión de HIF-1 α es preferentemente citoplasmática, lo cual indicaría que no hay translocación al núcleo y por lo tanto no es consistente con el aumento de CXCL13. Consideramos que esto pueda deberse a que al translocarse al núcleo la subunidad HIF-1 α , que se sabe forma un heterodímero con la subunidad HIF-1 β (que se encuentra constitutivamente expresada en el núcleo), la unión pudiera estar enmascarando el epítipo que es reconocido por el anticuerpo anti-HIF-1 α , que fue utilizado para los ensayos de microscopia confocal ya que se trata de un anticuerpo monoclonal. Esta consideración se basa en los resultados que obtuvimos en los ensayos de inmunocitoquímica, en donde se observó una clara expresión de HIF-1 α a nivel nuclear, en estos ensayos se utilizó un anticuerpo anti-HIF-1 α policlonal. Sin embargo, se requieren de más estudios para poder demostrar lo anterior. Lo que sí es claro, es que la modulación farmacológica de la expresión de HIF-1 α afecta de manera directa la expresión de CXCL13, lo cual sugiere que este factor de transcripción participa de manera importante en la regulación de esta quimiocina.

Poco se sabe de la regulación transcripcional de CXCL13, existen trabajos en donde demuestran que CXCL13 es un gen blanco de NF- κ B, por esta razón se puede pensar que el efecto de la modulación de HIF-1 α en la expresión de CXCL13 podría ser de manera indirecta en donde este participando la vía alternativa de NF- κ B [72]. Para demostrar la participación directa de HIF-1 α en la regulación de la expresión de CXCL13, se realizaron ensayos de mutación sitio dirigida con un plásmido reportero y de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) observando que los ensayos de plásmidos reporteros y mutación sitio dirigida demostraron que el sitio -447 (-ACGTG-

inducir la expresión de CXCL13. Sin embargo, los ensayos de ChiP mostraron que este factor de transcripción se une a los tres sitios putativos (-47, -447 y -678). Esto demuestra que HIF-1 α está participando de manera importante y directa en la regulación transcripcional de CXCL13.

CXCL13 es una quimiocina de gran importancia en la formación de la zona de B del ganglio linfático, la cual se encarga de atraer a los linfocitos B que están expresando el único receptor de la quimiocina, CXCR5. Se ha observado que en el microambiente tumoral de las neoplasias de células B, se encuentran diferentes poblaciones de células estromales que favorecen la supervivencia de las células malignas, entre ellas varios subconjuntos de células T, que promueven la progresión de la enfermedad, células T que ejercen un efecto anti-tumoral y células endoteliales que organizan microvasos neo-angiogénicos [82]. Por lo que, la participación de quimiocinas como CXCL13 y el receptor CXCR5 pudieran estar participando en la linfomagénesis de B. Poco se sabe de la participación de HIF-1 α y CXCL13 en los LNH. Se han realizado estudios en pacientes adultos [83], sin embargo no hay estudios del LNH en edad pediátrica, en donde encontramos que el LNH es la segunda o tercera causa de cáncer en la población infantil, dependiendo de la zona en estudio. Por lo que en este trabajo evaluamos la expresión de HIF-1 α y CXCL13 *in vitro* en una línea celular de linfoma de Burkitt (células Ramos) y en células Ramos que mostraron una mayor expresión de HIF-1 α inducida por el tratamiento con EDHB (RsRs). Se evaluó la expresión de las proteínas mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo. Los resultados demostraron que la regulación de CXCL13 mediada por HIF-1 α también se lleva a cabo en células de LNH. Lo anterior puede ser relevante en la formación del ganglio linfático [9]. Por ello investigamos la expresión de estas proteínas en biopsias de pacientes pediátricos con LNH. Se determinó la expresión de HIF-1 α y CXCL13 en 35 biopsias

de pacientes pediátricos con LNH mediante un microarreglo de tejidos y el análisis mediante patología digital, encontrándose que en los linfomas de subtipo histológico más agresivos (LCG), HIF-1 α se encontró mayormente expresado en comparación con los subtipos menos agresivos, ésta diferencia es estadísticamente significativa. Sin embargo, la expresión de CXCL13 a pesar de que existe una tendencia a ser mayor en los subtipos más agresivos, no muestra significancia estadística. Nuestros resultados demuestran por primera vez que existe una mayor expresión de HIF-1 α en uno de los subtipos más agresivos de LNH pediátrico y sugieren la participación de este factor de transcripción en la fisiopatogénesis de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Este trabajo demuestra por primera vez la participación directa de HIF-1 α en la regulación transcripcional de CXCL13 y sugiere una posible implicación en la fisiopatogénesis de LNH pediátrico.

La regulación positiva y negativa de la actividad de HIF-1 α correlaciona positivamente con la expresión de CXCL13 tanto en modelos de estudio con LNH, como en pacientes de alto riesgo. Las estrategias de clonación y mutación sitio dirigida demuestran la unión relevante en el sitio –ACGTG– en el promotor de CXCL13, el cual es el sitio mayormente estudiado y al cual se le ha denominado elemento de respuesta a hipoxia o HRE. Se encontró que la expresión de HIF-1 α es mayor en los LNH de mayor agresividad con respecto a los de menor agresividad. Lo cual sugiere que este factor de transcripción participa de manera importante en la fisiopatogénesis del LNH pediátricos.

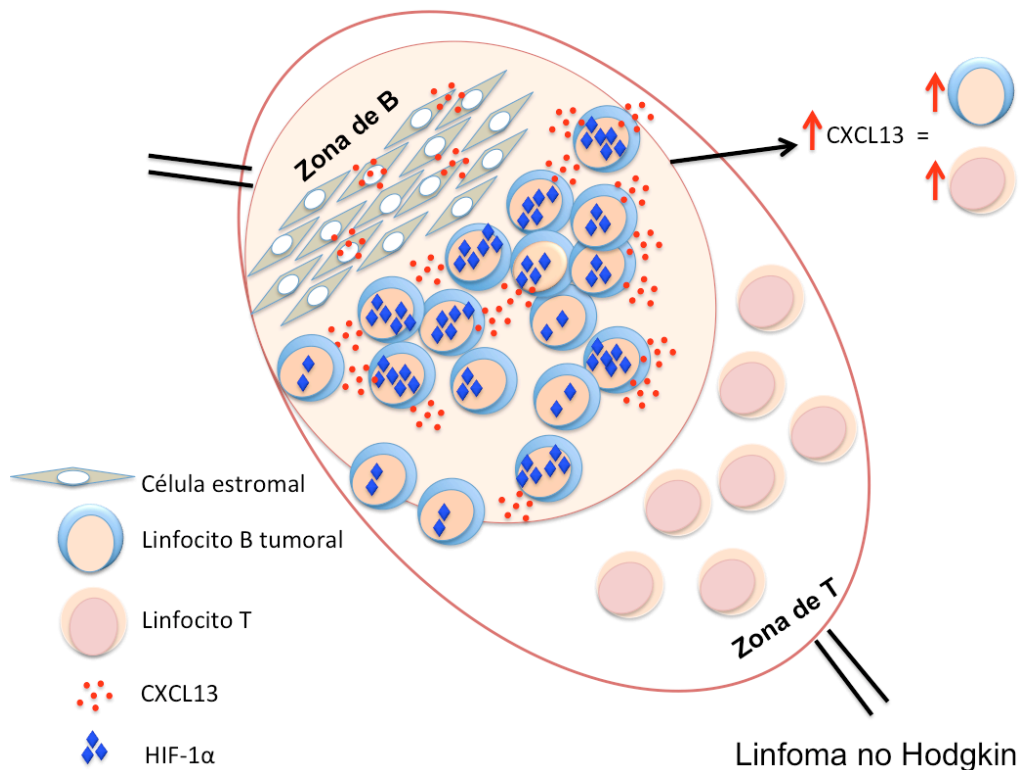


Figura 19 Modelo propuesto de la participación de HIF-1 α y CXCL13 en el LNH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sabattini, E., et al., *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview*. Pathologica, 2010. **102**(3): p. 83-7.
2. Juarez-Ocana, S., et al., *Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996-2001)*. BMC Cancer, 2004. **4**: p. 50.
3. Vachani, A., et al., *A 10-gene classifier for distinguishing head and neck squamous cell carcinoma and lung squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(10): p. 2905-15.
4. Hochberg, J., et al., *Adolescent non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin lymphoma: state of the science*. Br J Haematol, 2009. **144**(1): p. 24-40.
5. Barone, F., et al., *CXCL13, CCL21, and CXCL12 expression in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome and MALT lymphoma: association with reactive and malignant areas of lymphoid organization*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 5130-40.
6. Lopez-Giral, S., et al., *Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 462-71.
7. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 309-14.
8. Burkle, A., et al., *Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3316-25.

9. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen.* Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
10. Legler, D.F., et al., *B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5.* J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 655-60.
11. Pugh, C.W., *Oxygen sensing in cancer.* Ann Med, 2003. **35**(6): p. 380-90.
12. Wenger, R.H., *Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression.* FASEB J, 2002. **16**(10): p. 1151-62.
13. Zhong, H., et al., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases.* Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
14. Fang, H.Y., et al., *Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia.* Blood, 2009. **114**(4): p. 844-59.
15. Fajardo-Gutierrez, A., et al., *Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study).* BMC Cancer, 2007. **7**: p. 68.
16. Thomas, R.K., et al., *Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma.* Ann Oncol, 2002. **13 Suppl 4**: p. 147-52.
17. Ansell, S.M. and J. Armitage, *Non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and treatment.* Mayo Clin Proc, 2005. **80**(8): p. 1087-97.
18. Reiter, A., *Diagnosis and treatment of childhood non-hodgkin lymphoma.* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 285-96.

19. Harris, N.L., et al., *A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group*. *Blood*, 1994. **84**(5): p. 1361-92.
20. Kelly, D.R., et al., *A morphologic study of childhood lymphoma of the undifferentiated type. The Pediatric Oncology Group experience*. *Cancer*, 1987. **59**(6): p. 1132-7.
21. Carbone, A., et al., *AIDS-related Burkitt's lymphoma. Morphologic and immunophenotypic study of biopsy specimens*. *Am J Clin Pathol*, 1995. **103**(5): p. 561-7.
22. Bouffet, E., et al., *Burkitt's lymphoma: a model for clinical oncology*. *Eur J Cancer*, 1991. **27**(4): p. 504-9.
23. Young, S.A. and D.W. Crocker, *Burkitt's lymphoma in a child with AIDS*. *Pediatr Pathol*, 1991. **11**(1): p. 115-22.
24. Griffith, R.C., et al., *A morphologic study of childhood lymphoma of the lymphoblastic type. The pediatric Oncology Group experience*. *Cancer*, 1987. **59**(6): p. 1126-31.
25. Ozdemirli, M., et al., *Precursor B-Lymphoblastic lymphoma presenting as a solitary bone tumor and mimicking Ewing's sarcoma: a report of four cases and review of the literature*. *Am J Surg Pathol*, 1998. **22**(7): p. 795-804.
26. Nathwani, B.N., H. Kim, and H. Rappaport, *Malignant lymphoma, lymphoblastic*. *Cancer*, 1976. **38**(2): p. 964-83.
27. Zhao, X.F., et al., *Pediatric primary bone lymphoma-diffuse large B-cell lymphoma: morphologic and immunohistochemical characteristics of 10 cases*. *Am J Clin Pathol*, 2007. **127**(1): p. 47-54.

28. Armitage, J.O. and D.D. Weisenburger, *New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project.* J Clin Oncol, 1998. **16**(8): p. 2780-95.
29. Le Deley, M.C., et al., *Prognostic factors in childhood anaplastic large cell lymphoma: results of a large European intergroup study.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1560-6.
30. McCune, R.C., S.I. Syrbu, and M.A. Vasef, *Expression profiling of transcription factors Pax-5, Oct-1, Oct-2, BOB.1, and PU.1 in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas: a comparative study using high throughput tissue microarrays.* Mod Pathol, 2006. **19**(7): p. 1010-8.
31. Vaupel, P., *The role of hypoxia-induced factors in tumor progression.* Oncologist, 2004. **9 Suppl 5**: p. 10-7.
32. Majmundar, A.J., W.J. Wong, and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress.* Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 294-309.
33. Wenger, R.H., D.P. Stiehl, and G. Camenisch, *Integration of oxygen signaling at the consensus HRE.* Sci STKE, 2005. **2005**(306): p. re12.
34. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5680-4.
35. Jiang, B.H., et al., *Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1.* J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17771-8.
36. Jiang, B.H., et al., *Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension.* J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19253-60.

37. Moroz, E., et al., *Real-time imaging of HIF-1alpha stabilization and degradation*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5077.
38. Shi, Y.H. and W.G. Fang, *Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(8): p. 1082-7.
39. Bruick, R.K. and S.L. McKnight, *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1337-40.
40. Kallio, P.J., et al., *Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6573-86.
41. Seta, K.A., et al., *Responding to hypoxia: lessons from a model cell line*. Sci STKE, 2002. **2002**(146): p. re11.
42. Richard, D.E., et al., *p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32631-7.
43. Brader, S. and S.A. Eccles, *Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in tumor progression, invasion and angiogenesis*. Tumori, 2004. **90**(1): p. 2-8.
44. Zundel, W., et al., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression*. Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 391-6.
45. Maxwell, P.H., C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe, *Activation of the HIF pathway in cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(3): p. 293-9.
46. Sang, N., et al., *MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14013-9.
47. Liao, D. and R.S. Johnson, *Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(2): p. 281-90.

48. Ryan, H.E., J. Lo, and R.S. Johnson, *HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 3005-15.
49. Kotch, L.E., et al., *Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death*. Dev Biol, 1999. **209**(2): p. 254-67.
50. Kojima, H., M.V. Sitkovsky, and M. Cascalho, *HIF-1 alpha deficiency perturbs T and B cell functions*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(23): p. 1827-32.
51. Semenza, G.L., *Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2000. **35**(2): p. 71-103.
52. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625-34.
53. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(4): p. 207-14.
54. Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease*. Pediatr Res, 2001. **49**(5): p. 614-7.
55. Stewart, M., et al., *Expression of angiogenic factors and hypoxia inducible factors HIF 1, HIF 2 and CA IX in non-Hodgkin's lymphoma*. Histopathology, 2002. **40**(3): p. 253-60.
56. Evens, A.M., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP*. J Clin Oncol, 2010. **28**(6): p. 1017-24.
57. Wang, Y., et al., *Targeting HIF1alpha eliminates cancer stem cells in hematological malignancies*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(4): p. 399-411.
58. Marzec, M., et al., *Oncogenic kinase NPM/ALK induces expression of HIF1alpha mRNA*. Oncogene, 2011. **30**(11): p. 1372-8.

59. Piovan, E., et al., *Differential regulation of hypoxia-induced CXCR4 triggering during B-cell development and lymphomagenesis*. *Cancer Res*, 2007. **67**(18): p. 8605-14.
60. Maxwell, P.J., et al., *HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells*. *Oncogene*, 2007. **26**(52): p. 7333-45.
61. Mojsilovic-Petrovic, J., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes*. *J Neuroinflammation*, 2007. **4**: p. 12.
62. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2002. **42**: p. 469-99.
63. Kiefer, F. and A.F. Siekmann, *The role of chemokines and their receptors in angiogenesis*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(17): p. 2811-30.
64. Zlotnik, A., A.M. Burkhardt, and B. Homey, *Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(9): p. 597-606.
65. Muller, G., et al., *Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors*. *J Leukoc Biol*, 2002. **72**(1): p. 1-8.
66. Drayton, D.L., et al., *Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(4): p. 344-53.
67. Gunn, M.D., et al., *A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1*. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 799-803.
68. Cyster, J.G., et al., *Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles*. *Immunol Rev*, 2000. **176**: p. 181-93.

69. Mazzucchelli, L., et al., *BCA-1 is highly expressed in Helicobacter pylori-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma*. J Clin Invest, 1999. **104**(10): p. R49-54.
70. Arai, J., et al., *Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1*. Eur J Haematol, 2000. **64**(5): p. 323-32.
71. Husson, H., et al., *CXCL13 (BCA-1) is produced by follicular lymphoma cells: role in the accumulation of malignant B cells*. Br J Haematol, 2002. **119**(2): p. 492-5.
72. Britanova, L.V. and D.V. Kuprash, *[New putative control elements in the promoter OF CXCL13 chemokine gene, a target of alternative NF-kappaB pathway]*. Mol Biol (Mosk), 2009. **43**(4): p. 657-65.
73. Teitell, M., et al., *TCL1 oncogene expression in AIDS-related lymphomas and lymphoid tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9809-14.
74. Grogg, K.L., et al., *Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified*. Mod Pathol, 2006. **19**(8): p. 1101-7.
75. Tun, H.W., et al., *Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma*. Blood, 2008. **111**(6): p. 3200-10.
76. Chunsong, H., et al., *CXC chemokine ligand 13 and CC chemokine ligand 19 cooperatively render resistance to apoptosis in B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia CD23+CD5+ B cells*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6713-22.

77. Carbonaro, M., A. O'Brate, and P. Giannakakou, *Microtubule disruption targets HIF-1alpha mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression*. J Cell Biol, 2011. **192**(1): p. 83-99.
78. Escuin, D., E.R. Kline, and P. Giannakakou, *Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1alpha accumulation and activity by disrupting microtubule function*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 9021-8.
79. Carbonaro, M., et al., *Microtubules regulate hypoxia-inducible factor-1alpha protein trafficking and activity: implications for taxane therapy*. J Biol Chem, 2012. **287**(15): p. 11859-69.
80. Majamaa, K., et al., *The 2-oxoglutarate binding site of prolyl 4-hydroxylase. Identification of distinct subsites and evidence for 2-oxoglutarate decarboxylation in a ligand reaction at the enzyme-bound ferrous ion*. Eur J Biochem, 1984. **138**(2): p. 239-45.
81. Kivirikko, K.I. and K. Majamaa, *Synthesis of collagen: chemical regulation of post-translational events*. Ciba Found Symp, 1985. **114**: p. 34-64.
82. Burger, J.A., et al., *The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies*. Blood, 2009. **114**(16): p. 3367-75.
83. Giatromanolaki, A., et al., *Phosphorylated VEGFR2/KDR receptors are widely expressed in B-cell non-Hodgkin's lymphomas and correlate with hypoxia inducible factor activation*. Hematol Oncol, 2008. **26**(4): p. 219-24.

Libro de texto

Rivera Luna R. Rutas Críticas en la Evaluación y Tratamiento de Cáncer en Niños. México, Editores de Textos Mexicanos, 2008.