



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

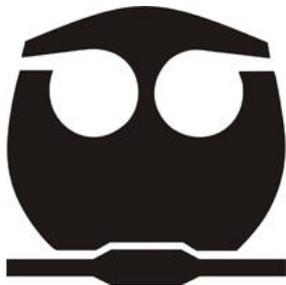
**LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HMGB1
EN CARCINOMAS PULMONARES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

VERÓNICA ROJO LEÓN



MÉXICO, D.F.

AÑO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: José Sullivan López González**

VOCAL: **Profesor: Ana Esther Aguilar Cárdenas**

SECRETARIO: **Profesor: Enrique Ortega Soto**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Jorge Fernando Paniagua Solís**

2° SUPLENTE: **Profesor: Mónica Berenice Heras Chavarría**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR,
DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS, UNIDAD DE
INVESTIGACIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL
COSIO VILLEGAS**

ASESOR DEL TEMA: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

SUPERVISOR TÉCNICO: DOLORES AGUILAR CÁZARES

SUSTENTANTE: VERÓNICA ROJO LEÓN

Dedicatorias

A mi familia...

Este trabajo se lo dedico a las personas más importantes en mi vida, mi mamá Benita Rojo, mi abuelita Manuela y mis hermanos Javier, Miguel y Fernanda.

... Gracias

"El amor es la fuerza más humilde, pero
la más poderosa de que dispone el mundo."
Mahatma Gandhi

Agradecimientos

A mi mamá, abuelita y hermanos, por TODO el apoyo y cariño que siempre me han brindado. Gracias por estar siempre conmigo. Mama y Javier, les agradezco el esfuerzo que han realizado para que cada uno de los proyectos de mi vida se pudiera realizar.

A la M en C. Dolores A, gracias por los consejos, conocimientos transmitidos y el apoyo, en todos los aspectos, para poder concluir este trabajo, porque también es tuyo. Al Dr. Sullivan L, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por el tiempo dedicado y por transmitirme parte de sus conocimientos.

A mis compañeros del laboratorio, Angeles C, Paty R, Susana G, Heriberto P Manuel M y Osvaldo G, por enriquecer este trabajo con sus comentarios. En especial agradezco a Manuel por el apoyo técnico.

A mis amigos: Ana P, Bertha Z, Ileana A, Sarahi R, Narethzy D, Patty L, Jovani V, Edder F y Rafael F, gracias por su amistad, su apoyo, confianza y por compartir tantos momentos juntos, dentro y fuera de la facultad. A mis amigos que encontré en el camino, Andrea M, Ingrid de la P, Marisol J, Flor S y Marco A, gracias por su amistad. Siempre les tendré un cariño muy especial a aquellos que fueron y siguen siendo una parte muy importante en mi vida.

No podían faltar los amigos que he encontrado en el laboratorio, Eréndira P, Edith B, Liliana S, Norma S, Lorenzo I, y Rodolfo S, gracias por su compañía, apoyo y consejos; jamás olvidaré los momentos que ocurrieron dentro y fuera del laboratorio.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER.....	3
1.2 CÁNCER PULMONAR.....	4
1.2.1 Factores de riesgo	5
1.2.2 Tipos histológicos del cáncer pulmonar	6
1.2.2.1 Adenocarcinoma pulmonar	7
1.2.2.2 Carcinoma de células escamosas	7
1.2.2.3 Carcinoma pulmonar de células grandes.....	8
1.2.2.4 Carcinoma pulmonar de células pequeñas.....	8
1.3 RESPUESTA INMUNE Y CÁNCER.....	8
1.3.1 Respuesta inmune antitumoral.....	9
1.3.2 Modelo de daño.	12
1.4 HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1).....	15
1.4.1 Estructura de HMGB1	15
1.4.2 Función biológica de HMGB1.....	16
1.4.3 Liberación de HMGB1	18
1.4.3.1 Liberación pasiva	18
1.4.3.2 Liberación activa	18
1.4.4 Receptores y señalización de HMGB1.....	20
2. ANTECEDENTES	22
2.1 Expresión de HMGB1 en cáncer.....	22
2.2 Localización subcelular y secreción de HMGB1	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO	29

6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO	30
6.1.1 Cortes histológicos.....	30
6.2 INMUNOHISTOQUÍMICA	30
6.2.1 Observación de la distribución de HMGB1	31
6.3 CULTIVO CELULAR	31
6.4 INMUNOFLUORESCENCIA	32
6.5 WESTERN BLOT	32
6.5.1 Obtención de extractos celulares.....	32
6.5.2 Aislamiento de microvesículas derivadas de células tumorales (tMVs)	33
6.5.3 Western blot de las fracciones celulares y tMVs.....	33
7. RESULTADOS	35
7.1 Distribución de HMGB1 en epitelio pulmonar normal, en epitelio pulmonar adyacente al tumor y en adenocarcinomas	35
7.2 Distribución de HMGB1 en líneas celulares de adenocarcinomas pulmonares	39
7.3 HMGB1 liberada en tMVs por la línea 1.3.15.....	41
8. DISCUSIÓN	43
9. CONCLUSIONES	47
10. BIBLIOGRAFÍA	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

La proliferación y diferenciación en las células están basadas en mecanismos complejos de comunicación intercelular. Los mecanismos que le permiten a las células reconocer a las de su misma estirpe, que limitan su expansión hacia sitios poblados por distintas células, que les indican cuándo dividirse o diferenciarse para llevar a cabo funciones especializadas, están sumamente controlados y se ha demostrado que la pérdida en el control de dichos mecanismos se asocia al desarrollo del cáncer ^{[1][2]}.

El cáncer es considerado una enfermedad genética caracterizada por la proliferación celular descontrolada que resulta de la acumulación de alteraciones (mutaciones puntuales, deleciones, translocaciones cromosómicas o inserciones de genes víricos) que conducen a: I) pérdida de función de genes supresores de tumores, II) activación de oncogenes, III) desregulación de la apoptosis, IV) angiogénesis sostenida e V) invasión a otros tejidos ^{[3][4]}. Sin embargo, para el desarrollo del cáncer se requiere que de forma continua y acumulativa se presenten múltiples cambios genéticos y epigenéticos que conduzcan a la transformación de una célula con fenotipo normal a adquirir un fenotipo maligno. Este proceso de transformación celular, llamado carcinogénesis, generalmente lleva años para su desarrollo y para su estudio se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión ^{[3][4][5]}.

La etapa de *iniciación* comienza cuando se presentan alteraciones o mutaciones en el material genético de una célula (célula iniciada) que forma parte de un tejido. Las alteraciones son el resultado de la actividad genotóxica de un agente carcinogénico (agente químico, físico o biológico) y ocasionan mutaciones en genes que están implicados en mantener la viabilidad celular y el control del ciclo celular como: protooncogenes y genes supresores de tumores, ^{[4][5][6]}. Algunos protooncogenes regulan los procesos de división celular y cuando se encuentran mutados favorecen la sobreexpresión de moléculas que estimulan la división celular. Por otra parte, los genes supresores de tumores se oponen a la proliferación celular desmedida al

regular los puntos de control del ciclo celular e iniciar el proceso de apoptosis cuando es requerido. Cuando los genes supresores están mutados, se inactivan y pierden su función, por lo tanto, conducen a que la célula no pueda responder a los sistemas de control del ciclo. Las mutaciones en ambos procesos provocan que la célula transformada no inicie el proceso de apoptosis, lo que favorece la proliferación celular incontrolada asociada al cáncer. Las alteraciones producidas en esta etapa son irreversibles, persistentes y transmisibles a las células hijas ^{[4][5]}.

La *promoción* es una etapa reversible que es modulada continuamente por factores del medio externo y es caracterizada por la multiplicación selectiva de las células iniciadas ^[4]. Durante esta etapa se requiere de la presencia continua del mismo u otro agente carcinógeno (agente promotor), que al actuar sobre las células iniciadas favorece que las células adquieran nuevas alteraciones genéticas que finalmente darán origen a una población de células precancerosas heterogéneas. Para el desarrollo de esta etapa se requiere en un periodo largo (años) ^{[5][7]}.

La transformación en lesiones malignas es la última etapa y se conoce como *progresión*. En esta etapa, el número de células malignas está aumentado, las células presentan alteraciones de forma, tamaño y función, además poseen la capacidad de invadir tejidos aledaños que dan lugar a tumores malignos. En sí, el proceso es una combinación de mutación y selección, donde la mutación se da de manera aleatoria, mientras que la selección favorece el crecimiento de aquellas células con mayor autonomía, ya que no dependen en su totalidad de las señales del microambiente para proliferar ^{[4][5][7]}.

1.2 CÁNCER PULMONAR

El cáncer pulmonar, por su alta mortalidad, se ha convertido en un importante problema de salud pública a nivel mundial. En el año 2002 se registraron en el mundo 1.35 millones de casos nuevos de cáncer pulmonar, que representó el 12.4% del total de casos y 1.18 millones de muertes por esta enfermedad, representando el 17.6% del total de muertes en todo el mundo ^{[8][9]}.

En México, en el periodo de 1998-2004, el cáncer pulmonar también representó la principal causa de muerte por neoplasias malignas en varones y se ha incrementado el número de muertes en mujeres ^{[9][10]}.

1.2.1 Factores de riesgo

Los estudios epidemiológicos han identificado diversos factores que de forma aislada, aditiva o sinérgica, lesionan el epitelio respiratorio. Dentro de los factores ambientales asociados al desarrollo del cáncer pulmonar se incluye: el tabaquismo (activo o pasivo), la exposición al radón, al humo de leña o carbón, asbestos y metales pesados ^{[8][11]}. Además de los factores ambientales, los factores genéticos también contribuyen a la susceptibilidad del cáncer pulmonar. En este contexto, los polimorfismos genéticos que reducen la actividad de enzimas como la glutatión S transferasa, encargadas de la detoxificación, o que incrementan la actividad de la familia de enzimas del citocromo P450 que activan los carcinógenos derivados del tabaco y los polimorfismos en genes involucrados en la capacidad de reparar el ADN, como los sistemas de reparación por escisión de bases o nucleótidos, son factores adicionales que incrementan el riesgo a desarrollar cáncer ^{[8][11][12]}. Sin embargo, de todos ellos, el principal factor de riesgo implicado en el desarrollo del cáncer pulmonar es el tabaquismo, incrementando en un 80-90% el riesgo en fumadores ^{[11][13]}.

La razón por la que el tabaquismo es el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer pulmonar se debe a que el humo del cigarro contiene alrededor de 60 compuestos considerados carcinogénicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (del inglés, PAHs), las N-nitrosaminas y las aminas aromáticas. Los carcinógenos que se han relacionado directamente al cáncer pulmonar son: el benzo[a]pireno y la nitrosamina 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona también conocida como nitrosaminocetona derivada de la nicotina (NNK) ^[12].

Estos compuestos derivados del humo del cigarro, son absorbidos y biotransformados por los procesos de detoxificación para ser eliminados del organismo. Sin embargo, durante este proceso, los carcinógenos son activados

metabólicamente (por las enzimas del citocromo P450) para convertirse en intermediarios o metabolitos altamente reactivos con la capacidad de reaccionar con el ADN y formar productos enlazados covalentemente con el ADN, llamados aductos.

Los aductos inducen una mutación, generalmente la transversión G por T, que puede, en algunos casos, ser reparada, llevar a la célula a apoptosis o bien persistir. Si las mutaciones persisten, conducen a errores de codificación de genes como ras o p53 y eventualmente pueden conducir al desarrollo del cáncer ^{[8][11][12]} (Figura 1).

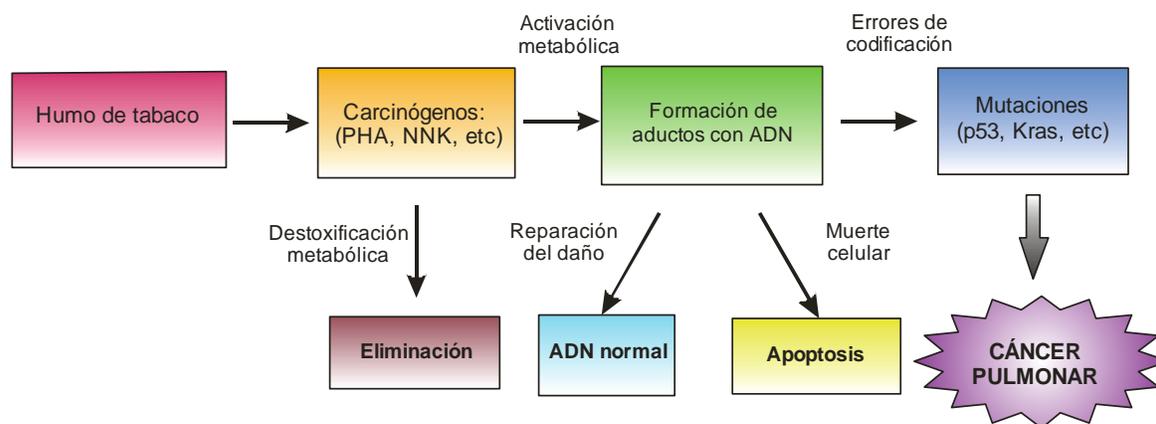


Figura 1. Carcinógenos del tabaco y patogénesis del carcinoma pulmonar. Adaptado de Minna J et al [8]

1.2.2 Tipos histológicos del cáncer pulmonar

La clasificación de los carcinomas pulmonares propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basa en las características histológicas de los tumores observadas principalmente por microscopía de luz. En base a estas características, los carcinomas pulmonares se han clasificado en dos grupos: carcinoma pulmonar de células pequeñas (del inglés, small cell lung cancer, SCLC) y carcinoma pulmonar de células no pequeñas (del inglés, non-small-cell lung cancer, NSCLC) ^[15].

El grupo de NSCLC representa el 85% de todos los casos de carcinomas pulmonares y está compuesto por un grupo heterogéneo de carcinomas, incluidos el adenocarcinoma pulmonar, carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células grandes ^{[15][16]}.

1.2.2.1 Adenocarcinoma pulmonar

El adenocarcinoma es la forma más común de carcinoma pulmonar en el mundo y representa el 40% de todos los casos de cáncer de pulmón.

De acuerdo a la clasificación de la OMS, los adenocarcinomas pueden ser clasificados en cinco subtipos: acinar, papilar, bronquioloalveolar (BAC), adenocarcinoma sólido con formación de mucina y adenocarcinoma mixto ^{[15][17]}. Los adenocarcinomas suelen ser muy heterogéneos, presentando dos o más subtipos histológicos en un mismo caso, pero la formación de glándulas y producción de mucina (intra o extracelular) son características que distinguen histológicamente al adenocarcinoma de otros tipos de carcinomas. Su localización es en zonas periféricas del pulmón, sitios centrales o endobronquiales, es decir, en bronquios pequeños y bronquiolos ^{[17][18]}. Además, de acuerdo al grado de diferenciación histológica, los adenocarcinomas pueden ser bien, moderadamente y pobremente diferenciados. El término "diferenciado" describe hasta que punto las células neoplásicas se asemejan a las células normales del tejido que le dieron origen, tanto morfológica como funcionalmente ^[17]. Con base a lo anterior, los tumores acinar y papilar pueden ser bien, moderadamente y pobremente diferenciados, el patrón del BAC es usualmente bien diferenciado, mientras que el adenocarcinoma sólido es, por definición, pobremente diferenciado ^[15].

1.2.2.2 Carcinoma de células escamosas

El carcinoma de células escamosas, también llamado carcinoma epidermoide, es el segundo tipo histológico más frecuente del cáncer pulmonar y representa el 30% de todos los casos. Histológicamente se caracteriza por presentar queratinización de células tumorales con formación de perlas de queratina y puentes intercelulares, estas características son observadas cuando el carcinoma es bien diferenciado, pero son difíciles de observar en los tumores pobremente diferenciados ^{[15][17]}. Sin embargo, las células escamosas no están presentes normalmente en el epitelio respiratorio (la transformación resulta de la exposición al humo del cigarro). La mayoría de los carcinomas epidermoides (alrededor del 70%) se presentan como

tumores centrales y frecuentemente se localizan en los bronquios principales o en ramas mayores, la consecuencia de la formación de una masa tumoral en esta zona comúnmente es la obstrucción del lumen bronquial ^[17].

1.2.2.3 Carcinoma pulmonar de células grandes

El carcinoma de células grandes es un carcinoma desdiferenciado y es diagnosticado por exclusión debido a que no presenta las características histológicas del carcinoma epidermoide, adenocarcinoma o SCLC. Representa alrededor del 9% de todos los cánceres pulmonares y su morfología es caracterizada por células tumorales grandes con abundante citoplasma, núcleos alargados y nucléolos prominentes. Generalmente los tumores son de localización periférica e invaden la víscera pleural, cavidad torácica o estructuras adyacentes ^{[15][17]}.

1.2.2.4 Carcinoma pulmonar de células pequeñas

El carcinoma de células pequeñas ocurre con una frecuencia del 15% entre todos los cánceres de pulmón. Los SCLCs típicamente son de localización peribronquial y se caracterizan por tener células epiteliales pequeñas con cromatina finamente granular, un tamaño aproximado de 24 μm y en ellas la mitosis ocurre frecuentemente. Por ello, estas células crecen más rápido e invaden rápida y extensamente la pared bronquial y el parénquima adyacente. Comúnmente este tipo de tumor se disemina de manera temprana por vía linfática y sanguínea. Por su capacidad metastásica temprana, los tumores de las células pequeñas son los de peor pronóstico entre los carcinomas pulmonares ^{[15][17]}.

1.3 RESPUESTA INMUNE Y CÁNCER

La principal función del sistema inmunológico es proteger al organismo de patógenos infecciosos provenientes del medio ambiente y de la formación de células alteradas o transformadas (células infectadas o tumorales). Para ello, la respuesta inmune utiliza complejos mecanismos de protección formados por un conjunto de células y moléculas que funcionan de forma cooperativa para controlar y eliminar la infección ^{[19][20]}.

En general, la respuesta inmune se ha dividido en *respuesta inmune innata* y *respuesta inmune adaptativa*. La respuesta inmune innata se considera la primera línea de defensa del organismo, debido a que las células que la integran están preparadas para actuar con rapidez ante una infección y sus principales componentes son: barreras físicas y químicas, factores solubles como proteínas del complemento y células como granulocitos, macrófagos (MØs), células dendríticas (DCs) y células asesinas naturales (NK). Por otro lado, la función de la inmunidad adaptativa es aumentar en magnitud y capacidad la respuesta inmune del organismo y lo realiza a través de los linfocitos B y T. Los linfocitos T, a su vez, se dividen en linfocitos TCD4⁺ o T cooperadores (T_H) y TCD8⁺ o T citotóxicos (CTL) ^{[19][20][21]}.

1.3.1 Respuesta inmune antitumoral

Las células efectoras del sistema inmune tienen la capacidad de reconocer a células tumorales y actuar mediante diversos mecanismos para matar a dichas células. Sin embargo, la eliminación de las células tumorales representa únicamente una parte de la compleja relación entre el sistema inmune y el desarrollo del cáncer ^{[22][23][24]}.

El reconocimiento de las células transformadas inicia cuando las células del sistema inmune innato son alertadas del crecimiento del tumor ^{[25][26]}. Una forma de iniciar la respuesta antitumoral es que las células tumorales expresen, debido al proceso de transformación celular, antígenos tumorales (TAs) en la superficie de su membrana celular para ser reconocidos por las células del sistema inmune innato y que éstas lleven a cabo su función efectora. La segunda posibilidad es la propuesta en el “modelo de daño”, la cual considera que debido a la remodelación del estroma, causado por daño o estrés celular, las células tumorales liberan señales de peligro que alertan y reclutan células del sistema inmune en la zona donde se desarrolla el tumor. Finalmente, las dos posibilidades conducen a la activación de células NK, MØs, DCs y linfocitos T para la eliminación del tumor ^{[25][26]}.

Células NK. La activación de las células NK está regulada por un equilibrio entre las señales generadas por los receptores de activación e inhibición. Los receptores de inhibición reconocen las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (del

inglés, MHC) de clase I que se expresan normalmente y de forma constitutiva en las células sanas. Cuando ambos receptores, inhibidores y activadores, están unidos a su ligando, domina la influencia de los inhibidores y las células NK no se activan [25][27]. En cambio, cuando las células pierden o alteran la expresión de las moléculas del MHC de clase I, un evento que ocurre durante el proceso de carcinogénesis, dominan los ligandos activadores y las células NK se activan y llevan cabo su función efectora induciendo la muerte por apoptosis en la célula blanco. Los receptores de activación reconocen moléculas similares a las moléculas de clase I que pueden expresarse únicamente en células sometidas a estrés o en células transformadas, por ejemplo, las moléculas MICA y MICB que son ligandos de receptor NKG2D y cuando se da la interacción ligando-receptor, las células NK se activan y eliminan a las células tumorales empleando granzimas/perforinas o a través de los receptores de muerte como Fas/FasL provocando la apoptosis de las células; además, durante su activación, las células NK producen citocinas como el IFN- γ que ayudan a la posterior activación de otras células inmunes (MØs y linfocitos T) [25][26].

Células presentadoras de antígeno profesionales (APCs). Las APCs tienen un papel importante en el proceso de eliminación del tumor; capturan cuerpos apoptóticos y antígenos provenientes de células tumorales y los presentan a los linfocitos T. Las APCs involucradas en la respuesta antitumoral son los MØs y las DCs, sin embargo, las DCs son más eficaces para inducir la respuesta de los linfocitos T naïve [28].

Macrófagos (MØs). Para el reconocimiento y eliminación de las células tumorales, los MØs deben aumentar su metabolismo, movilidad, fagocitosis y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como: interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α etc., para activar la respuesta inflamatoria, reclutar células del sistema inmune y, posteriormente, eliminar células tumorales. La activación clásica de los MØs es favorecida por las citocinas presentes en el microambiente tumoral como la IL-12, el IFN- γ y el TNF- α , las cuales *l*) incrementan la capacidad fagocítica de los MØs para capturar e internalizar restos celulares y cuerpos apoptóticos (derivados de las células tumorales que murieron por la actividad citotóxica de las células NK) y sean

degradados en los lisosomas por enzimas proteolíticas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y *II*) inducen la producción de TNF- α que directamente provoca la muerte celular por apoptosis en las células tumorales ya que poseen el receptor del TNF- α (TNFR) ^{[24][25][28]}.

Células dendríticas (DCs). Las DCs participan en el inicio y regulación de la respuesta inmune antitumoral mediada por los linfocitos T y su función en este proceso consiste en: *I*) Fagocitar cuerpos apoptóticos derivados de células tumorales y migrar a los ganglios linfáticos. Durante este proceso, las DCs maduran (expresando moléculas de coestimulación como CD40, CD80/CD86) para ser más eficientes en la presentación de antígeno y la activación de linfocitos T; *II*) Procesar TAs, es decir, convertir proteínas en péptidos que serán asociados a las moléculas del MHC. Los antígenos proteicos que provienen de las células tumorales en apoptosis son capturados y procesados como antígenos exógenos por las DCs a través de la vía endocítica para ser asociados a las moléculas del MHC clase II y posteriormente ser presentados a los linfocitos TCD4⁺; por otro lado, estos antígenos exógenos también pueden asociarse a las moléculas de clase I, lo que ocurre cuando los péptidos son regurgitados del compartimento endosomal o cuando son desviados de la vía endocítica y son presentados a los linfocitos TCD8⁺ por la vía de procesamiento de las moléculas del MHC de clase I (presentación cruzada) ^[27] y *III*) Presentar péptidos asociados a las moléculas del MHC de clase II y clase I a los linfocitos TCD4⁺ y CD8⁺ naïve, respectivamente, en los ganglios linfáticos para activarlos ^{[24][25][26]}.

Linfocitos T. Los linfocitos T son las principales células del sistema inmune encargadas de eliminar a las células tumorales. Para su activación se requiere de la señal producida por la interacción del péptido asociado a las moléculas del MHC con el receptor de células T (TCR), la señal entre las moléculas de coestimulación CD28 en el linfocito T y CD80/CD86 en la APC y un microambiente propicio para su activación. Cuando los linfocitos TCD4⁺ y CD8⁺ son activados por las APCs se diferencian para realizar funciones especializadas, que dependerá de las citocinas presentes durante el proceso de activación; en el inicio de la respuesta antitumoral,

las citocinas presentes principalmente en el microambiente son la IL-12 y el IFN- γ , las cuales favorecen la diferenciación de los linfocitos T_{H0} o naïve a T_{H1} para producir citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ , que estimulan la activación de un mayor número de MØs, células NK y permiten la diferenciación de los linfocitos TCD8⁺ naïve a CTLs efectores que eliminan a las células tumorales empleando los mismos mecanismos citotóxicos que utilizan las células NK ^{[20][24][26]}.

Este proceso de reconocimiento y eliminación de las células tumorales debe ser continuo y debe repetirse cada vez que surjan nuevas células neoplásicas y para ello se requiere de la coordinación de todos los elementos del sistema inmune, de lo contrario, las células tumorales pueden continuar su progresión ^{[24][26]}.

1.3.2 Modelo de daño

En 1994 Matzinger propuso el modelo de daño y postuló que el sistema inmune también responde a la muerte celular inducida por daño o estrés ^[29]. Este modelo surgió porque el “modelo de lo extraño” de Janeway no explicaba la respuesta inmune que se genera en los trasplantes de tejidos y tumores, donde no hay un componente microbiano evidente (aunque en algunos casos, los microorganismos pueden ayudar a iniciar estas respuestas). En su modelo, Janeway propuso que el sistema inmune protege al organismo en contra de microorganismos y discrimina entre lo infeccioso y lo no infeccioso. Así, cuando las APCs reconocen moléculas altamente conservadas en los microorganismos, definidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), a través de los receptores de reconocimiento a patrones (PRRs) se inicia una respuesta inflamatoria. En cambio, Matzinger propuso que la muerte de las células anormales, como las células tumorales, conduce a la liberación de señales de daño o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), que al igual que los PAMPs, activan a las APCs a través de los PRRs y estimulan la respuesta inmune ^{[29][30]}.

Los DAMPs o alarminas son moléculas endógenas de origen no microbiano que en células vivas están localizados dentro de los compartimentos celulares cumpliendo una función intracelular definida; sin embargo, durante la muerte celular por necrosis,

la célula pierde la integridad de su membrana celular y como consecuencia se libera el contenido intracelular al medio extracelular (esto también puede ocurrir cuando las células apoptóticas no son eliminadas rápidamente). En el medio extracelular, los DAMPs son reconocidos por las APCs y funcionan como una señal de muerte celular para la activación del sistema inmune innato ^{[30][31][32]}.

Además, se ha observado que algunos DAMPs pueden ser secretados por las células del sistema inmune innato, por lo que se han descrito cuatro características que los definen: 1) Las señales de alarma son rápidamente liberadas después de la muerte por necrosis, pero no por apoptosis; 2) Las células del sistema inmune pueden producirlas y secretarlas, sin que esto implique su muerte; 3) Reclutan APCs e inducen la expresión de moléculas de coestimulación para favorecer su maduración y posteriormente promover la respuesta inmune adaptativa; 4) Por último, restablecen la homeostasis mediante la promoción de la reparación del tejido que fue destruido por los efectos de la inflamación ^[31] (Figura 2).

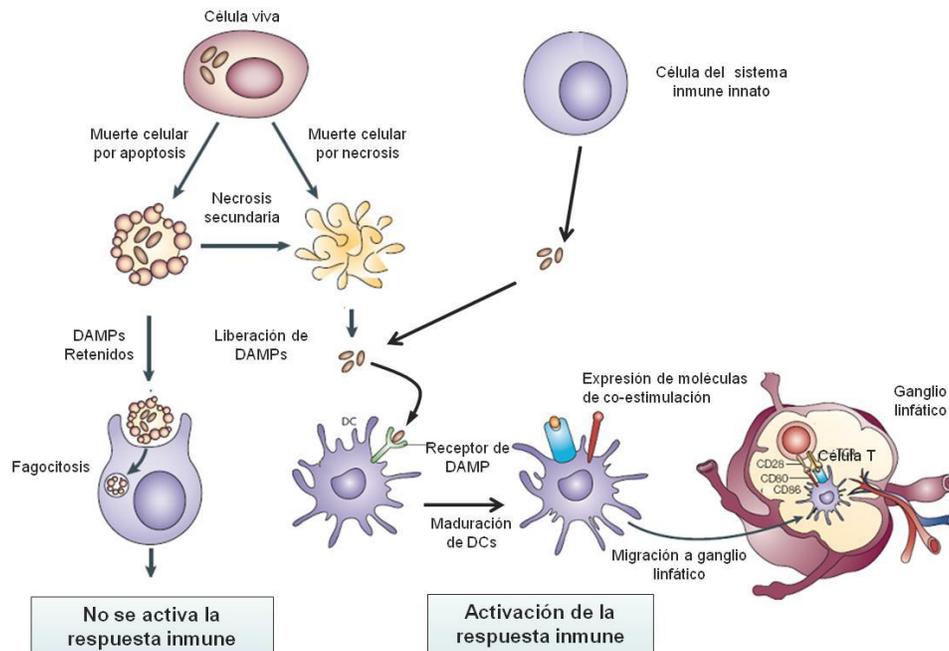


Figura 2. Los DAMPs son normalmente retenidos dentro de las células vivas, pero cuando son liberados, por necrosis o por células inmunes, son reconocidos por receptores presentes en las células de la inmunidad innata. En DCs, los DAMPs inducen la expresión de moléculas de coestimulación (CD80/CD86) y su maduración que favorece la presentación de antígenos con la posterior activación de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, cuando una célula muere por apoptosis, los DAMPs son retenidos dentro de los cuerpos apoptóticos que posteriormente serán fagocitados sin la activación de la respuesta inmune. Adaptado de Kono H et al [30].

Se ha estudiado la función que desempeñan los DAMPs en cáncer y se ha propuesto que pueden funcionar como moléculas adyuvantes capaces de iniciar una respuesta inmune antitumoral cuando son liberados por células tumorales que mueren en respuesta a un daño, como la muerte celular inducida por tratamientos con quimioterapia y radioterapia ^{[30][31][33]}. Sin embargo, cuando las células mueren, los DAMPs no sólo alertan al sistema inmunológico del “peligro”, también pueden inducir una respuesta inflamatoria crónica y en algunos tumores se ha observado que los DAMPs se encuentran sobreexpresados y se ha asociado con la inducción de una respuesta inflamatoria crónica ^{[31][32][34]}.

La inflamación participa en el inicio de la respuesta inmune en contra del tumor, sin embargo, la inflamación exacerbada puede facilitar el proceso de transformación maligna al favorecer un ambiente propicio para el desarrollo del tumor ^{[26][35]}. Lo anterior se debe a que las células de la inmunidad innata, durante el proceso inflamatorio, producen un gran número de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores angiogénicos y metaloproteasas que pueden contribuir al desarrollo y progresión del cáncer invasivo caracterizado por: estromagénesis, angiogénesis y la supresión de la respuesta inmune adaptativa ^{[36][37]}. Si bien, se ha reconocido que las células inmunitarias innatas pueden potenciar el desarrollo y progresión tumoral, los factores moleculares precisos que regulan la respuesta inflamatoria siguen siendo motivo de estudio ^{[34][35][38]}.

En los últimos años se han estudiado varias moléculas consideradas como DAMPs y entre éstas se encuentra la proteína nuclear (high mobility group, HMG) HMGB1, las proteínas de choque térmico (HSP), la familia de moléculas S100 y los metabolitos derivados de las purinas como el ácido úrico. Se ha demostrado que estas moléculas activan al sistema inmune y actúan como adyuvantes endógenos. Sin embargo, en el presente trabajo únicamente se describirá la función que desempeña HMGB1 ya que es la única molécula que cumple con las cuatro características antes mencionadas y ha sido definida como un DAMP clásico ^{[30][33][34]}.

1.4 HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)

La proteína HMGB1, como ya se mencionó, es considerada un DAMP o alarmina clásico por su capacidad de inducir la activación de la respuesta inmune. Por tal motivo es interesante estudiar su función en el contexto del cáncer.

1.4.1 Estructura de HMGB1

La proteína HMGB1 pertenece a una familia de proteínas no-histonas conocidas como proteínas del grupo de alta movilidad (del inglés, HMG) y es la más abundante dentro de este grupo. Todas las proteínas HMG comparten varias características estructurales; sin embargo, cada una de ellas tiene una secuencia característica funcional (la secuencia funcional es el principal sitio de interacción entre la proteína HMG y el ADN) que las hace únicas y, por lo tanto, las distingue de otras proteínas cromosómicas ^{[39][40][41]}. HMGB1 está formada por 215 aminoácidos y tiene un peso molecular de 30 kDa. Estructuralmente está compuesta por tres dominios: dos homólogos de carga positiva, llamados caja A y caja B, que se unen a la secuencia del ADN y un dominio rico en residuos ácidos que le confieren una carga negativa. Cada dominio, caja A y B, se compone de aproximadamente 80 aminoácidos (a.a.) de carácter hidrofóbico y cada uno forma una estructura tridimensional en forma de L. Estas características le permiten a la proteína HMGB1 interactuar y unirse exclusivamente al surco menor formado por la doble cadena del ADN ^{[39][40]}.

La proteína HMGB1 presenta modificaciones post-transduccionales como: fosforilación, metilación, acetilación y ADP ribosilación. Se ha reportado que las modificaciones que tiene HMGB1 por acetilación influyen en la actividad biológica de la proteína ^{[42][43]}. Por ejemplo, cuando HMGB1 se acetila, permite la formación del tetrámero histona-histona, la formación del complejo entre el ADN y la polimerasa en el proceso de replicación del ADN. Además, en células fagocíticas la modificación por acetilación tiene un papel muy importante en la regulación del potencial inflamatorio de HMGB1, puesto que de esta manera se regula la entrada y salida del núcleo ^{[43][44][45]}.

1.4.2 Función biológica de HMGB1

La proteína HMGB1 es considerada una proteína pleiotrópica y multifuncional ya que está involucrada en diversos procesos biológicos y patológicos, como transcripción y reparación del ADN, en la respuesta a la infección, la inflamación y daño tisular ^{[43][44]}.

En el núcleo, HMGB1 facilita los cambios estructurales del ADN y la cromatina necesarios para llevar a cabo diversas actividades relacionadas con la transcripción, la replicación, recombinación y reparación del ADN ^[37]. Sin embargo, en 1979 Bustin y cols ^[42] mostraron que bajo ciertas circunstancias, HMGB1 puede ser localizada en el citoplasma y en el medio extracelular, y desde entonces, se ha reconocido que tiene funciones adicionales a las que realiza en el núcleo.

La HMGB1 puede ser liberada activa o pasivamente del núcleo de la célula (ver más adelante) y, una vez en el medio extracelular, activa el sistema inmunológico y contribuye al proceso inflamatorio estimulando diversas células como: monocitos/MØs, DCs y células endoteliales ^{[45][46][47]}. La estimulación de MØs con HMGB1 induce la síntesis de quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias como, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 α y MIP-1 β ^{[45][47][48]}. En DCs se ha observado que HMGB1 estimula su maduración, al incrementar la expresión de moléculas coestimuladoras como, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83 y CD86; promueve la liberación de citocinas pro-inflamatorias, que incluyen al TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-8 e IL-12 y también se ha observado que HMGB1 funciona como un estímulo para la polarización a linfocitos T_H1, promoviendo la producción de IL-12 por DCs e IL-2 e IFN- γ por los linfocitos T ^{[45][47][49]}. En ambas células, MØs y DCs, HMGB1 actúa como un factor quimiotáctico y autócrino para la activación de las mismas. La HMGB1 también estimula la proliferación de células endoteliales humanas e induce la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, requeridas para el reclutamiento de leucocitos durante el proceso inflamatorio. Además, HMGB1 participa en el proceso de re-epitelización al inducir la migración de precursores de células endoteliales, por lo que HMGB1 participa en la reparación del tejido ^{[45][50]}.

Con respecto a la inflamación aguda, se ha demostrado que HMGB1 participa en diferentes procesos patológicos como: sepsis, neumonía y endotoxemia. En pacientes con sepsis, los niveles séricos de HMGB1 aumentan significativamente y son mayores en pacientes con mal pronóstico ^{[47][52]}. También se ha estudiado que HMGB1 tienen un papel importante en condiciones inflamatorias crónicas; en modelos experimentales de artritis y en artritis reumatoide humana se ha reportado que en el tejido sinovial de sujetos con esta patología, la localización de HMGB1 es citoplasmática, mientras que en el tejido sinovial normal se encuentra estrictamente en el núcleo de las células ^{[47][48][52]}.

Por otro lado, recientemente se ha observado que después del tratamiento con radioterapia o quimioterapia, la HMGB1 es liberada del núcleo de las células tumorales y se ha sugerido que participa induciendo la activación de la respuesta inmune en contra de las células que mueren ^{[53][54][55]}. Apetoh y cols ^[56] han sugerido que la muerte de las células tumorales, después del tratamiento, es caracterizada por la liberación y expresión de moléculas endógenas capaces de re-activar la respuesta inmune en contra del tumor. Se ha descrito que las moléculas que son expresadas en la membrana de las células tumorales dañadas son las HSPs (HSP70 y 90) y calreticulina (CRT), que funcionan como una señales de “cómeme” para facilitar el reconocimiento y la captura de las células tumorales por parte de las APCs; también las células tumorales liberan la HSP70, HSP90 y la proteína HMGB1 al medio extracelular, que actúan como señales de “encuéntrame” para activar diferentes células del sistema inmune. Este tipo de muerte se ha denominado muerte celular inmunogénica ^{[53][55][56]}.

Se ha propuesto que la participación de HMGB1 en este proceso es atraer a las DCs, inducir la captura de material apoptótico y favorecer su maduración para hacer más eficiente la presentación de antígeno y activar a los linfocitos TCD4⁺ para su posterior diferenciación hacia el fenotipo T_H1, así como estimular la maduración y capacidad citocida de los CTLs en contra de las células tumorales. Por lo anterior, HMGB1 se ha propuesto como una molécula que puede ayudar al sistema inmune a reconocer y

eliminar a las células neoplásicas con el fin de mejorar los efectos de la terapia convencional ^{[53][55][57]}.

Lo planteado anteriormente sólo es una parte de lo que se conoce de la actividad biológica de HMGB1 en tumores y en la sección de antecedentes se mencionará la relación de esta molécula con la progresión del tumor.

1.4.3 Liberación de HMGB1

La liberación extracelular de la proteína HMGB1 ocurre por dos procesos diferentes: *I*) liberación pasiva por las células que mueren por necrosis o *II*) secreción activa por células inflamatorias ^{[50][58][59]}.

1.4.3.1 Liberación pasiva

Durante la muerte celular por necrosis, la célula presenta diferentes cambios bioquímicos como: alteración en la permeabilidad de las mitocondrias y la producción de especies reactivas de oxígeno; degradación de lípidos por la activación de fosfolipasas; incremento en la concentración citosólica de calcio y cambios nucleares como picnosis (condensación del núcleo), cariorexix (fragmentación de la cromatina) y cariólisis (disolución de la cromatina) ^{[56][60]}. Además, las células que mueren por necrosis son morfológicamente caracterizadas por presentar aumento en el volumen del citoplasma y organelos, ruptura de la membrana plasmática y la subsecuente pérdida del contenido intracelular. Todas estas características que presenta la célula durante la necrosis conducen a que se liberen factores, entre ellos la proteína nuclear HMGB1, que alertan al sistema inmune innato. Por lo anterior, la necrosis es considerada como una muerte celular inmunogénica y parte de este efecto es debido a la liberación de HMGB1 ^{[32][50][56]}.

1.4.3.2 Liberación activa

En monocitos/MØs se ha descrito el mecanismo por el cual HMGB1 es secretada activamente del núcleo al medio extracelular ^[59]. La unión de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF- α) o LPS a sus respectivos receptores presentes en la

superficie de las células monocíticas, activan diversas vías de señalización como las del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), que a su vez, activan a las enzimas encargadas de acetilar o desacetilar proteínas nucleares (incluyendo histonas y HMGB1). Cuando el balance entre acetilasas y desacetilasas es a favor de la acetilación, HMGB1 se hiperacetila en residuos de lisina específicos. Los residuos que frecuentemente son acetilados están ubicados en las dos señales de localización nuclear (NLSs) que posee HMGB1, la NLS1 se encuentra entre los a.a. 28-44 y la NLS2 en los a.a. 179-185. Después de la acetilación, HMGB1 sufre modificaciones que provocan la pérdida de la carga positiva, por lo cual, ya no puede ser retenida en el núcleo y se trasladada al citoplasma donde es capturada por vesículas transportadoras (lisosomas secretores). Los lisosomas que llevan en su interior HMGB1 se fusionan con la membrana plasmática y secretan su contenido hacia el medio extracelular por exocitosis. De esta manera, la proteína HMGB1 es secretada por los macrófagos para llevar a cabo su efecto biológico ^{[58][59]} (Figura 3).

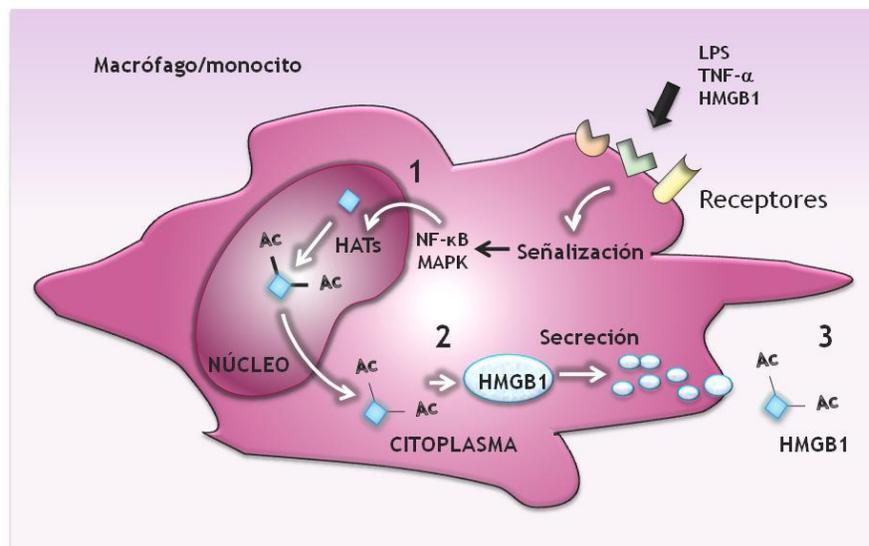


Figura 3. HMGB1 es secretada activamente: **1) Transporte del núcleo hacia el citoplasma:** la activación de las vías del NF- κ B y las MAPKs, con mediadores inflamatorios, activan enzimas acetilasas de histonas (HATs) o inhiben a las desacetilasas, favoreciendo la hiperacetilación de HMGB1 en residuos de lisina específicos. **2) Traslado de HMGB1 en organelos citoplasmáticos:** HMGB1 acumulada en el citoplasma es transportada en lisosomas secretores. **3) Exocitosis de HMGB1:** los lisosomas se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido. ^{Adaptado de Gardella S et al [59]}

1.4.4 Receptores y señalización de HMGB1

Se han reportado tres receptores para la proteína HMGB1: el receptor de los productos finales de la glucosilación avanzada (RAGE) y dos miembros de los receptores tipo Toll (TLRs): TLR-2 y TLR-4 ^{[50][61][62]}.

El primer receptor identificado para HMGB1 fue RAGE, una proteína transmembranal miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, expresado en neuronas, endotelio, fibroblastos, leucocitos y DCs inmaduras, que está involucrado en homeostasis, desarrollo e inflamación ^{[50][61][62]}. Posteriormente se identificaron los TLR-2 y TLR-4 como receptores de HMGB1; los TLRs son miembros de la familia de receptores conocidos como PRRs y son expresados en una gran diversidad de células, incluidos los MØs, DCs, neutrófilos, células epiteliales y células endoteliales ^{[33][62]}.

La activación de RAGE por HMGB1, induce la activación de diversas MAPKs que finalmente llevan a la actividad transcripcional dependiente del NF-κB. Por otro lado, RAGE puede señalizar a través de la activación de MAPK p38 y la cinasa reguladora de la señal extracelular 1 (ERK1) y ERK2, llevando a la fosforilación y degradación del inhibidor del NF-κB (IκB) que conducen a la activación del NF-κB ^{[50][61][62]}. Para la activación de los TLRs por HMGB1 se requiere de la dimerización de los receptores (el TLR-2 forma un heterodímero con el TLR-6 y el TLR-4 forma un homodímero) para la posterior interacción de los dominios citoplasmáticos TIR (receptor Toll/IL-1), presente en los TLRs, con la proteína adaptadora citoplasmática MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88) necesaria para la transducción de señales. Después son reclutados los miembros de la familia IRAK (cinasa asociada al receptor IL-1), que a su vez fosforila y activa a la cinasa TRAF-6 (factor 6 asociado al receptor TNF) para formar un complejo con TAK1 (cinasa 1 activada por TGF-β) y TAB2 (proteína de unión a TAK) que finalmente lleva a la degradación del IκB, lo que libera al NF-κB para trasladarse al núcleo e inducir la expresión de genes que codifican para citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 y IL-12), quimiocinas (IL-8 y MCP-1) y moléculas de adhesión endotelial (E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1) etc. ^{[62][64][65][66]} (Figura 4).

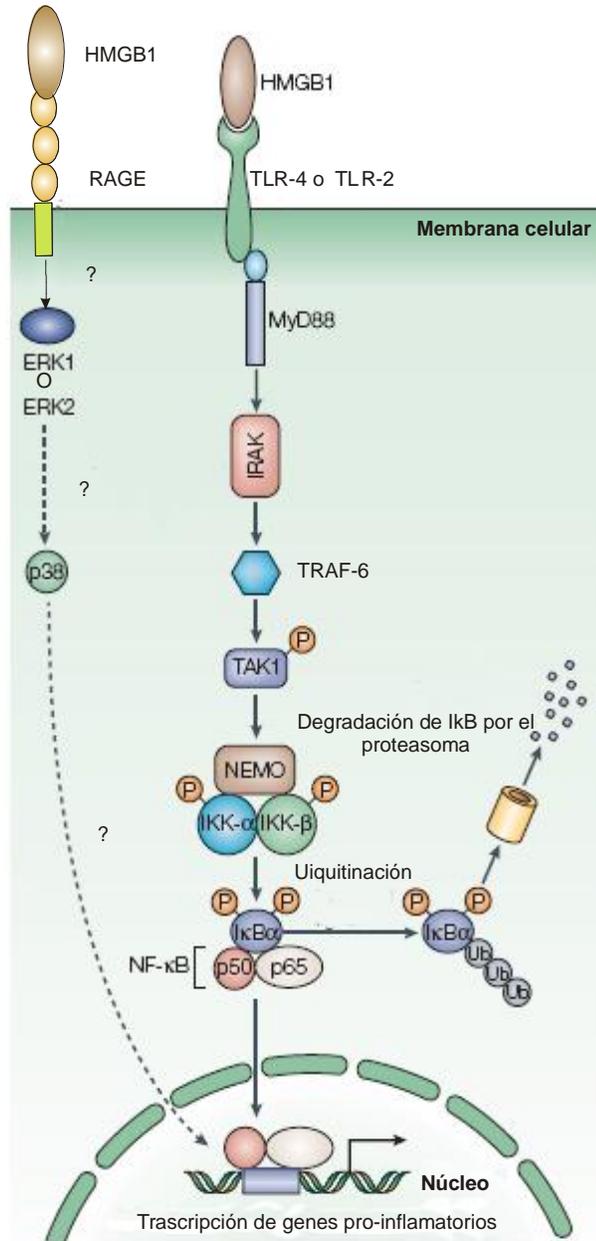


Figura 4. Vía de señalización de HMGB1 a través de los receptores RAGE, TLR-2 y TLR-4. La vía de señalización a través de RAGE, involucra a ERK1y/o ERK2 y MAPK p38 que promueve la activación de NF-κB. La vía de activación a través del TLR-2 y TLR-4 involucra la proteína adaptadora MyD88 y la activación del complejo IKK, conduciendo a la fosforilación de IκB para la liberación del NF-κB y su posterior traslado al núcleo. En el núcleo, NF-κB favorece la transcripción de genes cuyos productos son moléculas pro-inflamatorias. Adaptado de Lotze M et al. [50]

2. ANTECEDENTES

2.1 EXPRESIÓN DE HMGB1 EN CÁNCER

Diferentes grupos de investigación han estudiado la alarmina HMGB1 en diversos tipos de cáncer como: colon ^{[67][68]}, piel ^[69], nasofaríngeo ^[70], gastrointestinal ^[71], mama ^{[34][42]} y próstata ^{[34][42]} y la han relacionado con la progresión del tumor. En los reportes se ha sugerido que la sobreexpresión y la posterior liberación de HMGB1 (posiblemente por hipoxia), está asociada con la sobreexpresión del receptor RAGE en células tumorales ^{[34][42][72]}. Se ha demostrado que interacción de HMGB1 con RAGE activa diferentes vías de señalización intracelulares para promover:

i) Supervivencia tumoral. Huttunen y cols ^[73] mostraron que la interacción HMGB1-RAGE es necesaria para el crecimiento, la invasión y metástasis de las células tumorales al aumentar su supervivencia; en relación a ello, se ha observado que HMGB1 incrementa la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Además, Völp y cols ^[70] demostraron que HMGB1 está relacionada con el incremento en la expresión de la proteína c-IAP2 que inhibe la caspasa 3 y 7, por lo cual, se ha sugerido que HMGB1 tiene la capacidad de inhibir la apoptosis.

ii) Angiogénesis. La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran los nutrientes necesarios para el crecimiento del tumor. Recientemente se ha reconocido a la HMGB1 como un factor pro-angiogénico y como tal, actúa de manera indirecta o directa favoreciendo la angiogénesis tumoral. Indirectamente, HMGB1 induce la activación de MØs, que producen factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) el cual estimula la proliferación de las células endoteliales. Se ha demostrado que HMGB1 tiene el mismo efecto que el VEGF y estimula la migración de los progenitores de células endoteliales, incrementando de esta manera la neovascularización en el tumor ^{[52][62]}.

Además, la sobreexpresión de HMGB1 está asociada con el fenotipo maligno de muchos tipos de cáncer ^{[42][74]} (Tabla 1), ya que HMGB1 al remodelar la cromatina, hace posible que los factores de transcripción interaccionen con zonas promotoras para que los genes se expresen, favoreciendo así la sobreexpresión de genes.

Tabla 1. Localización y participación de HMGB1 en diferentes tipos de cáncer.

Tipo de cáncer	Localización ⁽¹⁾ subcelular de HMGB1	Participación de HMGB1	Ref.
Colon	Núcleo	Inhibe la apoptosis ya que induce la expresión de la proteína anti-apoptótica c-IAP2.	67, 68
Piel	Núcleo	Regula la expresión de MIA (actividad inhibitoria del melanoma), relacionada con la progresión del melanoma.	69
Nasofaríngeo	Núcleo* y citoplasma	La sobreexpresión de HMGB1 se asocia al mal pronóstico en pacientes con estadios tardíos.	70
Gastrointestinal	Núcleo* y citoplasma	La ganancia en función del proto-oncogen KIT (un evento genético común en estos tumores) está relacionada con la sobreexpresión de HMGB1.	71
Mama	ND	La variabilidad en la respuesta al tratamiento del cáncer de mama estrógeno positivo podría depender de HMGB1 como un modulador asociado a la respuesta al estrógeno.	34, 42
Próstata	ND	La coexpresión de HMGB1 y RAGE, en la mayoría de los casos metastásicos, se incrementa.	34, 42

ND: No definido, se estudió el mRNA; (1) Localización empleando inmunohistoquímica; * La mayoría de las células expresaron HMGB1 en el núcleo

En cáncer pulmonar, el único reporte de HMGB1 que existe es en líneas celulares; en éste, Bartlin y cols ^[75] indican que los factores solubles liberados por los fibroblastos, como el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), influyen en la localización celular de HMGB1. Los resultados sugieren que en las líneas celulares, HMGB1 puede ser exportada al citoplasma y posteriormente liberada al medio extracelular en respuesta a un estímulo exógeno, como los factores liberados por las células del estroma.

2.2 Localización subcelular y secreción de HMGB1

La localización subcelular, es decir, la distribución núcleo-citoplasma de HMGB1 depende del tipo y el estado de activación de la célula. La localización de HMGB1 en una célula normal es nuclear, sin embargo, bajo ciertas circunstancias (como un estímulo inflamatorio o daño celular) puede localizarse en el citoplasma ^{[48][50][76]}.

Como ya se mencionó, en monocitos/MØs activados se ha observado que la localización de HMGB1 es preferentemente en el citoplasma ya que estas células son capaces de secretar activamente la proteína ^[58]. Sin embargo, se conoce que no sólo los monocitos/MØs tienen la capacidad de secretar activamente la HMGB1, las neuronas también pueden secretar la proteína, pero el mecanismo por el cual lo realizan aun se desconoce ^[50]. Asimismo, se ha reportado que las líneas celulares de cáncer de colon humano HCT 116, Caco-2 y WiDr, secretan la HMGB1 al medio extracelular ^{[77][78]}. En el caso de la línea HCT 116, donde la localización de HMGB1 es exclusivamente nuclear, se observó que las células son capaces de secretar altas cantidades de la proteína sin requerir de un estímulo exógeno para su secreción ^[77]. De manera contraria, las líneas WiDr y Caco-2 pueden secretar, espontáneamente, pequeñas cantidades de HMGB1, pero la cantidad de proteína secretada aumenta después de que las células se estimulan con una mezcla de citocinas (TNF, IL-1 β e IFN- γ). En el caso particular de la línea Caco-2, la células presentaron un patrón de tinción (empleando inmunofluorescencia) en forma de puntilleo en el citoplasma y en ellas se observó, mediante microscopía electrónica, que HMGB1 se encuentra en el interior de cuerpos multivesiculares (MVBs) ^[78].

Los MVBs son vesículas de membrana que contienen en su interior microvesículas internas que, una vez secretadas son llamadas exosomas. Los exosomas son estructuras esféricas que están limitadas por una bicapa lipídica, contienen componentes del citosol, así como proteínas y lípidos presentes en la membrana de la célula que le dio origen.

Los exosomas son transferidos entre las células después del contacto directo célula-célula y la transferencia de estas vesículas incluye inducción, amplificación y/o modulación de la respuesta inmune, así como la adquisición de nuevas propiedades funcionales por las células receptoras; por ello, la transferencia de vesículas de membrana es considerada un modo de comunicación intercelular ^{[79][80]}. Los exosomas son liberados por distintos mecanismos, pueden ser secretados por gemación o desprendimiento de la membrana plasmática por plaquetas, células tumorales, neutrófilos y DCs o bien son secretados después de la fusión de los MVBs con la membrana ^{[79][80][81]}. Asimismo, la secreción puede ser inducible o espontánea y depende del tipo de célula y de los cambios en el ambiente. Una vez fuera de la célula, los exosomas interaccionan con la célula receptora a través de moléculas de adhesión o por la interacción ligando-receptor y su destino final, después de la unión a la superficie de la célula receptora, es desconocido; sin embargo, se sugiere que los exosomas pueden fusionarse con la membrana plasmática y posiblemente con las membranas de endosomas internos ^[79].

Recientemente se ha reportado que las microvesículas secretadas pueden promover o inhibir la respuesta inmune; diferentes estudios han mostrado que las microvesículas derivadas de líneas celulares tumorales (tMVs) inducen, *in vitro*, la apoptosis de los linfocitos T a través del ligando de Fas (CD95L), además inhiben la citotoxicidad de las células NK a través de la unión del receptor NKG2D con sus ligandos presentes en las microvesículas. Por otra parte, cuando las tMVs son administradas junto con adyuvantes, como ligandos de los TLRs y/o HSPs, promueven eficientemente la respuesta inmune antitumoral. Finalmente, el efecto de las tMVs dependerá del estado inmune del paciente y del estado de progresión del tumor ^{[79][81][82]}.

Por último, de acuerdo a la actividad biológica de HMGB1 extracelular, ya sea por que fue liberada pasivamente o secretada activamente, se ha propuesto que posee un efecto dual en el desarrollo del tumor (Figura 5): 1) Actúa como alarmina incrementando la inmunogenicidad de las células que mueren, promoviendo la captura de material apoptótico por las DCs, induciendo la maduración de DCs,

haciendo más eficiente la presentación de antígenos tumorales y estimulando linfocitos T_H1 que, posteriormente, estimulan a los CTLs dirigidos en contra de las células tumorales ^{[53][56][57]}; //) De manera contraria, HMGB1 puede funcionar como un mediador inflamatorio, al reclutar precursores de células endoteliales y MØs, los cuales, una vez activados producen citocinas pro-inflamatorias y activan los procesos de reparación del tejido, favoreciendo la neoangiogénesis y un microambiente tumoral donde se promueva el crecimiento del tumor y la metástasis ^{[34][35][48][72]}.

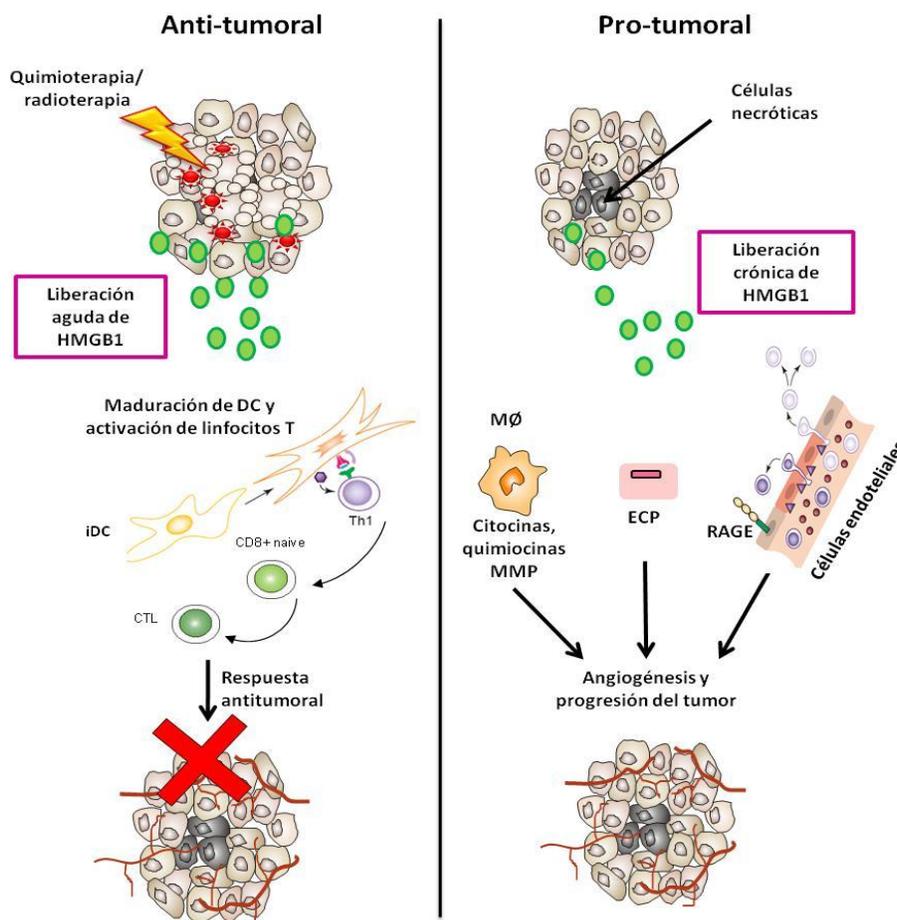


Figura 5. La liberación extracelular de HMGB1 y su efecto dual en células tumorales. La liberación aguda de HMGB1 de células tumorales que mueren después del tratamiento estimula la respuesta inmune induciendo la maduración de DCs al aumentar la expresión de moléculas de coestimulación y la secreción de IL-12, lo cual, contribuye a la polarización de T_H1 de linfocitos T naíve que, a su vez ayudan a la activación de CTLs. La liberación crónica de HMGB1 de células que mueren por necrosis induce la activación de células endoteliales al aumentar la expresión de moléculas de adhesión e inducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas por MØs. La actividad del endotelio recluta leucocitos y precursores de células endoteliales (ECP) que contribuye a la reparación del tejidos y la angiogénesis. Adaptado de Campana L et al [57] y Dumitriu I. et al [51]

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es la principal causa de muerte relacionada al cáncer en el mundo, con una tasa de mortalidad del 17.6 % ^{[8][9]}. La patogénesis del cáncer pulmonar es muy compleja y en ella participan diversos factores biológicos liberados por las propias células tumorales, así como por las del estroma que contribuyen a su desarrollo. Por ello, es importante conocer que tipo de moléculas intervienen en la patogénesis para controlar la progresión del tumor. Recientemente se han estudiado las "señales de alarma endógenas" en relación al cáncer y una de las proteínas de mayor interés es la alarmina HMGB1 ^{[30][31]}. Se ha reportado que la sobreexpresión de HMGB1 está asociada con el fenotipo maligno de las células tumorales en una gran variedad de tumores humanos, lo cual se debe a que la HMGB1, además de ser una proteína de unión ADN, puede liberarse del núcleo, distribuirse en el citoplasma y liberarse en forma activa o pasiva al medio extracelular para llevar a cabo diversas funciones, incluyendo supervivencia celular ^[73], angiogénesis ^[62], migración e invasión de las células tumorales ^[34] a través de la activación del receptor RAGE ^[75]. En cáncer pulmonar aún se desconoce si HMGB1 participa en el desarrollo y progresión del tumor, puesto que no existen reportes de la proteína en esta patología; por lo cual, en el presente trabajo se determinará la localización subcelular de HMGB1 en el epitelio pulmonar normal, en el epitelio adyacente al tumor y en adenocarcinomas pulmonares, ya que su localización celular parece estar relacionada con su función intra y extracelular. Además, para complementar su estudio, se determinará la localización de HMGB1 en líneas celulares de este tipo histológico, así como determinar si la HMGB1 puede ser secretada en tMVs y analizar, posteriormente, su participación biológica en el desarrollo y progresión del cáncer pulmonar.

4. HIPÓTESIS

En células normales, la proteína HMGB1 se encuentra localizada en el núcleo; en cambio, en las células tumorales de origen pulmonar la distribución de HMGB1 es citoplasmática y puede ser liberada en microvesículas.

5. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Determinar la distribución subcelular de la proteína HMGB1 en tejido pulmonar normal y adyacente al tumor, así como en adenocarcinomas pulmonares y en líneas celulares de este tipo histológico; así como la secreción de HMGB1 en microvesículas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar la distribución de HMGB1 en tejido epitelial pulmonar normal
2. Estudiar la distribución de HMGB1 en tejido epitelial pulmonar adyacente al tumor
3. Estudiar la distribución de HMGB1 en adenocarcinomas pulmonares
4. Comparar la localización de HMGB1 en tejido pulmonar libre de neoplasia y en adenocarcinomas
5. Estudiar la distribución de HMGB1 en líneas celulares de este mismo tipo histológico
6. Determinar si la proteína HMGB1 es liberada en microvesículas por las líneas tumorales

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.1 Cortes histológicos

El estudio incluyó tejido pulmonar obtenido de patologías no malignas considerado como tejido normal, así como 21 cortes histológicos de tumores tipo adenocarcinoma provenientes de autopsias. De los cuales se seleccionaron 13 adenocarcinomas clasificados como bien y 8 como pobremente diferenciados con base a la morfología de las células tumorales. La clasificación histológica de los tumores pulmonares se basó en los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Los cortes histológicos, obtenidos del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), fueron fijados en formol y embebidos en parafina.

6.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Las secciones histológicas se desparafinaron y rehidrataron. Se bloqueó la peroxidasa endógena incubando las secciones histológicas con H₂O₂ al 3 % (v/v) en metanol durante 20 min a temperatura ambiente (TA). Después se realizó la recuperación de antígeno empleando una solución amortiguadora de citratos (0.01M, pH 6) a ebullición constante durante 20 min. Posteriormente las secciones histológicas se incubaron con la solución bloqueadora (amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.3, suero de cerdo al 2% (v/v) y Tritón X-100 al 0.5% (v/v)) durante 30 min a TA. Las secciones se trataron con el anticuerpo (Ac) policlonal de conejo anti-HMGB1 humana (reconoce la región carboxilo terminal de esta proteína) obtenido de Abcam (Cambridge, UK), la dilución empleada fue 1:300 que se estableció previamente como óptima. Las laminillas se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de lavar con PBS, las laminillas se incubaron con el Ac anti-conejo marcado con biotina (Dako Glostrup, Denmark) a 32°C por 1h; la dilución empleada fue 1:100 establecida previamente como óptima. Después de lavar, los cortes histológicos se incubaron con el Complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa

(ABCComplex/HRP) obtenido de Dako Glostrup a la dilución 1:150 a 32°C durante 30 min en cámara húmeda. Se reveló con H₂O₂ y como cromógeno se empleó tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) durante 1.5 min. Posteriormente, las secciones histológicas se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y se montaron con una resina sintética (Merck Darmstadt, German).

6.2.1 Observación de la distribución de HMGB1

Para evaluar la distribución celular de la proteína HMGB1, de cada caso estudiado se observaron 10 campos a un aumento total de x400. Los campos se observaron en un microscopio óptico marca Leica modelo CME obtenido de Leica Geostystems (St. Gallen, Switzerland) y las imágenes se analizaron con el software Leica QWin.

6.3 CULTIVO CELULAR

Se incluyeron un total de 6 líneas celulares tipo adenocarcinoma. Las líneas celulares A-549, SK-LU-1 y A-427 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y las líneas 1.3.15, 1.3.11 y 3B1A se establecieron a partir del derrame pleural de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar sin tratamiento previo.

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino (HyClone, Utah, USA) al 10 % (v/v) y una mezcla de antibióticos al 1% (estreptomina y bencilpenicilina). Los cultivos celulares se incubaron en un ambiente humidificado a 37°C con 5% de CO₂. Después de formar una monocapa a confluencia, las células se trataron con una mezcla de Tripsina-Verseno (In Vitro, DF, México) al 0.05% y agitación mecánica para facilitar su desprendimiento. De la suspensión celular obtenida se determinó su viabilidad (mayor al 95%) y se procedió a cultivar en: I) portaobjetos con cámara de 8 pozos (Falcon Becton Dickinson, Bedford, USA) y II) botellas de 80 cm² (Thermo Fisher Scientific, Roskilde Denmark).

6.4 INMUNOFLUORESCENCIA

Después de formada la monocapa en portaobjetos con cámara de 8 pozos, las células se lavaron con PBS pH 7.4 estéril y se fijaron con etanol absoluto. Se bloqueó y permeabilizó como se indicó en inmunohistoquímica. Posteriormente se adicionó el Ac anti-HMGB1, la dilución empleada fue 1:1000, que se estableció previamente como óptima y se incubó toda la noche a 4°C en cámara húmeda. En cada ensayo se empleó un control negativo, que consistió en omitir el Ac primario. Después de lavar, las células se incubaron con el Ac anti-conejo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes California, USA) a 32°C por 1.5 h; la dilución empleada fue 1:300 establecida previamente como óptima. Las células se lavaron y finalmente los portaobjetos se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA) para ser observadas en un microscópico de fluorescencia marca Leica modelo CME Leica Geostems.

6.5 WESTERN BLOT

Para el análisis de HMGB1 por Western blot se obtuvieron los extractos nucleares y citoplasmáticos de las líneas A-427 y 1.3.15, así como las microvesículas obtenidas de los sobrenadantes del cultivo de estas dos líneas celulares.

6.5.1 Obtención de extractos celulares

La fracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares se obtuvo empleando un kit de extracción de proteínas (Fermentas Ontario, Canadá). Brevemente, después del crecimiento a confluencia en botellas de 80 cm² se recuperó la suspensión celular después de tripsinizar y se centrifugó a 1500 rpm a 4°C durante 10 min. El botón obtenido se lavó con PBS frío y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Posteriormente, las células se resuspendieron e incubaron en la solución de lisis (adicionado con DTT 0.1 M y una mezcla de inhibidores de proteasas) por 10 min y se centrifugaron nuevamente a 10000 rpm a 4°C durante 10 min.

Después de recuperar el sobrenadante se centrifugó a 14500 rpm a 4°C durante 30 min para eliminar restos celulares y se recuperó el sobrenadante el cual representó la fracción citoplasmática.

El botón obtenido después de la incubación con la solución de lisis, se lavó dos veces y se resuspendió en amortiguador de almacenamiento; esta fracción se consideró como extracto nuclear. Las fracciones celulares obtenidas se mantuvieron en congelación a -70°C hasta su uso.

6.5.2 Aislamiento de microvesículas (tMVs) derivadas de células tumorales

Después de cultivar las líneas celulares a sub confluencia en botellas de 80 cm², los cultivos se incubaron por 72 h adicionales para recuperar los sobrenadantes, los cuales se centrifugaron a 1500 rpm a 4°C por 15 min para remover restos celulares. Después se lavar con PBS frío se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por 15 min. El sobrenadante se centrifugó a 40000 rpm a 4°C por 3 h y el botón conteniendo las tMVs se resuspendió en 500 µL de PBS estéril.

6.5.3 Western blot de las fracciones celulares y tMVs

A cada extracto citoplasmático, nuclear y de tMVs se determinó la cantidad de proteínas totales por el método de micro BCA (Pierce, Rockford, IL, USA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

La electroforesis de las muestras se realizó colocando en cada carril 16-30 µg de proteínas totales. Como control positivo se empleó la proteína HMGB1 humana recombinante (rhHMGB1) obtenida de Research & Diagnostics Systems (MN, USA). Así mismo, se emplearon marcadores de peso molecular, biotinilados y preteñidos (caleidoscopio) ambos obtenidos de BioRad Laboratories (CA, USA). La electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12% aplicando una corriente eléctrica de 100 V. Posteriormente las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa en condiciones semi-secas durante 1 h a 15 V. La membrana de nitrocelulosa se trató

con albúmina sérica bovina (BSA) al 3 % (Sigma-Aldrich) e incubó a TA por 1 h para bloquear el pegado inespecífico.

Después de lavar, a cada tira se adicionó el Ac anti-HMGB1, el Ac monoclonal (mAc) anti-actina o el Ac policlonal de conejo anti-lámina B1 (los dos últimos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y se incubó a 4°C por toda la noche; las diluciones empleadas de estos Ac's se muestran en la Tabla 2. Los Ac's anti-lámina B1 y anti-actina se empelaron como marcadores de proteínas nucleares y citoplasmáticas, respectivamente.

Posterior a los lavados, se incubó con el Ac secundario anti-especie específico marcado con biotina (Dako Glostrup) durante 1 h a TA. Las diluciones establecidas como óptimas se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Diluciones estandarizadas de los Ac's empleados en Western blot

Anticuerpo primario (dilución optima)	Anticuerpo secundario (dilución optima)
Anti-HMGB1 (1:450)	Anti-Conejo (1:500)
Anti-Actina (1:200)	Anti-Ratón (1:500)
Anti- Lámina B1 (1:200)	Anti-Cabra (1:500)

Al finalizar la incubación se lavó y se adicionó el ABCComplex/HRP incubando a TA por 30 min, la dilución empleada fue 1:300 establecida previamente como óptima. Se reveló por quimioluminiscencia empleando el kit ECL Advance (Amersham Biosciences, NJ, USA), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La detección de las bandas se registró en el sistema de imagen del fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

7. RESULTADOS

7.1 Distribución de HMGB1 en epitelio pulmonar normal, en epitelio pulmonar adyacente al tumor y en adenocarcinomas

En los cortes histológicos se observó la distribución subcelular de HMGB1 en las siguientes zonas: I) en el epitelio pulmonar normal libre de neoplasia, II) en el epitelio bronquial y alveolar adyacente al tumor y III) en las células de adenocarcinomas pulmonares bien y pobremente diferenciados. La distribución de HMGB1 en el epitelio pulmonar normal se comparó con el epitelio adyacente al tumor y con adenocarcinomas.

I) En el epitelio pulmonar normal, la distribución subcelular de HMGB1 se observó en dos zonas: la región bronquial y alveolar. En el epitelio bronquial, constituido por células cilíndricas ciliadas, células basales y células caliciformes (productoras de mucina), la localización celular de HMGB1 fue nuclear (Figura 6A y 6C). En la región alveolar, constituida por los neumocitos tipo II, la localización celular de la proteína fue nuclear (Figura 6E).

II) En el epitelio pulmonar adyacente al tumor, la localización de HMGB1 en las células cilíndricas ciliadas y células caliciformes se observó principalmente en el citoplasma (Figura 6B y 6D). Sin embargo, las células basales conservaron la localización de HMGB1 en el núcleo. En cuanto a la región alveolar cercana al tumor, la localización subcelular de HMGB1 se mantuvo en el núcleo de todas las células (Figura 6F).

III) En los cortes histológicos de adenocarcinomas pulmonares, la distribución de HMGB1 se observó en la mayoría de los casos en el citoplasma de las células y en algunos casos la localización fue en núcleo y citoplasma. De acuerdo al grado de diferenciación del tumor no se encontraron diferencias en la distribución de HMGB1 (Figura 7).

Al comparar la distribución de HMGB1 en las células del epitelio bronquial y alveolar normal con la distribución en los adenocarcinomas, se observó que la proteína se encuentra en el citoplasma.

En la Tabla 3 se muestra el número de casos y el porcentaje de adenocarcinomas bien y pobremente diferenciados donde HMGB1 se localizó en los compartimentos celulares antes mencionados.

Tabla 3. HMGB1 en adenocarcinomas pulmonares de acuerdo al grado de diferenciación.

Distribución	Grado de diferenciación	
	BD (%)	PD (%)
Núcleo y/o citoplasma	8 (61.5)	6 (75.0)
Núcleo	1 (8.0)	1 (12.5)
Sin expresión	4 (30.5)	1 (12.5)
Total de casos (n)	13	8

BD: bien diferenciado; PD: pobremente diferenciado

En las Figuras 7A-B se muestra la localización nuclear y citoplasmática de HMGB1, en las Figuras 7C-B la localización nuclear de HMGB1 y en las Figuras 7E-F la localización citoplasmática de HMGB1 en las células tumorales de adenocarcinomas bien y pobremente diferenciados.

Por otro lado, en las células tumorales que mostraron características invasivas (células rodeadas de tejido conectivo), se observó la distribución de HMGB1 exclusivamente en el núcleo. Figuras 8A y 8B.

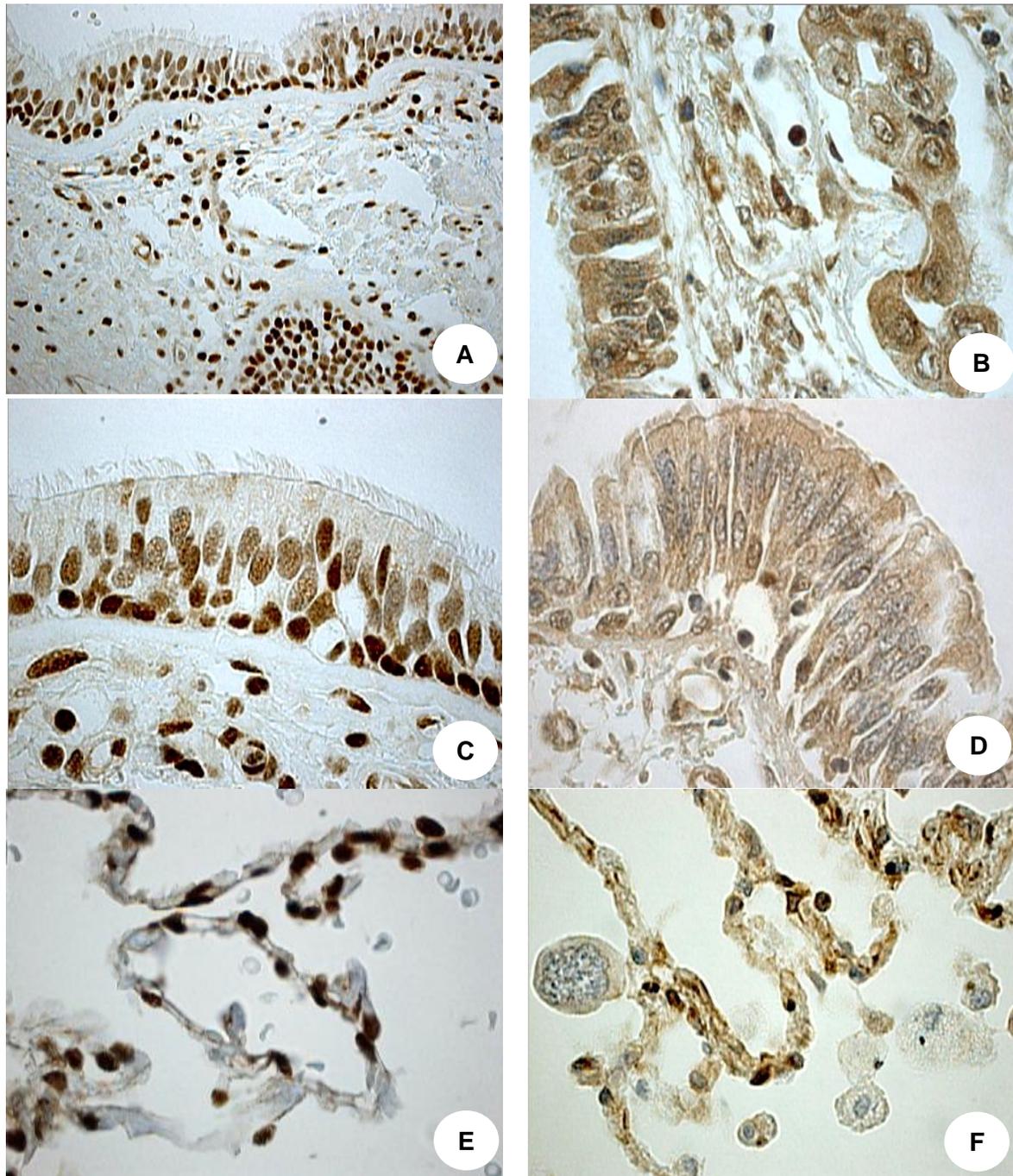


Figura 6. Localización nuclear y citoplasmática de HMGB1 empleando inmunohistoquímica. Panel de la izquierda se observa la localización nuclear de la proteína HMGB1 en el epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado (A y C) y región alveolar (E) normal y libre de neoplasia. Panel derecho, se observa la distribución citoplasmática de HMGB1 en células cilíndricas ciliadas y nuclear en células basales (B y D) y región alveolar (F) adyacentes al tumor. Aumento total x400 (A) y x1000 (B-F)

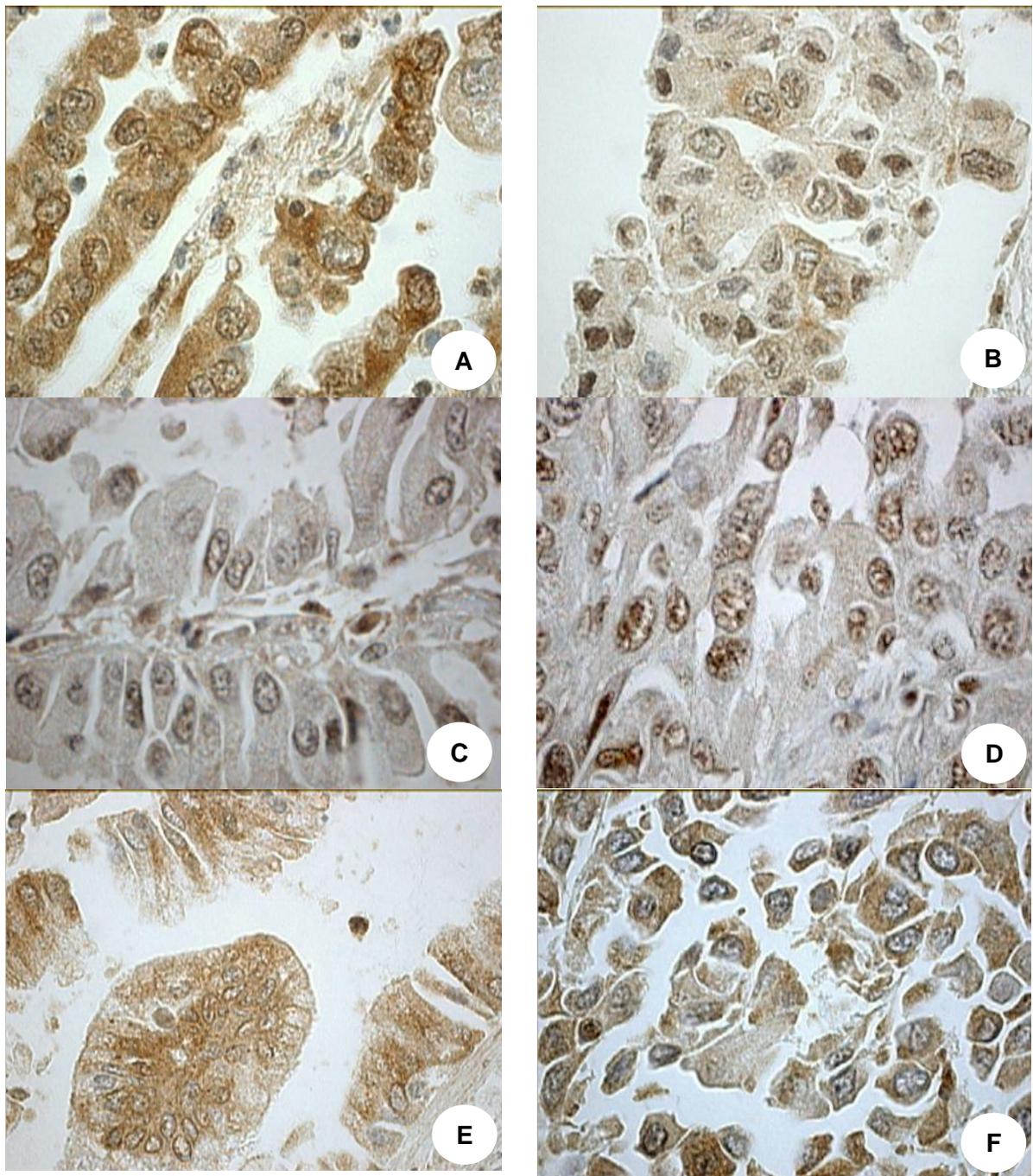


Figura 7. Distribución celular de la proteína HMGB1 empleando inmunohistoquímica. Panel de la izquierda, se observa la localización nuclear y/o citoplasmática de la proteína HMGB1 en adenocarcinomas bien diferenciados (A, C y E). Panel derecho, se observa la distribución nuclear y/o citoplasmática de la HMGB1 en adenocarcinomas pobremente diferenciados (B, D y F). Aumento total x1000

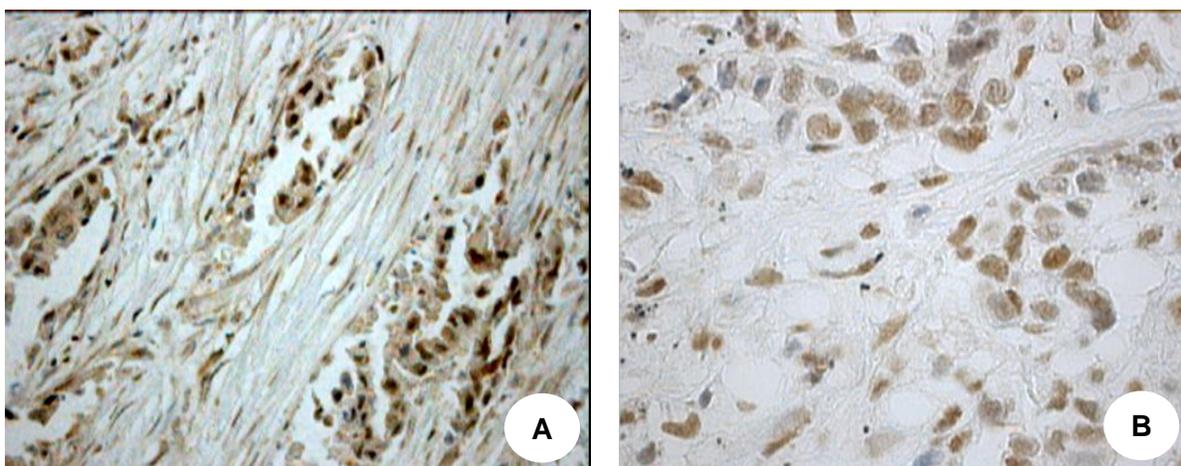


Figura 8. Distribución celular de la proteína HMGB1 empleando inmunohistoquímica. Se observa la localización nuclear de HMGB1 en células tumorales invasivas. Aumento total x400 (A) y x1000 (B)

7.2 Distribución de HMGB1 en líneas celulares de adenocarcinomas pulmonares

La distribución de HMGB1 en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar se observó en núcleo y/o citoplasma. En las líneas celulares A-549 y A-427, la localización de HMGB1 se observó principalmente nuclear, con una ligera tinción en el citoplasma. Bartlin y cols ^[75] reportaron previamente en la línea A-549 una tinción nuclear similar a la observada en este estudio. Las líneas celulares SK-LU-1 y 3B1B mostraron una localización exclusivamente nuclear de la proteína HMGB1, mientras que las líneas celulares 1.3.11 y 1.3.15, mostraron una localización citoplasmática. En la Figura 9 se muestra el patrón de tinción para HMGB1 en las líneas celulares estudiadas.

En las líneas celulares la tinción de HMGB1, sin importar su localización subcelular, mostró dos patrones: una tinción homogénea observada únicamente en la línea A-427 y una tinción en forma de puntillado observada en las cinco líneas restantes (Figura 9).

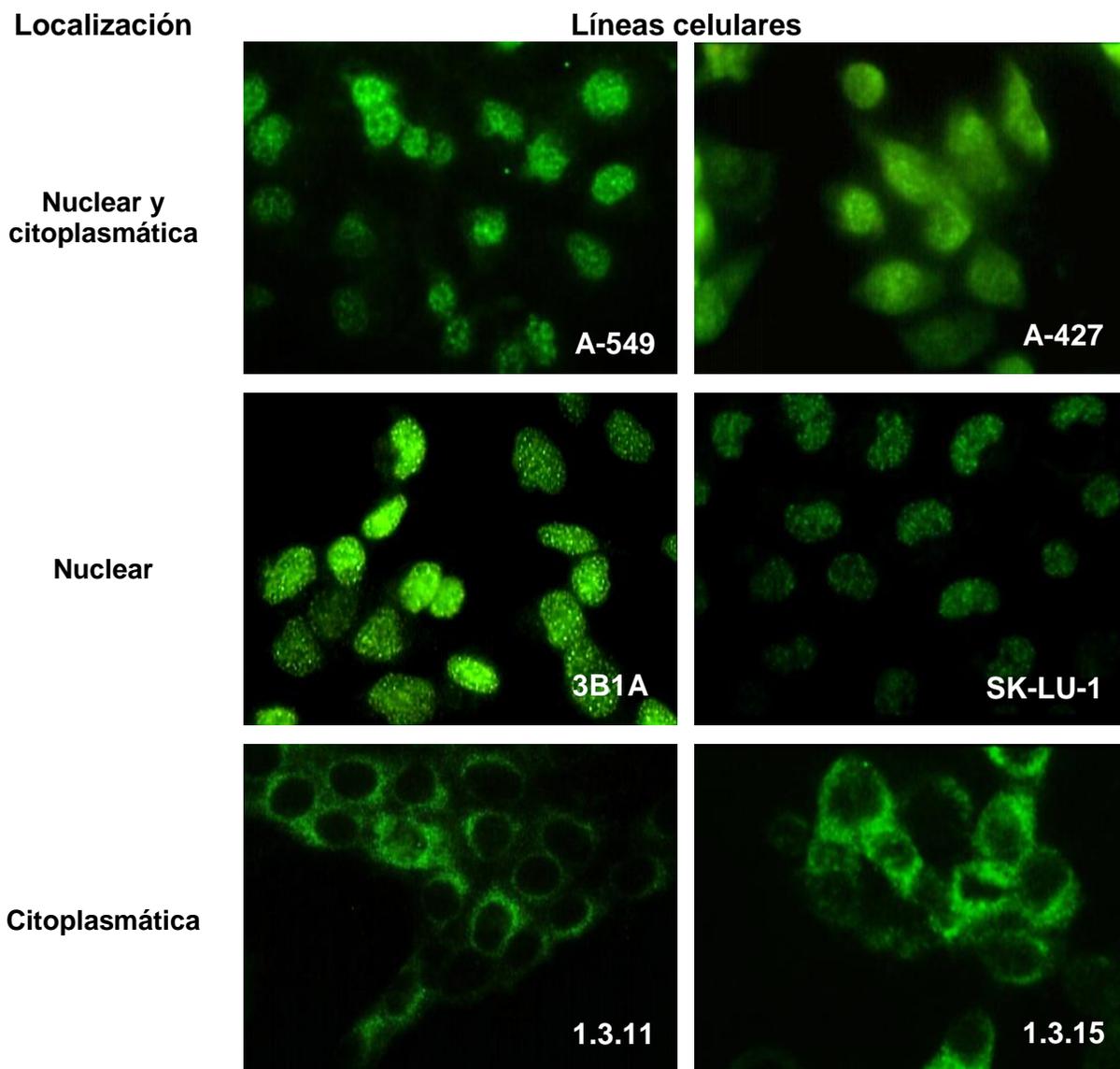


Figura 9. Localización nuclear y/o citoplasmática de la proteína HMGB1 en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar empleando inmunofluorescencia. Aumento total x1000.

7.3 HMGB1 liberada en tMVs por la línea 1.3.15

Como ya se mencionó, la HMGB1 se localizó en el citoplasma de la mayoría de las células tumorales, por lo que es probable que las células puedan secretarla. Lo anterior se basa en estudios previos en líneas celulares de cáncer de colon ^{[77][78]} donde demuestran que la HMGB1 está contenida en tMVs. Por lo anterior, se decidió estudiar esta posibilidad en líneas tumorales de origen pulmonar y para ello, se obtuvieron las tMVs de las líneas celulares de adenocarcinoma A-427 y 1.3.15.

Se detectó mediante Western blot que las tMVs derivadas de la línea A-427 (la cual mostró una tinción nuclear de HMGB1 por inmunofluorescencia) no mostraron una banda que correspondiera al peso molecular de 30 kDa de la proteína rhHMGB1, por lo cual, las tMVs pudieran no contener la proteína en estudio (Figura 10A); en cambio, las tMVs derivadas de la línea 1.3.15 (que mostró una tinción citoplasmática de HMGB1 por inmunofluorescencia) mostraron una banda con el mismo peso molecular de la rhHMGB1, por lo tanto las tMVs de la línea 1.3.15 contienen esta alarmina (Figura 10B).

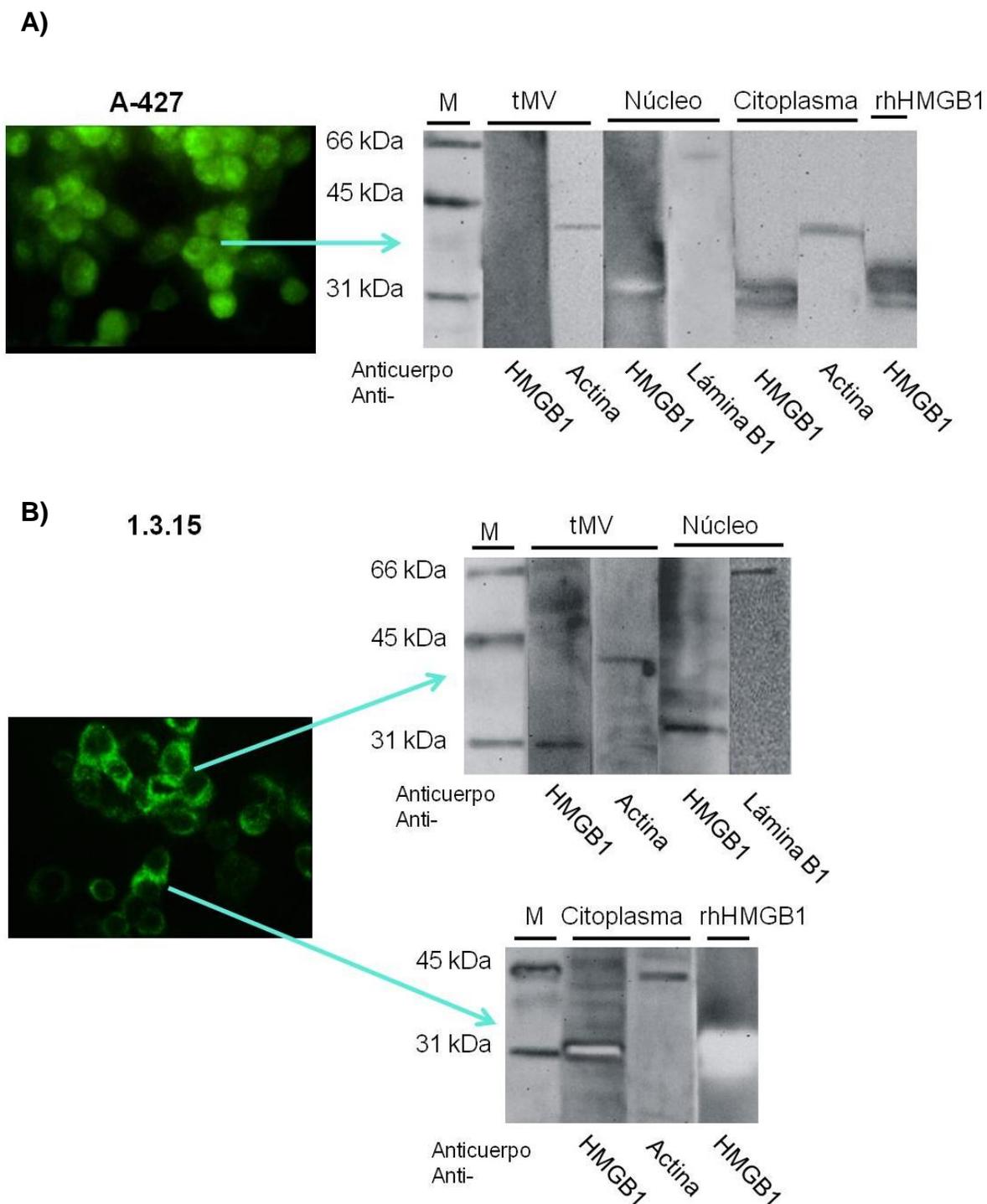


Figura 10. Análisis de extractos celulares y microvesículas (tMV) obtenidas de las líneas celulares A-427 y 1.3.11 por Western blot. **A.** Las células tumorales de la línea A-427 no liberan HMGB1 en tMVs **B.** HMGB1 es secretada por las células tumorales de la línea 1.3.15 en tMVs. Actina y lámina B1 fueron empleados como marcadores de proteínas citoplasmáticas y nucleares, respectivamente. rhHMGB1: HMGB1 humana recombinante.

8. DISCUSIÓN

En este estudio, se observó la localización nuclear de HMGB1 en las células del epitelio pulmonar normal, lo cual demuestra la principal función de la proteína como un componente de la arquitectura de la cromatina ^{[40][41]}. En cambio, la distribución subcelular de HMGB1 en las células cilíndricas ciliadas adyacentes al tumor fue citoplasmática, lo que pudiera deberse a que factores solubles liberados del estroma o por las propias células tumorales pudieran influir en la distribución núcleo-citoplasma de HMGB1. Bartlin y cols ^[75] reportaron que el bFGF liberado por una línea celular de fibroblastos indujo la relocalización citoplasmática de HMGB1 en la línea de células epiteliales pulmonares H358.

Con respecto a las células basales del epitelio adyacente al tumor que mantienen la proteína en el núcleo, es probable que los factores presentes en el microambiente no afecten la distribución de HMGB1; otra posibilidad, es que estas células basales por ser indiferenciadas mantienen la expresión nuclear de HMGB1 como ya se ha observado previamente en células indiferenciadas de distintos tejidos ^{[74][76]}.

Además, en las células de los adenocarcinomas pulmonares, independientemente del grado de diferenciación celular, la localización de HMGB1 se observó en núcleo y citoplasma o en citoplasma principalmente. En el primer grupo, los resultados observados pudieran deberse a la sobreproducción de HMGB1 por las células tumorales. Con relación a este punto, varios grupos de investigación han observado resultados similares y han demostrado que en células tumorales y líneas celulares provenientes de distintos tipos de cáncer, la HMGB1 se encuentra sobreexpresada ^[67-71]; algunos de estos reportes sugieren que la HMGB1 está relacionada con favorecer el proceso de la tumorigénesis ^{[67][71][74]}.

En relación a la distribución citoplasmática en las células tumorales, una posibilidad se debe a mutaciones o alteraciones en las señales de localización nuclear (NLSs), que controlan el transporte de HMGB1 del núcleo al citoplasma, por lo que HMGB1 no puede entrar al núcleo después de que se ha sintetizado. El estudio realizado por Bonaldi y cols ^[58] mostró que en macrófagos, las modificaciones en los residuos de lisina 27, 28, 29, 181, 182 y 183 (localizados en las NLSs) por alaninas (2xKKK→AAA) o glutaminas (2xKKK→QQQ) provocan la distribución de HMGB1 en el citoplasma. Aunque no se ha demostrado que se presenten estas mutaciones en las células tumorales, este mismo fenómeno podría estar ocurriendo. Otra posibilidad es que la distribución en citoplasma de HMGB1 observada en los adenocarcinomas pudiera ser característica de este tipo histológico o bien ser un evento general para los NSCLC. Por lo que es necesario realizar estudios en otros tipos histológicos del cáncer pulmonar para determinar si la localización citoplasmática de HMGB1 es un evento particular de los adenocarcinomas.

Asimismo, la acumulación de la proteína en el citoplasma (por su sobreproducción) pudiera estar relacionada con su liberación pasiva, durante la muerte por hipoxia o por secreción activa al medio extracelular para favorecer la progresión del tumor ^{[76][77][78]}. En la mayoría de los tipos de cáncer donde se ha estudiado HMGB1 reportan una localización nuclear, sin embargo, en cáncer nasofaríngeo ^[70] y gastrointestinal ^[71] la distribución es nuclear y citoplasmática y nuestros resultados concuerdan con estos reportes previos. Es necesario analizar un mayor número de tipos tumorales a fin de definir si este evento es general en la progresión del cáncer.

Por su parte, la localización nuclear de HMGB1 en las células invasivas pudiera favorecer la sobreexpresión de genes, ya que al remodelar la cromatina permite el acceso e incrementa la afinidad de unión de diversos factores de transcripción ^{[41][74]}, lo que favorecería en estas células su capacidad metastásica.

Al igual que en los cortes histológicos, la localización de la proteína HMGB1 en las líneas celulares es nuclear y/o citoplasmática, por lo que estos resultados apoyan la utilización de las líneas celulares en la realización de estudios posteriores en relación al estudio de la actividad biológica de la proteína en carcinomas pulmonares.

Con base en lo anterior, se consideró que la línea celular 1.3.15 pudiera secretar la HMGB1 en tMVs y se encontró que esta línea, donde la localización de HMGB1 fue citoplasmática, contiene a la HMGB1 en tMVs. Estos resultados sugieren que la liberación de HMGB1 en tMVs pudiera ser en respuesta a factores solubles que libera esta línea en particular o bien que su liberación sea posiblemente constitutiva. Con respecto a ello, Shiguang y cols ^[78] indican que las células de la línea HCT 116 de cáncer de colon liberan grandes cantidades de HMGB1 al medio extracelular sin requerir un estímulo exógeno. En cambio, los resultados obtenidos por Wähämaa y cols ^[77] indican que la secreción de HMGB1 en tMVs por la línea Caco-2 (de cáncer de colon), requiere de un estímulo exógeno con citocinas pro-inflamatorias, ya que sin el estímulo las células sólo liberan pequeñas cantidades de HMGB1. Por lo que en el caso de la línea A-427, que demostramos que no libera la HMGB1 en tMVs, es posible que requiera un estímulo para inducir la liberación de HMGB1.

Por lo anterior, si las células tumorales pueden liberar activamente la HMGB1 al medio extracelular en tMVs, es posible que estas células empleen un mecanismo de liberación similar al que llevan a cabo los MØs. La HMGB1 extracelular podría tener un efecto dual: antitumoral o pro-tumoral, que dependerá de la composición del microambiente, del estado de progresión de la enfermedad y de la célula blanco. Se ha reportado que las tMVs son liberadas de las células tumorales por lo que se consideran componentes importantes del microambiente tumoral ^{[79][80]}. Sin embargo, se desconoce si en cáncer pulmonar, la HMGB1 liberada en tMVs activa la respuesta inmune antitumoral, lo cual se ha observado cuando las células tumorales mueren después de tratamientos antitumorales con la quimioterapia y/o radioterapia ^{[54][55][56]}. En cambio, el efecto pro-tumoral de las tMVs se ha reportado por Wysoczynsky y cols ^[83] que demostraron que las tMVs liberadas de líneas celulares de cáncer pulmonar funcionan como factores pro-angiogénicos, que estimulan la quimiotaxis de

células endoteliales, la expresión de moléculas pro-angiogénicas (como el VEGF) en células del estroma e incrementan la expresión de moléculas de adhesión. Por lo que, es conveniente determinar si las líneas celulares empleadas en este trabajo pueden liberar activamente la alarmina HMGB1 en tMVs, así como su actividad biológica.

9. CONCLUSIONES

- La localización de HMGB1 en las células del epitelio bronquial y alveolar normal es nuclear, lo que refleja su principal función como componente de la cromatina
- En el epitelio pulmonar adyacente al tumor y en adenocarcinomas pulmonares la distribución celular de HMGB1 es principalmente en el citoplasma y difiere de la localización observada en el epitelio pulmonar normal
- No existe una asociación entre la localización subcelular de HMGB1 y el grado de diferenciación del tumor
- La HMGB1 es secretada por la línea 1.3.15 de adenocarcinoma pulmonar en tMVs. Sin embargo, se deberá estudiar si las células tumorales de origen pulmonar secretan la proteína HMGB1 en tMVs de manera constitutiva o bien es inducida por algún estímulo
- Ya que en las líneas celulares y en la mayoría de las células tumorales de cortes histológicos presentan una localización citoplasmática de la proteína HMGB1, las líneas celulares pueden emplearse en estudios posteriores a fin de definir el papel biológico de la HMGB1 en carcinomas pulmonares.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hinrichsen, Lucila I. Biología de la célula tumoral. Daniel R. Bonfil, Graciela O. Scharovsky. Oncología molecular y celular. Dunken, 2003: 41-55.
- [2] Ponder B. Cancer genetics. Nature 2001; 411: 336-341.
- [3] Barrett J. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. Environ Health Perspect 1993; 100: 9-20.
- [4] Breuer R, Postmus P, Smit E. Molecular Pathology of Non-Small-Cell Lung Cancer. Respiration 2005; 72:313–333.
- [5] Pitot H, Dragan Y. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. FASEB J 1991; 5: 2280-2286.
- [6] Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. Nature 2001; 411: 390-395.
- [7] Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. Cell 2000; 100: 57-70
- [8] Minna J, Roth J, Gazdar A. Focus on lung cancer. Can cell 2002; 1: 49-52.
- [9] Ruíz L, Rizo P, Sánchez F, Cervantes, Osornio A, García C, et al. Mortality due to lung cancer in Mexico. Lung Cancer 2007; 58: 184-190.
- [10] Tovar V, Antuñado F, Salgado N. Mortalidad por cáncer pulmonar en México, 1980–2000. Rev Panam Salud Pública. 2005; 17(4):254–62.
- [11] Sun S, Schiller J, Gazdar F. Lung cancer in never smokers a different disease. Nat Rev Cancer 2007; 7: 778-790.
- [12] Hecht S. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. Lancet Oncol 2002; 3:461-469.
- [13] Proctor R. Tobacco and the global lung cancer epidemic. Nat Rev Cancer 2001; 1: 82-86.
- [14] Pfeifer G, Denissenko M, Olivier M, Tretyakova N, Hecht S, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. Oncogene 2002; 21(48):7435-51.
- [15] Brambilla E, Travis W, Colby T, Corrinz B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. Eur Respir J 2001; 18: 857–866.
- [16] Breuer R, Postmus P, Smit E. Molecular pathology of non-Small-Cell Lung Cancer. Respiration 2005; 72: 313–330.

-
- [17] Travis D. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002; 23:65-81.
- [18] Sekido Y, Fong K, Minna J. Cancer of the lung. DeVita V, Hellmsn S. *Cancer principles and parctice of oncology*. Lippincott Williams, 2005: 757-811.
- [19] Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001; 357: 1777-1789.
- [20] Chaplin D, MD, PhD. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: S430-435.
- [21] Glenn D. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 11-22.
- [22] McKechnie A, Robins R, Eremin O. Immunological aspects of head and neck cancer: biology, pathophysiology and therapeutic mechanisms. *J R Coll Surg Edinb* 2004; 2(4):187-207.
- [23] Ryungsa K, Manabu E, Kazuaki T. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 21: 1-14.
- [24] Dunn G, Old L. and Schreiber R. The tree Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev Immunol* 2004; 22: 329–60.
- [25] Mark J, Dale I, Trapani J. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2001; 2: 293-299.
- [26] Dunn G, Old L, Schreiber R. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137–148.
- [27] Heath W, Carbone F. Cross-presentation in viral immuniti and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 126-135.
- [28] Mosser D, Edwards J. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 958 969.
- [29] Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296 (5566): 301 – 305.
- [30] Kono H, Rock K. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279-289.
- [31] Bianchi E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5.
- [32] Erlandsson H, Raucci A. Alarmin(g) news about danger, workshop on innate danger signals and HMGB1. *EMBO Rep* 2006; 7: 774–778.

-
- [33] Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cell. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 1-8.
- [34] Lotze M, Zeh H, Rubaerelli A, Sparvero L, Amoscato A, Washburn N. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 60-81.
- [35] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-444.
- [36] Whiteside T. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 2008; 27: 5904-5912.
- [37] Krishnamoorthy S, Honn K. Inflammation and disease progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006 25:481–491.
- [38] Coussens L, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860–867.
- [39] Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the High-Mobility-Group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 9 (8): 5237–5246.
- [40] Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends genet* 1994; 10(3): 94-100.
- [41] Thomas J, Travers A. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 2001; 26(3): 167-174.
- [42] Ellerman J, Brown K, deVera M, Zeh H, Billiar T, Rubartelli A, Lotze M. Masquerader: HighMobility Group Box-1 and Cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13 (10): 2836-2848.
- [43] Bianchi M, Manfredi A. Chromatin and cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1877: 181-186.
- [44] Nadersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey K. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 1084-1091.
- [45] Yang H, Wang H, Czura C, Tracey J. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1-8.
- [46] Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey K, Bustin M, Joost J. Oppenheim High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 59- 66.
- [47] Bianchi E, Manfredi A. High mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007; 220: 35-46.

- [48] Erlandsson H, Andersson U. The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1503–1512.
- [49] Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B. et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 2004; 1773: 307-313.
- [50] Lotze M, Tracey K. High-Mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 331-342.
- [51] Dumitriu I, Baruah P, Manfredi P, Bianchi M, Rovere-Querini P. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol* 2005; 26 (7): 381-387.
- [52] Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 189–201.
- [53] Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Kroemer G. Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death Differ* 2009; 16: 3–11.
- [54] Green D, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 353-363.
- [55] Haynes N, van der Most R, Lake R, Smyth M. Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:1–13.
- [56] Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 2008; 15: 3–12.
- [57] Campana L, Bosurgi L, Rovere-Querini P. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:518–523.
- [58] Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 2003; 22(20): 5551–5560.
- [59] Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti I, Torrisi M, Bianchi M, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002; 3 (10): 995–1001.
- [60] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; 16: 3–11.
- [61] Rauvala H, Rouhiainen A. RAGE as a receptor of HMGB1 (amphoterin): Roles in health and disease. *Curr Mol Med* 2007; 7: 725-734.

- [62] van Beijnum J, Buurman W, Griffioen A. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 2008; 11: 91-99.
- [63] Park J, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim J, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: 917-924.
- [64] Sung J, Svetkauskaite D, Qianbin H, Kim J, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like Receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 7370–7377.
- [65] Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop N, Wang J. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1271–1285.
- [66] Shizuo A. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 38105–38108.
- [67] Völp K, Brezniceanu M, Bösner S, Brabletz T, Kirchner T, Göttel D, et al. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut* 2006; 55: 234–242.
- [68] Kuniyasu H, Chihara Y, Takahashi T. Co-expression of receptor for advanced glycation end products and the ligand amphoterin associates closely with metastasis of colorectal cancer. *Oncol Rep* 2003; 10: 445–448.
- [69] Poser I, Golob M, Buettner R, Bosserhoff A. Upregulation of HMG1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype. *Mol Cell Biol* 2003; 23(8): 2991–2998.
- [70] Wu D, Ding Y, Eang S, Zhang Q, Liu L. Increased expression of high mobility group box I (HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 2008; 216: 167-175.
- [71] Rak Y, Kim H, Kang H, Kim N, Kim J, Park J, et al. Overexpression of High Mobility Group Box 1 in gastrointestinal stromal tumors with KIT Mutation. *Cancer Res* 2003; 63: 2188–2193.
- [72] Logsdon C, Fuentes C, Huang E, Arumugam T. RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* 2007; 7: 777-789.
- [73] Huttunen H, Panula J, Sorci G, Agneletti A, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced. *J Biol Chem* 2000; 275 (51): 40096–40105.

-
- [74] Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* 2007; 17(2): 72-79.
- [75] Bartlin B, Fuchs C, Silber R, Simm A. Fibroblasts mediate induction of high mobility group box protein 1 in lung epithelial cancer cells by diffusible factors. *Int J Mol Med* 2007; 20; 217-224.
- [76] Müller S, Ronfani L, Bianchi E. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med* 2004; 255: 332-243.
- [77] Wähämaa H, Vallerskog T, Qin S, Lunderius C, LaRosa G, Andersson U, et al. HMGB1-secreting capacity of multiple cell lineages revealed by a novel HMGB1 ELISPOT assay. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 129-136.
- [78] Shiguang L, Stolz D, Sappington P, Macias C, Killeen M, Tenhunen J, et al. HMGB1 is secreted by immunostimulated enterocytes and contributes to cytomix-induced hyperpermeability of Caco-2 monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C990–C999.
- [79] Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 581-593.
- [80] Schorey J, Bhatnagar S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* 2008; 9: 871–881.
- [81] Mignot G, Roux S, Thery C, Segura E, Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *J Cell Mol Med* 2006; 10 (2): 376-388.
- [82] Srinikrishna G, Freeze H. Endogenous danger-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* 2009; 11 (7): 615-628.
- [83] Wysoczynski M, Ratajczak M. Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer* 2009; 125 (7): 1595-1603.