



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**LIBERACIÓN DE LA PROTEÍNA HMGB1 POR EFECTO DEL
CISPLATINO EN LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA
PULMONAR**

TESIS

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

PRESENTA

GUILLERMO ANTONIO MONTES ZENTENO



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**

VOCAL: **Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO**

SECRETARIO: **Profesor: DOLORES AGUILAR CÁZARES**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA**

2do. SUPLENTE: **Profesor: SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE CÁNCER PULMONAR, DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN; INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSÍO VILLEGAS”.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Dolores Aguilar Cázares

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Verónica Rojo León

SUSTENTANTE:

Guillermo Antonio Montes Zenteno

Dedicatorias

A mi madre Gesamary Zenteno Alcázar, porque, sin importar el sacrificio, has buscado mi bienestar. Gracias por guiar mi camino y apoyar mis decisiones. Siempre tendré presentes tus enseñanzas y nunca olvidaré el amor que me has dado. Este es un pequeño fruto de tan abundante siembra que has hecho todos estos años.

A mi padre Marco Antonio Montes Flores, porque no importa cuantos libros me han asombrado, ni cuantas historias me hayan fascinado, ni la cantidad de artículos que haya leído; para mí no hay persona más inteligente ni más admirable que mi padre. Gracias por ser mi ejemplo a seguir y tener una respuesta o consejo para todo.

A mi hermana Marcela Montes Zenteno, porque eres la única persona que me hace sonreír aunque haya otros problemas a mi alrededor. Porque eres mi inspiración para seguir adelante. Porque me has enseñado que en esta vida hay que luchar por lo que uno desea y tener la confianza en sí mismo para lograr nuestros objetivos. Gracias por ser la mejor hermana que pude haber tenido. ¡Te quiero!

Porque no por ser pocos dejamos de ser una gran familia.

Agradecimientos

A Maythé Sol, porque gracias a ti me he dado cuenta lo que realmente importa en esta vida, porque eres mi compañera de enojos y alegrías, la confidente de todas mis locas ideas, MI persona y el amor de mi vida.

A mis amigos Chiquita, Tablas y Xoxo por todas las risas, burlas, albures, golpes, cervezas, cafés, insultos, pláticas sin sentido y demás tonterías que han hecho que los considere mi segunda familia.

Al Dr. Sullivan por su gran dedicación a la docencia, por brindarme sabios consejos y regaños, por su paciencia, por todo el tiempo invertido en este proyecto y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

A Dolores Aguilar por su guía, apoyo, consejos y contribución en la realización de este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Cáncer Pulmonar: Manuel, Heriberto, Susana, Ángeles y Paty por sus valiosos consejos y críticas a este trabajo; a Héctor y Olivia por su apoyo dentro del laboratorio; a Vero, Lorenzo, Rubén, Alma, Jimena y Rosalía por sus comentarios y porque hicieron la estancia en el laboratorio mucho más amena. Un agradecimiento especial para Vero por todas las pláticas, consejos y problemas que me ayudó a resolver durante la realización de este trabajo.

A mis amigos de la Preparatoria que siempre recuerdo con mucho cariño y a aquellos que conocí en la Facultad. Gracias por su amistad, he aprendido mucho de cada uno.

A la UNAM y a La Salle porque ambas me han formado académica y personalmente. Espero poder algún día regresarles todo lo que me han dado.

Al Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) por el apoyo durante la realización de este trabajo.

Y a todo aquel que se ha tomado el tiempo de enseñarme lo que disfruta hacer.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER	1
1.2 CÁNCER PULMONAR	3
1.2.1 GENERALIDADES	3
1.2.2 FACTORES DE RIESGO	4
1.2.3 TRATAMIENTO	5
1.2.3.1 CIRUGÍA	5
1.2.3.2 RADIOTERAPIA	5
1.2.3.3 QUIMIOTERAPIA	5
1.3 CISPLATINO	7
1.3.1 MECANISMOS DE ACCIÓN	8
1.3.2 VÍAS DE RESISTENCIA	10
1.4 RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EL RECONOCIMIENTO DEL CÁNCER	10
1.5 MUERTE CELULAR	12
1.5.1 APOPTOSIS	13
1.5.1.1 GENERALIDADES	13
1.5.1.2 VIA INTRÍNSECA	14
1.6 APOPTOSIS INMUNOGÉNICA	16
1.6.1 GENERALIDADES	16
1.6.2 HMGB1	19
1.6.3 OTROS DAMPS INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS INMUNOGÉNICA	20
1.7 OTROS TIPOS DE MUERTE CELULAR	22
2. ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO	26
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 CULTIVO CELULAR	27
6.2 PREPARACIÓN DEL CISPLATINO	27
6.3 DETERMINACIÓN DE LA CI_{50} DEL CISPLATINO POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA	29
6.4 DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR POR TUNEL	29
6.5 LOCALIZACIÓN DE LA HMGB1 POR INMUNOFUORESCENCIA	30
6.6 CUANTIFICACIÓN DE LA HMGB1 POR ELISA	31
6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31

7. RESULTADOS	32
7.1 ADAPTACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES AL MEDIO DE CULTIVO CONDICIONADO CON 1% DE SFB	32
7.2 CI_{50} DE CISPLATINO EN LAS LÍNEAS CELULARES CULTIVADAS EN MEDIO CON 10% Y 1% DE SFB	33
7.3 DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CISPLATINO	35
7.4 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEÍNA HMGB1 POSTERIOR A LA EXPOSICIÓN DE CISPLATINO	37
7.5 DETERMINACIÓN DE LA HMGB1 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CISPLATINO	40
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIONES	47
10. REFERENCIAS	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER

Los procesos de proliferación y diferenciación en las células están altamente regulados por mecanismos complejos de comunicación intercelular. Estos mecanismos limitan la expansión de las células hacia otros tejidos, les permite reconocer a células de la misma estirpe y les indica el momento de dividirse y/o diferenciarse para llevar a cabo una función. La pérdida en el balance de estos mecanismos está asociada al desarrollo del cáncer (Breuer *et al* 2005, Croce *et al* 2008).

Los genes que controlan los eventos celulares antes indicados se clasifican en tres grupos: i) los proto-oncogenes, ii) genes supresores del tumor y iii) genes involucrados en la reparación del DNA. Los proto-oncogenes codifican una serie de productos solubles o proteínas localizadas en la membrana plasmática, citoplasma y núcleo de la célula; estos genes están involucrados en el proceso de división celular. Los genes supresores de tumor regulan a los proto-oncogenes y controlan la proliferación de la célula. En cambio, los genes de reparación del DNA detectan y eliminan alteraciones en el material genético (Breuer *et al* 2005, Croce *et al* 2008).

Mutaciones en los proto-oncogenes por eventos multifactoriales, designados ahora oncogenes, presentan una ganancia de función al ya no ser regulados por los genes supresores de tumor. Asimismo, deleciones o mutaciones en los genes supresores o en genes de reparación del DNA llevan a una pérdida de función lo cual favorece la expresión constitutiva de los proto-oncogenes (Croce *et al* 2008). Por otro lado, trastornos en los mecanismos regulatorios epigenéticos como hipermetilación de genes supresores de tumor, remodelación de la cromatina y modificación en las histonas dan como resultado cambios en proto-oncogenes y genes supresores del tumor. Esto finalmente favorece la proliferación celular excesiva y modela el fenotipo tumoral (You *et al* 2012). A estos cambios cambios en los proto-oncogenes, genes supresores del tumor y genes de reparación del DNA se le llama carcinogénesis y para propósitos de

estudio se ha dividido en tres etapas: iniciación, promoción y progresión (Breuer *et al* 2005, Barrett *et al* 1993).

Durante el proceso de iniciación, la célula presenta mutaciones o alteraciones en su material genético debido a la actividad genotóxica de un agente carcinogénico. Estas mutaciones causan una inestabilidad genómica dentro de la célula iniciada. La promoción es el proceso donde ocurre una multiplicación descontrolada de las células en presencia del carcinógeno. Esto funciona como promotor de una mayor cantidad de alteraciones, originando una población precancerosa heterogénea. Finalmente, la progresión es la transformación en células malignas, las cuales han acumulado una serie de mutaciones aleatorias. Las células neoplásicas son seleccionadas de manera natural por poseer funciones que favorecen el crecimiento del tumor y su diseminación hacia otros tejidos (Breuer *et al* 2005, Barrett *et al* 1993).

El proceso de carcinogénesis es un conjunto de interacciones entre el microambiente tumoral, la inestabilidad genómica del tumor y las estrategias de adaptación del mismo. Estos factores originan un alto grado de heterogeneidad genómica y fisiológica dentro del tumor, produciendo distintos fenotipos malignos que determinarán el comportamiento clínico y su respuesta al tratamiento (Gillies *et al* 2012). Las células malignas son seleccionadas durante la carcinogénesis con base en las propiedades moleculares, bioquímicas y celulares que favorezcan su proliferación. Éstas han sido descritas por Hanahan y Weinberg, quienes indican que las células tumorales poseen características como son: el sustento de señales proliferativas, la insensibilidad a factores supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, potencial de replicación ilimitada, inducción de angiogénesis, activación de las funciones de invasión y metástasis, inestabilidad del genoma, la reprogramación del metabolismo energético celular, el microambiente proinflamatorio promovido por las células tumorales y la evasión del sistema inmunológico (Hanahan *et al* 2011).

1.2 CÁNCER PULMONAR

1.2.1 GENERALIDADES

El cáncer constituye actualmente uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. Las estadísticas indican que más de 7 millones de personas en todo el mundo mueren anualmente a causa de esta enfermedad y se espera que esta cifra siga aumentando (Parkin *et al* 2005 y Globocan 2008). En nuestro país, durante el año 2009, murieron cerca de 70,000 personas a consecuencia de tumores malignos (INEGI 2011).

De entre todos los tipos de cáncer, el de pulmón se ha establecido como uno de los más importantes debido a su alta prevalencia en el mundo. Las estadísticas indican que el cáncer pulmonar ocupa el primer lugar en mortalidad y el tercero en incidencia considerando ambos sexos a nivel mundial (Globocan 2008). Respecto a la edad, el 50% de los pacientes está por arriba de los 65 años y el 30% tiene más de 70 años al momento de ser diagnosticados (Rossi *et al* 2006, Globocan 2008). En México, el cáncer de pulmón representa la principal causa de muerte por neoplasias malignas en varones y se ha incrementado el número de decesos en mujeres (Globocan 2008, INEGI 2011). Uno de los principales problemas de este tipo de cáncer es que el diagnóstico se da generalmente en estadios avanzados.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), los carcinomas pulmonares se clasifican, con base en sus características histológicas, patológicas y clínicas, en dos tipos principales. El primero es el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) al cual pertenecen aproximadamente el 15% de todos los casos de cáncer de pulmón. Se localiza principalmente en las vías aéreas centrales y se asocia a un origen neuroendócrino (Herbst *et al* 2008, Minna *et al* 2002). El segundo tipo es el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) el cual representa el 85% de todos los casos y abarca tres tipos histológicos: el carcinoma epidermoide o de células escamosas, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma. Este último, es el tipo histológico más frecuente en México y en el mundo. El adenocarcinoma se encuentra localizado en la periferia del pulmón y surge a partir de células

bronquioalveolares o de células productoras de mucina (Brambilla *et al* 2001, Minna *et al* 2002).

1.2.2 FACTORES DE RIESGO

El hábito tabáquico es la principal causa de cáncer pulmonar en el mundo. Esto es debido a la actividad carcinogénica de más de 5,000 compuestos químicos contenidos en un cigarrillo (Thielen *et al* 2008, Talhout *et al* 2011). De acuerdo a la OMS, 5.4 millones de muertes a nivel mundial relacionadas al cáncer pulmonar se le atribuyen al hábito tabáquico. Si esta tendencia continúa, se anticipa que para el año 2025 morirán 10 millones de personas (Talhout *et al* 2011). Sin embargo, otros estudios indican que solo el 11% de los fumadores pesados presentan esta enfermedad (Risch *et al* 2008).

El humo del tabaco contiene más de 20 carcinógenos específicos. Entre ellos destaca los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzo[a]pireno y compuestos nitrogenados como la nitrosamina 4-(metilnitrosamin)-1-(3-piridil)-1 butanona (NNK). En el humo del tabaco los carcinógenos inducen inter e intracruzamientos en el DNA, y aunado a la presencia de promotores, dan lugar al desarrollo del cáncer pulmonar (Minna *et al* 2002, Hecht *et al* 2002).

Por otro lado, el 20% de los casos de cáncer pulmonar están asociados a otros factores ambientales y/o genéticos. Dentro de los factores ambientales se encuentra la exposición a asbestos, humo de leña o carbón, radón y algunos metales pesados (Minna *et al* 2002). En cuanto a factores genéticos, algunos polimorfismos en genes relacionados con enzimas de detoxificación como la familia glutatión-S-transferasa (GST) o la familia de enzimas P450, se asocian con la susceptibilidad al cáncer pulmonar (Hecht *et al* 2002). Asimismo, alteraciones en los genes involucrados en la reparación del DNA y procesos inflamatorios como: *TP53*, *STK11/LKB1*, *KRAS*, *EGFR*, *ALK*, *PIK3CA*, *FGFR1* y *PTEN* están relacionados al desarrollo del cáncer pulmonar (Couraud *et al* 2012 y Heist *et al* 2012).

1.2.3 TRATAMIENTO

Durante las dos últimas décadas, el tratamiento contra el cáncer pulmonar ha mejorado sustancialmente; no obstante, aún persisten algunas dificultades. La más importante es el diagnóstico de la enfermedad en etapas tardías ya que en el 70% de estos casos el tumor se encuentra en fase de metástasis (De Petris *et al* 2006, Rossi *et al* 2006). La terapia en contra del cáncer de pulmón incluye:

1.2.3.1 CIRUGÍA

La resección del tumor por cirugía es aún la opción más consistente y exitosa para la curación de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar en etapas tempranas. Sin embargo, para que esta opción sea posible, el tumor debe ser completamente extirpable y el paciente debe tolerar la intervención quirúrgica. A pesar del avance tecnológico en procedimientos de menor invasividad, muchos de los pacientes son diagnosticados en etapas tardías y son mayores de edad. Estas características limitan la aplicación de este tipo de terapia (Molina *et al* 2008).

1.2.3.2 RADIOTERAPIA

La radiación ionizante se utiliza para eliminar células tumorales, reduciendo así el tamaño del tumor. Las innovaciones en la radioterapia permiten liberar altas dosis de radiación exclusivamente en el área del tumor, lo que lleva a una menor toxicidad. Sin embargo, la radioterapia se administra en pacientes diagnosticados en etapas tempranas lo que reduce su aplicación en la población. También es utilizada en combinación con la quimioterapia o posterior a la resección del tumor (Molina *et al* 2008, Golden *et al* 2012).

1.2.3.3 QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia se refiere al uso de compuestos químicos, solos o en combinación con otros, para eliminar a las células tumorales. Los fármacos antineoplásicos se utilizan en casos donde el tumor se encuentra diseminado por el organismo, lo cual representa aproximadamente el 70% de los pacientes diagnosticados con NSCLC. También está

indicada su administración después de procesos de resección quirúrgica o en tumores con un mayor grado de malignidad como es el caso del SCLC. (Molina *et al* 2008, Minna *et al* 2002).

Los fármacos antitumorales ejercen su función de acuerdo con su naturaleza, concentración, mecanismo de acción, así como del fenotipo y genotipo de la célula neoplásica. Dependiendo de lo anterior, la quimioterapia desencadena distintos tipos de muerte celular como son apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica, entre otros. Sin embargo, dentro del tumor se puede dar una selección de aquellas células que, a través de mutaciones, adquieren resistencia frente al fármaco antitumoral. Esto lleva a una resistencia generalizada al tratamiento quimioterapéutico (González *et al* 2001, Gillies *et al* 2012). En la **Tabla 1** se muestra una clasificación de los principales compuestos citotóxicos que son empleados en el tratamiento de enfermedades malignas.

A pesar de la variedad de fármacos antineoplásicos existentes y los múltiples esquemas terapéuticos que se han desarrollado, en cáncer de pulmón no se ha obtenido el éxito esperado cuando se compara con otros tipos de neoplasias. Recientemente, se han identificado genes que se encuentran mutados en una porción significativa de pacientes con cáncer pulmonar. Gracias a esto, se han desarrollado moléculas inhibitorias o anticuerpos monoclonales que bloquean la acción de proteínas mutadas con funciones protumorales (Ma *et al* 2009). Muchas de las terapias que se desarrollan actualmente tienen como blanco receptores con dominios de unión a cinasas de tirosina (por ejemplo: *ALK*, *ROS1*, *EGFR*, *HER2*, *FGFR1* y *PDGFRA*) o a proteínas involucradas en sus vías de señalización como: *RAS-RAF-MAPK* y *PI3K-AKT* (Heist *et al* 2012, Ma *et al* 2009).

Sin embargo, aun con este tipo de terapia, no se ha observado un incremento en la supervivencia de los pacientes con cáncer pulmonar, por lo que se abre la posibilidad para otras opciones en el tratamiento antitumoral (Kirkwood *et al* 2012).

Tabla 1.1 Características de algunos de los compuestos citotóxicos usados comúnmente en contra de neoplasias Adaptado de Zitvogel et al 2008

Clasificación	Características	Ejemplos
Antimetabolitos	Incluyen a los análogos endógenos de nucleósidos de pirimidina y purina, así como antagonistas de la vía del ácido fólico.	<i>5-fluorouracilo</i> <i>Gemcitabine</i>
Agentes alquilantes	Relacionados químicamente con las mostazas nitrogenadas. Se unen al DNA mediante grupos alquilo inhibiendo la replicación del DNA.	<i>Melfalan</i> <i>Ciclofosfamida</i>
Antraciclinas	Son agentes intercalantes entre pares de bases de las cadenas de DNA o RNA, por lo que inhiben su síntesis y la replicación celular.	<i>Mitoxantrona</i> <i>Doxorubicina</i>
Compuestos platinados	Compuestos que contienen en su estructura platino. Poseen la propiedad de formar enlaces intra e intercatenarios en el DNA, inhibiendo su replicación y transcripción.	<i>Cisplatino</i> <i>Oxaliplatino</i>
Perturbadores del huso mitótico	Los taxanos desestabilizan la unión de la tubulina en los microtúbulos, por lo que detienen la división celular. Los alcaloides de la vinca destruyen el huso mitótico durante la división celular, por lo que la célula no puede proliferar.	<i>Paclitaxel</i> <i>Docetaxel</i> <i>Vincristine</i> <i>Vinorelbine</i>

1.3 CISPLATINO

Actualmente, en México y en el mundo, el *cis*-diamin-dicloro-platino ó cisplatino (CDDP) es la terapia estándar en contra del cáncer pulmonar. Este fármaco antitumoral se utiliza generalmente en combinación con otros compuestos según el esquema terapéutico elegido (Sculier *et al* 2010). El cisplatino pertenece al grupo de los compuestos platinados. Este fármaco fue descubierto accidentalmente hace más de 40

años y continúa siendo de los más utilizados, no solo en contra del cáncer pulmonar, sino en cáncer de ovario, testículo, colorectal y de cabeza y cuello (Kelland 2007).

1.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN

Se ha descrito que el cisplatino se incorpora a la célula a través de la proteína transportadora del cobre 1 (CTR1). Una vez en el citoplasma, el cisplatino sufre una hidrólisis debido a la baja concentración de iones cloruro en comparación con el medio extracelular. Esta modificación vuelve al cisplatino altamente reactivo, por lo que se une a varias especies nucleofílicas tanto en el citoplasma como en el núcleo. Es en este último, donde se une a bases purínicas del DNA en su sitio N7, formando intra e intercruzamientos conocidos como aductos. Estos aductos pueden repararse vía la maquinaria de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER). Si la cantidad de aductos es masiva, éstos activarán una serie de proteínas pro-apoptóticas (principalmente la proteína supresora de tumor p53) las cuales provocarán la muerte celular (**Figura 1.1**) (Kelland 2007, Galluzzi *et al* 2012a, Siddik 2003, Fuertes *et al* 2002). Es importante señalar que el tipo de muerte por el que la célula tumoral sucumbe depende de la concentración de cisplatino a la que es expuesta, la fase del ciclo celular en que se encuentre, así como la estirpe a la que pertenezca (Gonzalez *et al* 2001).

Por otro lado, el cisplatino puede tener un efecto benéfico para el sistema inmunológico. Se ha descrito que este fármaco disminuye la expresión del ligando de muerte programada 2 (PD-L2) en linfocitos T, lo que evita la muerte de estas células. En células tumorales, el cisplatino aumenta la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), así como la permeabilidad a la granzima B. Esto permite que la célula tumoral sea reconocida y destruida por el sistema inmunológico (Galluzzi *et al* 2012b).

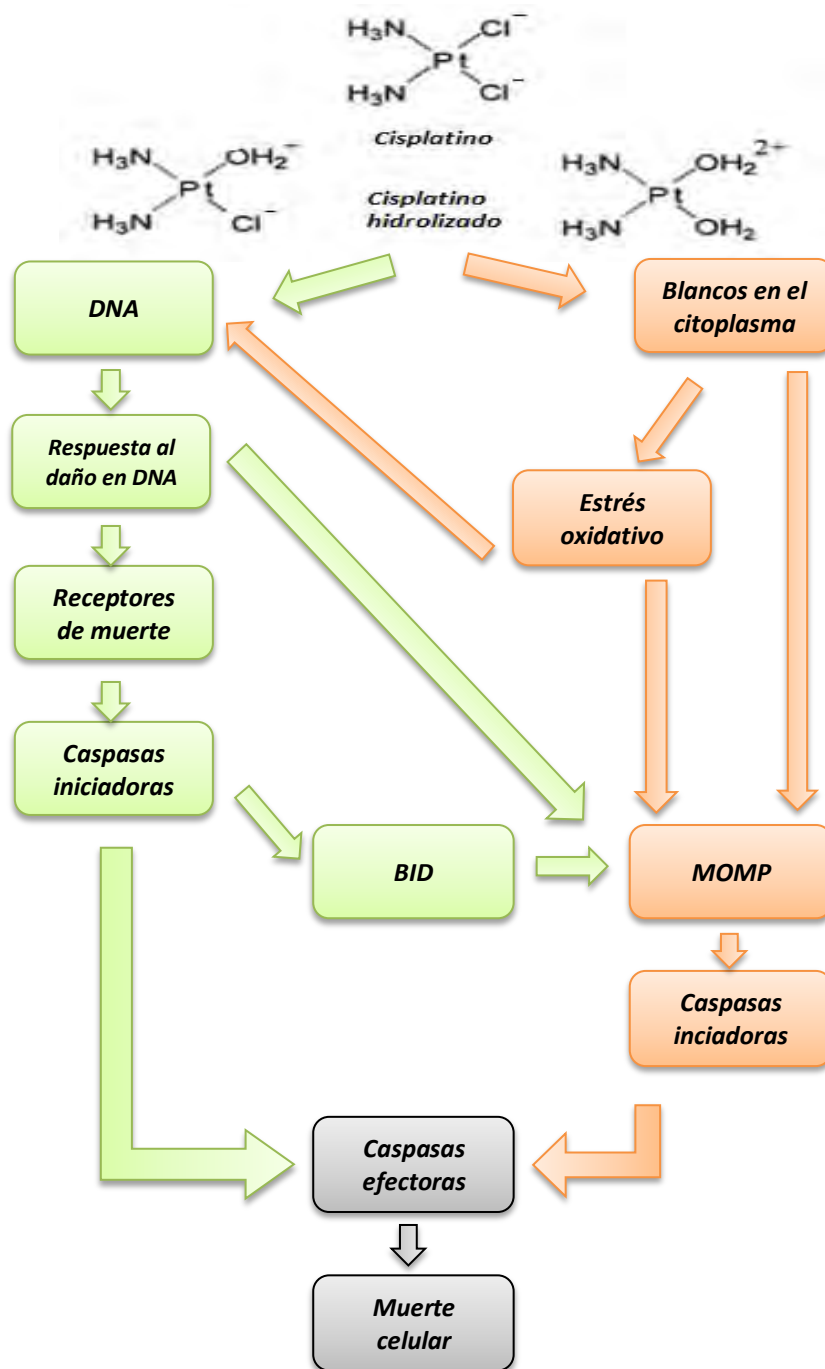


Figura 1.1 Mecanismo de acción del cisplatino. Una vez que el cisplatino entra a la célula, es hidrolizado inmediatamente. Esto hace que pueda reaccionar con diferentes moléculas tanto en el núcleo como en el citoplasma, causando la activación de mecanismos de reparación del DNA y un estrés oxidativo generalizado, respectivamente. Lo anterior, activa a las proteínas involucradas tanto en la vía de la apoptosis intrínseca como de la extrínseca, lo que llevará finalmente a la activación de caspasas iniciadoras y efectoras culminando en la muerte celular. BID.- Agonista de muerte con dominio de interacción con BH3; MOMP.- Permeabilización de la membrana externa de la mitocondria. Adaptado de Galluzi et al 2012a

1.3.2 VÍAS DE RESISTENCIA

Generalmente, el cisplatino induce una recuperación terapéutica inicial asociada con la estabilización de la enfermedad. Sin embargo, parte de los pacientes con cáncer de pulmón son intrínsecamente resistentes a la terapia con cisplatino, e incluso, los pacientes originalmente sensibles eventualmente desarrollan quimioresistencia (Kelland 2007, Galluzzi *et al* 2012a, Fuertes *et al* 2002).

Los factores que se relacionan con la resistencia al cisplatino se clasifican en cuatro categorías (Galluzzi *et al* 2012a):

- ➔ **Resistencia antes del blanco.**- Incluye una disminución en la expresión de la proteína transportadora del cobre (CTR1) involucrada en la entrada del cisplatino a la célula, un incremento de algunas ATPasas que aumentan el flujo de salida del fármaco y la sobreexpresión de proteínas como el glutatión, la GST y las metalotioneinas, involucradas en la inactivación del cisplatino.
- ➔ **Resistencia en el blanco.**- Involucra un aumento en la capacidad de la vía de reparación NER, un aumento en la eficiencia del complejo de recombinación homóloga y una disminución en la expresión de proteínas de unión al cisplatino.
- ➔ **Resistencia después del blanco.**- Mutaciones en genes involucrados en la vía de señalización celular pro-apoptótica como *TP53*, *ΔNp63α*, *MAPK1*, *c-JUN*, entre otros.
- ➔ **Resistencia independiente del blanco.**- Alteraciones en proteínas cuya función afectan indirectamente la citotoxicidad del cisplatino dentro de la célula como *HER2*, *DYRK1B* y el fenómeno de la autofagia.

1.4 RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EL RECONOCIMIENTO DEL CÁNCER

Para que el sistema inmunológico inicie el reconocimiento de las células transformadas se han planteado dos procesos. Por un lado, las células pre-malignas y malignas poseen un gran número de mutaciones en su genoma. Esto origina la síntesis de antígenos tumorales que pueden anclarse en moléculas de clase I del MHC. Estos antígenos tumorales sirven como una señal de lo “no propio” para las células del

sistema inmunológico innato, por lo que éstas se activan y llevan a cabo su función efectora sobre la célula tumoral. A pesar de esto, la velocidad de proliferación del tumor y las mutaciones que van adquiriendo las células malignas durante el proceso de carcinogénesis rebasan la capacidad de reconocimiento y eliminación de células neoplásicas por parte del sistema inmunológico (Ryungsa *et al* 2007, Dunn *et al* 2004a, Dunn *et al* 2004b).

El segundo proceso se conoce como el “modelo de daño”. Este modelo considera que la muerte de las células malignas a consecuencia de las condiciones de alto estrés celular en el microambiente tumoral, conduce a la liberación de señales de peligro que alertan y reclutan células del sistema inmunológico en la zona de desarrollo del tumor. Esto lleva a una activación del sistema inmunológico para inducir una respuesta específica en contra de las células tumorales (Matzinger 2002). En la **Tabla 1.2** se muestran algunas de las células pertenecientes al sistema inmunológico que participan en contra del tumor.

Tabla 1.2 Principales células del sistema inmunológico innato y adaptativo que participan en contra del tumor. Adaptado de Garg *et al* 2010

Células del Sistema Inmunológico	Características generales
INMUNIDAD INNATA	
<p>Células Presentadoras de Antígeno (APC)</p>	<p>Las APCs incluyen a células dendríticas (DCs) y macrófagos. Tienen un papel crucial en la presentación de antígenos tumorales. Su maduración después de haber estado en contacto con “señales de daño” inicia una serie de procesos que llevan a la activación de respuestas de células T antígeno-específicas.</p>
<p>Células Natural Killer (NK)</p>	<p>Generalmente, son las primeras células del sistema inmunológico en estar en contacto con el tumor. Su activación se puede dar por: no expresión de moléculas de clase I del MHC en la célula tumoral, una mayor expresión de los receptores de activación en la célula NK ó la detección de ligandos del receptor NKG2D como MICA y MICB en las células malignas.</p>

Células T- $\gamma\delta$

Son consideradas la fuente temprana más importante de IFN- γ . Pueden reconocer proteínas de choque térmico (HSP's), MICA y MICB expresadas en la membrana de las células tumorales, matando a éstas por citotoxicidad directa.

Macrófagos y Neutrófilos

Representan la clase más importante de células fagocíticas y pueden activarse por productos de estrés tumoral a través de receptores tipo Toll (TLRs). Pueden secretar citocinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y NOS).

INMUNIDAD ADAPTATIVA**Linfocitos T cooperadores ó Células T CD4⁺**

Son las principales orquestadoras de la respuesta inmunológica adaptativa. A través de la secreción de citocinas, contribuyen al aumento en la proliferación y activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs), así como en la maduración de DCs.

Linfocitos T citotóxicos (CTLs) ó Células T CD8⁺

Estas células son las que tienen un mayor potencial citocida. Los linfocitos T CD8⁺ son activados por DC maduras y por citocinas secretadas a partir de linfocitos T CD4⁺. Los CTL's pueden reconocer y eliminar células tumorales a partir de la secreción de perforina monomérica (la cual, cuando se polimeriza, forma huecos en la membrana plasmática de la célula tumoral, permitiendo el flujo de agua y iones), granzima B (una serin-proteasa que activa las vías de apoptosis extrínseca e intrínseca) y la activación de receptores de muerte membranales en la célula tumoral como FAS, TNFR, DR4 y DR5.

1.5 MUERTE CELULAR

La muerte celular tiene una función central en la morfogénesis, el desarrollo, la homeostasis y en los mecanismos de defensa de organismos pluricelulares. La muerte celular se ha clasificado durante décadas por sus características morfológicas. Recientemente, se han tratado de unificar los conceptos dentro de una clasificación basada en eventos bioquímicos que se presentan en la célula destinada a morir (Webb *et al* 1997).

1.5.1 APOPTOSIS

1.5.1.1 GENERALIDADES

La apoptosis es el proceso fisiológico, altamente regulado, en el que la célula desensambla gradualmente su estructura y degrada su DNA con el objetivo de inducir su propia muerte sin perder la integridad de la membrana. Este evento está evolutivamente conservado ya que es básico para el mantenimiento de la homeostasis en cualquier organismo multicelular. Aparte, la apoptosis tiene un papel defensivo debido a que favorece la eliminación y remoción de células infectadas, mutadas o dañadas (Webb *et al* 1997, Hotchkiss *et al* 2009).

El proceso de apoptosis se puede dividir en tres etapas: la primera fase es la iniciación, donde la célula recibe un estímulo inductor de muerte; la segunda etapa, llamada de ejecución, es donde ocurren la mayor parte de los cambios bioquímicos y morfológicos característicos del proceso; en la tercera fase, o de eliminación, los cuerpos apoptóticos resultantes del proceso son retirados por células fagocíticas (Webb *et al* 1997).

La apoptosis presenta ciertas características morfológicas y bioquímicas que la diferencian de otros tipos de muerte celular, como son: la retracción del citoplasma, la pérdida de contacto con la matriz extracelular, la formación de cuerpos apoptóticos, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, en cuanto a morfología se refiere. Respecto a los cambios bioquímicos, los principales son: activación de caspasas, activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hengartner 2000, Webb *et al* 1997).

Según el Nomenclature Committee on Cell Death 2012, se han descrito y caracterizado al menos dos vías de señalización para la ejecución de la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca (Galluzzi *et al* 2012c). Se ha propuesto que el cisplatino activa la vía intrínseca de la apoptosis debido a la presencia de una gran cantidad de blancos a nivel del citoplasma, lo que lleva a un aumento en el estrés intracelular (Galluzzi *et al* 2012a).

1.5.1.2 VIA INTRÍNSECA

Esta vía está basada en el estrés intracelular que causan algunos agentes y/o condiciones del microambiente como son el daño al DNA, estrés oxidativo, aumento en el Ca^{2+} citosólico, acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, entre otros. El estrés intracelular, dispara una propagación y señalización de moléculas pro- y anti-apoptóticas en la membrana mitocondrial, la cual se vuelve permeable cuando las primeras predominan sobre las segundas. La permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), se debe a la creación de poros formados por las proteínas pro-apoptóticas Bak y Bax aunado a la formación del complejo del poro de transición de la permeabilidad (PTPC). La permeabilización de la membrana mitocondrial tiene consecuencias letales como: i) la disminución del potencial transmembranal de la mitocondria ($\Delta\Psi_m$) lo que inhibe la síntesis de ATP, así como otros procesos asociados al $\Delta\Psi_m$; ii) la liberación de proteínas tóxicas del espacio intermembranal mitocondrial al citosol como son: el citocromo c (CYTC), el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G (ENDOG), la proteína de bajo punto isoeléctrico de unión directa a IAPs (DIABLO) y la proteína de requerimiento a altas temperaturas A2 (HTRA2); y iii) la inhibición de la cadena respiratoria, aumentando la producción de ROS, dando en conjunto, un circuito de amplificación de la señal apoptótica (**Figura 1.2**) (Hengartner 2000, Galluzzi *et al* 2012c).

Por su parte, una vez liberado de la mitocondria, el CYTC citosólico participa junto con la APAF1 y el dATP en la formación del apoptosoma. Este complejo recluta y activa a la caspasa 9, la cual a su vez activa a las caspasas efectoras (-3,-6-y -7). Por otro lado, en un mecanismo independiente de caspasas, AIF y ENDOG se relocalizan en el núcleo donde median la fragmentación del DNA. Además, DIABLO y HTRA2 impiden la función anti-apoptótica de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's) (Kroemer *et al* 2007, Galluzzi *et al* 2012c, Chipuk *et al* 2008, Häcker *et al* 2007, Hengartner 2000).

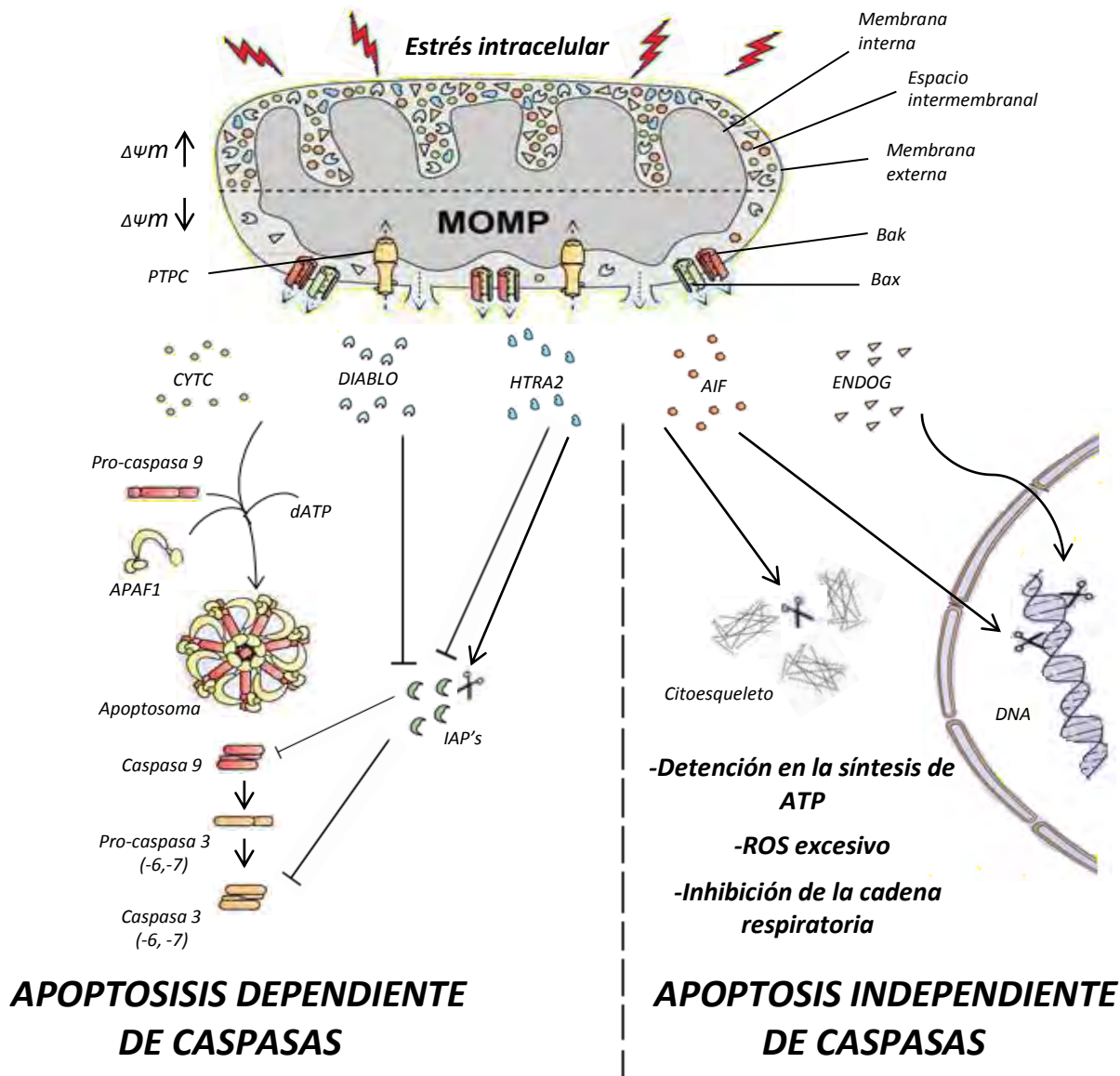


Figura 1.2 Vía intrínseca de la apoptosis. En respuesta a una condición de estrés intracelular (por ejemplo, daño al DNA, cambio en el flujo de Ca^{2+} , etc.) se generan señales pro- y anti-apoptóticas que convergen en la mitocondria. Cuando las señales de muerte prevalecen, se da la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria (MOMP). Esto lleva a la disipación del $\Delta\Psi_m$, el arresto en la síntesis de ATP, el desacoplamiento de la cadena respiratoria, el aumento de ROS y, principalmente, la liberación de las proteínas confinadas en el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol. Dentro de estas, el CYTC junto con la proteína APAF1 y dATP ensamblan el apoptosoma, un complejo multiproteico que tiene como finalidad activar el eje proteolítico caspasa 9 \rightarrow caspasa 3. La proteína DIABLO y HTRA2 facilitan la activación de caspasas al secuestrar y/o degradar IAPs. Por otro lado, AIF y ENDOG actúan de una manera independiente de caspasas al localizarse en el núcleo y mediar la fragmentación del DNA. Adaptado de Galluzzi et al 2012c.

1.6 APOPTOSIS INMUNOGÉNICA

1.6.1 GENERALIDADES

Por mucho tiempo, la participación del sistema inmunológico en la terapia antitumoral ha sido ignorada debido a varios factores. El primero es que la quimioterapia y la radioterapia inducen apoptosis en las células tumorales. Este tipo de muerte ha sido catalogado como no inmunogénico, o incluso tolerogénico, debido a las moléculas que se expresan y/o liberan durante el proceso (Kepp *et al* 2011, Zitvogel *et al* 2008). El segundo factor radica en que los compuestos citotóxicos utilizados en la quimioterapia son inmunosupresores ya que afectan directamente a células del sistema inmunológico. Además, la administración de corticoides con el objetivo de disminuir efectos secundarios provocados por la quimioterapia como vómito, náuseas, etc., producen inmunosupresión. Finalmente, los protocolos para desarrollar fármacos antitumorales tienen como modelo el uso de ratones inmunodeficientes. Esto no permite analizar respuestas tumor-específicas del sistema inmunológico como consecuencia de la terapia (Kepp *et al* 2011, Zitvogel *et al* 2008).

En años recientes, la visión dogmática de que la terapia antitumoral tiene un efecto inmunosupresor ha sido cuestionada por varias líneas de investigación. Estos estudios indican que algunos fármacos citotóxicos, a pesar de inducir apoptosis en la célula tumoral, provocan una muerte inmunogénica (Kepp *et al* 2011, Garg *et al* 2010, Tesniere *et al* 2008). La inmunogenicidad de las células tumorales que mueren a causa de estos fármacos antineoplásicos, está mediada por un grupo de moléculas conocidas como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Dentro de estos DAMPs se encuentra el grupo de las alarminas. Las alarminas son moléculas intracelulares que se encuentran ejerciendo funciones específicas en las células viables, pero adquieren una propiedad inmunoestimulante al ser liberadas de las células dañadas (Kono *et al* 2008, Kroemer *et al* 2007). Estas moléculas ayudan a que procesos como la captura, procesamiento y presentación de antígenos tumorales sean más eficientes en las APCs. Las alarminas también promueven la maduración de DCs y la posterior secreción de citocinas pro-inflamatorias. Una vez que la DC madura, puede presentar

antígenos tumorales a los linfocitos T CD4⁺ y de manera cruzada a los linfocitos T CD8⁺, los cuales pueden madurar y ejercer su capacidad citotóxica sobre la célula tumoral. En conjunto, las alarminas ayudan a que se induzca una respuesta inmunológica específica en contra del tumor (**Figura 1.4a**) (Kepp *et al* 2011). Por lo tanto, lograr una respuesta inmunogénica causada por el tratamiento, dependerá de: i) el tipo de célula que muere, ii) el lugar donde muere, iii) el tipo de muerte que presente, iv) las alarminas que exprese o libere, v) las APCs que la fagociten y vi) la posibilidad de un reconocimiento de antígenos tumorales por parte del sistema inmunológico. Debido a que este tipo de apoptosis en la célula tumoral provoca la activación de la respuesta inmunológica a través de las alarminas, se le ha denominado apoptosis inmunogénica (Zitvogel *et al* 2008, Tesniere *et al* 2008, Kepp *et al* 2011).

La importancia de este proceso radica en que el tratamiento induce un modo de muerte en las células malignas que permite establecer una respuesta inmunológica específica en contra del tumor. Esta respuesta inmunogénica favorece la eliminación de células malignas residuales y células resistentes al tratamiento quimioterapéutico, que muchas veces, son la causa del relapso del cáncer en los pacientes.

Para lograr que se induzca una respuesta inmunológica específica por medio de la apoptosis inmunogénica, no solo se tiene que provocar la liberación y/o expresión de DAMPs, sino también lograr su aparición de una manera espacio-temporal (**Figura 1.4b**) (Zitvogel *et al* 2010).

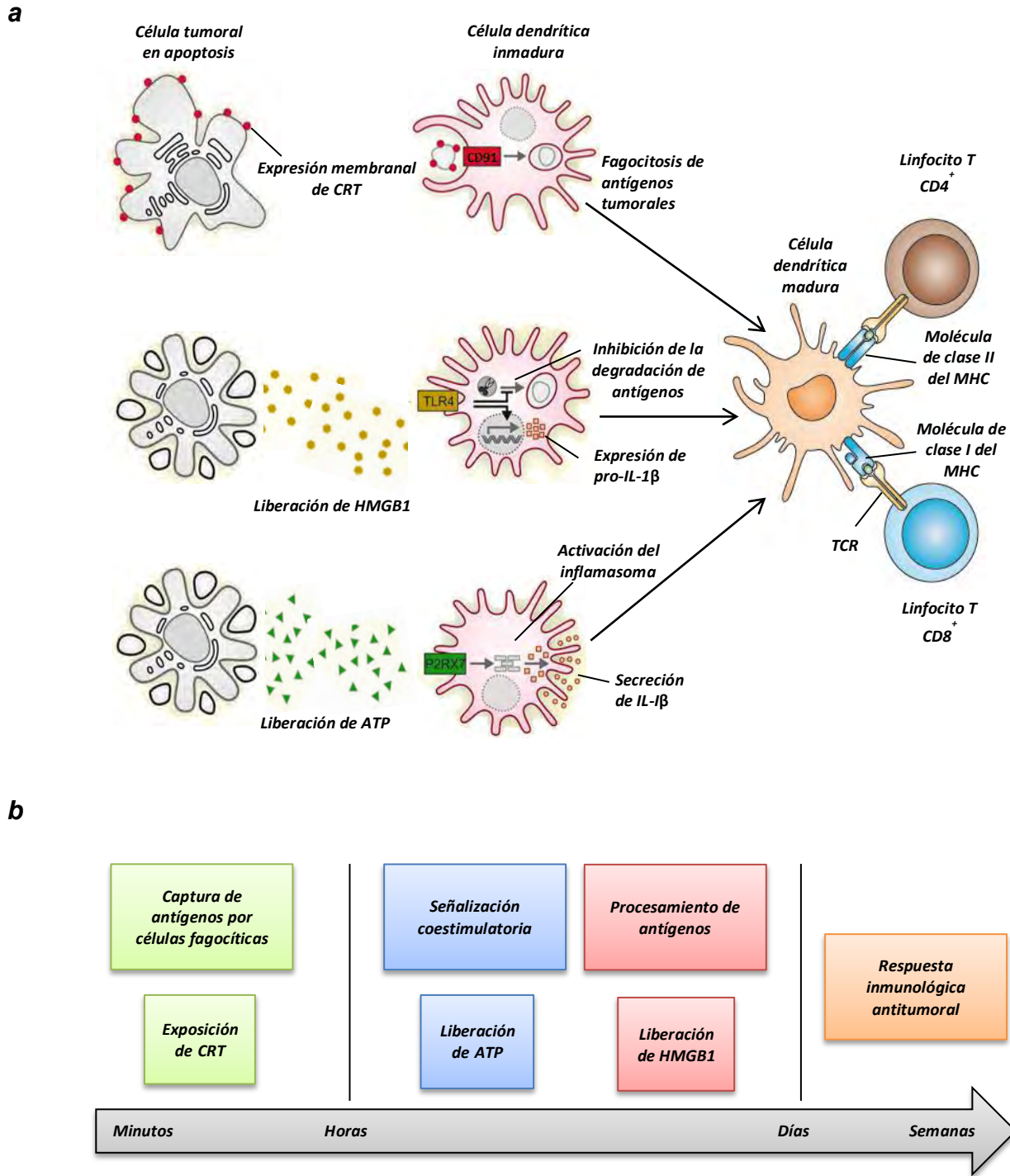


Figura 1.4 Apoptosis inmunogénica. **a** Las células que presentan este evento, exponen rápidamente en su membrana plasmática la proteína residente de retículo endoplásmico calreticulina (CRT). Esta es identificada a través del receptor CD91 en la DC. Su unión induce la fagocitosis y captura de antígenos tumorales. Horas después del tratamiento con quimioterapia inmunogénica (antraciclina, oxaliplatino, radiación ionizante, entre otros) la célula tumoral libera HMGB1 y ATP. La proteína HMGB1 puede unirse al TLR4 en las DCs para inhibir la degradación lisosomal de antígenos tumorales, favoreciendo su procesamiento y presentación; aparte de favorecer la síntesis del precursor de IL-1 β . Por otro lado, el ATP

extracelular puede unirse al receptor purinérgico P2RX7 en las DCs, estimulando el ensamblaje y activación del inflammasoma NLRP3 y finalmente la secreción de IL-1 β . Estas señales, junto con las de otros DAMPs aun por identificar, inducen la maduración de las DCs y el favorecimiento de una respuesta Th1, en donde se activan, tanto linfocitos CD4⁺ como linfocitos CD8⁺ logrando así inducir una respuesta inmunológica específica antitumoral. **b** Para que se lleve a cabo la apoptosis inmunogénica, debe darse la expresión y/o liberación de DAMPs en orden específico de manera espacio-temporal como se muestra en la figura. Adaptado de Kepp et al 2011.

1.6.2 HMGB1

Una de las alarminas más estudiadas es la proteína del grupo de alta movilidad caja 1 (HMGB1). La HMGB1 es una proteína nuclear de 30KDa altamente conservada en los organismos. Está compuesta por 3 dominios: una caja A, una caja B y un dominio terminal C cargado negativamente. Dentro del núcleo de las células vivas, la HMGB1 regula la transcripción de genes al modificar la estructura helicoidal del DNA y participa en algunos mecanismos de reparación del material genético (Tang *et al* 2010b). Sin embargo, la HMGB1 también puede ser liberada de las células, para lo cual se han descrito dos procesos. Por un lado, las células que mueren por necrosis pierden la integridad de su membrana. De esta forma, HMGB1 es liberada pasivamente al medio extracelular donde adquiere una función proinflamatoria. Por otro lado, las células del sistema inmunológico como macrófagos y células dendríticas pueden secretar HMGB1 cuando se encuentran activadas (Tang *et al* 2010b). Se ha propuesto que este tipo de secreción es provocada por una serie de modificaciones post-traduccionales en la proteína. Estos cambios hacen que la HMGB1 pierda afinidad por el DNA y salga del núcleo para ser liberada finalmente a través de vesículas secretorias (Gardella *et al* 2002).

Una vez liberada por cualquiera de los dos procesos, HMGB1 puede unirse al receptor de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE), TLR2, TLR4, TLR9 y CD24. Recientemente, se ha descrito que HMGB1 también puede unirse a proteínas nucleares, citoplasmáticas y del medio extracelular. Estos complejos mejoran la señalización a través de los receptores de la proteína a los que se une HMGB1 (Lotze *et al* 2005, Scaffidi *et al* 2002, Ulloa *et al* 2006, Bell *et al* 2006, Chen *et al* 2009, Hreggvidsdóttir *et al* 2012).

Ya que se ha demostrado que el tratamiento antitumoral induce la muerte de las células malignas, la proteína HMGB1 también es liberada por las células neoplásicas que mueren por el proceso de apoptosis inmunogénica. El mecanismo en que se libera esta proteína aún no se conoce con exactitud. Se ha propuesto que el tratamiento causa la muerte de una gran cantidad de células tumorales en poco tiempo. Esto provoca que las células en apoptosis que no son removidas rápidamente pierdan la integridad de su membrana plasmática liberando su contenido intracelular de manera pasiva. Una vez que HMGB1 forma parte del microambiente tumoral, constituye una señal de “encuéntrame”, esto es, una señal quimiotáctica. Dicha señal promueve el reclutamiento de células del sistema inmunológico. Una vez en el sitio del tumor, la HMGB1 puede unirse al receptor TLR4 presente en la DC. Esta unión causa una señalización a través de la vía MyD88 dando como consecuencia la inhibición de la unión entre el lisosoma y el fagosoma, evitando así la degradación de los antígenos tumorales capturados previamente por la DC. Este proceso permite el procesamiento de dichos antígenos y su presentación tanto en moléculas de clase II del MHC, como de manera cruzada en moléculas de clase I. Por otro lado, la HMGB1 también puede estimular la síntesis de precursores de citocinas proinflamatorias en la DC como la pro-IL-1 β , fundamental para polarizar una respuesta de linfocitos Th1 y para la producción de moléculas proinflamatorias como IFN- γ lo que favorece una respuesta inmunológica específica contra antitumoral (**Figura 1.4**) (Tang *et al* 2010b, Apetoh *et al* 2007a, Apetoh *et al* 2007b).

1.6.3 OTROS DAMPS INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS INMUNOGÉNICA

Recientemente, varios grupos de investigación han demostrado la gran importancia de HMGB1 dentro de la apoptosis inmunogénica. Sin embargo, se ha observado que no solo basta con esta alarmina para inducir una respuesta inmunológica antitumoral (Zitvogel *et al* 2008, Tesniere *et al* 2008, Kepp *et al* 2011).

Uno de los DAMPs mejor caracterizados es la calreticulina (CRT). Esta es una proteína residente del retículo endoplásmico. Ayuda en el plegamiento de proteínas y participa en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular. Sin embargo, cuando las células son tratadas

con fármacos que promueven la apoptosis inmunogénica, la CRT es externalizada en la membrana plasmática de las células tumorales en forma de parches. Este proceso ocurre a tiempos muy cortos posteriores a la exposición con el fármaco. La exposición de la CRT tiene una función de “cómeme”. Dicha señal puede ser reconocida por la DC a través de su receptor CD91/LRP1, lo que induce la fagocitosis de la célula apoptótica y la captura de antígenos tumorales (Obeid *et al* 2007a, Panaretakis *et al* 2009, Gold *et al* 2009). Otra de las alarminas caracterizadas dentro de la apoptosis inmunogénica es el ATP. Esta molécula es fundamental para la realización de todas las funciones celulares dependientes de energía. Sin embargo, se ha demostrado que a tiempos intermedios del proceso de apoptosis inmunogénica, el ATP puede secretarse de forma activa por un proceso dependiente de la autofagia en células tumorales. Una vez en el espacio extracelular, el ATP puede unirse al receptor purinérgico P2RX7 en la DC. Dicha señal resulta en el ensamblaje y activación del inflamasoma NLRP3, lo que lleva a la activación y secreción de la citocina IL-1 β . Esta interleucina es fundamental para la activación eficiente de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, así como para la producción de IFN- γ por CTLs. (Michaud *et al* 2011, Ghiringhelli *et al* 2009). Otras alarminas que se han caracterizado son las proteínas de choque térmico (HSPs). Estas proteínas pueden liberarse al medio extracelular o expresarse en la membrana plasmática de células tumorales en proceso de apoptosis inmunogénica. Las HSPs tienen una función de “cómeme” y representan otra ruta para la fagocitosis de la célula tumoral en apoptosis (Spisek *et al* 2007). El ácido úrico también se ha descrito como alarmina. Esta molécula tiene la capacidad de activar el inflamasoma al igual que el ATP, por lo que puede representar otra vía para la producción de IL-1 β en la DC (Martinon *et al* 2006). Por otro lado, existen alarminas que no se ha aclarado si participan en la activación de una respuesta inmunológica antitumoral; algunos ejemplos son: los nucleosomas, el DNA de doble cadena, las galectinas, la tioredoxina, las proteínas S100, las catelicidinas, las defensinas y los péptidos N-formilados provenientes de la mitocondria (Bianchi 2007).

1.7 OTROS TIPOS DE MUERTE CELULAR

Aparte de la apoptosis, se han descrito otros tipos de muerte celular con base en observaciones morfológicas y/o bioquímicas (Galluzzi *et al* 2012c). Dentro de los más importantes se encuentran:

Necrosis.- Morfológicamente se caracteriza por un aumento en el volumen celular, rompimiento de la membrana plasmática y una pérdida subsecuente del contenido intracelular. Se ha considerado por muchos años que la necrosis es un evento accidental, sin control por parte de la célula y que ocurre en circunstancias patológicas; sin embargo, recientemente se ha observado que la ejecución de la muerte celular por necrosis puede ocurrir de manera regulada (Golstein *et al* 2007).

Necrosis secundaria.- Se refiere a un fenómeno presente en fases de apoptosis tardía. Si los cuerpos apoptóticos no son removidos rápidamente por células fagocíticas, pueden llegar a perder la integridad de su membrana y liberar el contenido intracelular, semejándose al proceso de necrosis (Green *et al* 2009).

Catástrofe mitótica.- Es un evento de muerte que ocurre durante o después de la mitosis celular. Es morfológicamente identificable por la micronucleación y/o arresto mitótico de las células antes de que éstas adopten una morfología apoptótica o necrótica (Vakifahmetoglu *et al* 2008).

“Muerte celular autofágica”.- A pesar de que el término sugiere que la muerte celular es ejecutada por medio de la autofagia, en realidad el evento de muerte es acompañado por el fenómeno de autofagia. En este proceso no existe una condensación de la cromatina y su característica más importante es la vacuolización masiva presente en el citoplasma de la célula. La autofagia se ha descrito como un mecanismo de resistencia al estrés celular (Kroemer *et al* 2008, Kroemer *et al* 2010).

Debido a lo anterior, es importante estudiar el tipo de muerte u otros eventos que en las células tumorales puede inducir el cisplatino a las diferentes concentraciones empleadas y si durante estos procesos se lleva a cabo la liberación de la alarmina HMGB1, la cual participa en la inducción de una respuesta inmune en contra del tumor.

2. ANTECEDENTES

Recientemente se ha observado en modelos animales que algunos fármacos antineoplásicos inducen la apoptosis de células tumorales, la cual está acompañada de la liberación y/o expresión de moléculas que activan al sistema inmunológico. Se ha reportado que las células apoptóticas inducen potentes respuestas antitumorales cuando son inyectadas de manera subcutánea, en la ausencia de algún adyuvante, en ratones singénicos inmunocompetentes (Casares *et al* 2005, Obeid *et al* 2007a). Ratones inoculados con células tumorales que murieron por apoptosis inmunogénica, son protegidos en contra de retos subsecuentes con células tumorales vivas. Este efecto se pierde en ratones atímicos *nu/nu* ó con el empleo de anticuerpos neutralizantes para bloquear linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ ó al eliminar por knockout componentes fundamentales de la respuesta inmunológica como IFN- γ , IFN- γ R, IL-1 β , IL-1 β R, constituyentes del inflamasoma, así como los DAMPs implicados hasta ahora en el proceso de la apoptosis inmunogénica (Apetoh *et al* 2007a, Apetoh *et al* 2007b, Ghiringhelli *et al* 2009). Este tipo de muerte inmunogénica también se ha observado en modelos *in vitro* de cáncer colorectal (células CT26), fibrosarcoma (células MCA205), mama (células TSA), osteosarcoma (células GSO) y timoma (células EL4) (Panaretakis *et al* 2009, Tesniere *et al* 2010).

El primer grupo de fármacos antineoplásicos en los que se describió la apoptosis inmunogénica fue en el grupo de las antraciclinas (doxorubicina, idarubicina y mitoxantrona). El grupo de Kroemer y Zitvogel reportaron que las antraciclinas generan un estrés a nivel de retículo endoplásmico, lo que induce la externalización de la CRT y la liberación de la HMGB1 (Obeid *et al* 2007a, Apetoh *et al* 2007b). Posteriormente, otros grupos han coincidido en la importancia de la liberación de HMGB1 junto con la exposición y/o liberación de otros DAMPs para generar una respuesta inmunológica antitumoral (Schiavoni *et al* 2011, Garg *et al* 2012). Estos grupos han propuesto otros fármacos antineoplásicos capaces de activar una respuesta en contra del tumor por medio del proceso de apoptosis inmunogénica, destacando la radiación ionizante con luz UV y rayos γ (Obeid *et al* 2007c), el oxaliplatino (Tesniere *et al* 2010) y el

bortezomib (Spisek *et al* 2007). Existen reportes indicando que la terapia fotodinámica basada en hipericina (Hyp-PDT) (Garg *et al* 2012), la ciclofosfamida (Schiavoni *et al* 2011), los anticuerpos anti-EGFR (Garrido *et al* 2012), el vinblastine (Tanaka *et al* 2009) y los glucósidos cardiacos (Menger *et al* 2012) pueden estimular la liberación y/o expresión de alarminas en la célula tumoral dañada.

Como ya se mencionó anteriormente, la proteína HMGB1 es una alarina necesaria para que se lleve a cabo el proceso de apoptosis inmunogénica. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la HMGB1 de manera extracelular puede causar distintos efectos en las células tumorales dependiendo de su estado redox y de las proteínas a las que se encuentre unida. La cisteína 106 de la HMGB1 es fundamental para determinar el estado redox de la proteína y, dependiendo de esto, tendrá distintas funciones (Yang *et al* 2010). El grupo de Lotze describió que la forma reducida de la HMGB1 extracelular puede unirse al receptor RAGE, induciendo un estado de autofagia en la célula tumoral. Este proceso promueve resistencia a muchos de los compuestos antineoplásicos incluyendo al oxaliplatino, melfalán, doxorubicina, paclitaxel y luz UV en modelos tumorales de colon y de páncreas (Tang *et al* 2010a). Por otro lado, se ha reportado que la forma oxidada de HMGB1 es liberada durante el proceso de apoptosis de células no malignas, lo que se ha asociado con una muerte tolerogénica. (Kazama *et al* 2008). Con respecto a la unión de HMGB1 con otras proteínas intra y extracelularmente, una de las interacciones más importantes es el complejo que forma HMGB1 con p53. Este complejo regula el balance entre la muerte celular tumoral y su supervivencia ya que p53 es un regulador negativo del complejo HMGB1/Beclin 1, el cual promueve procesos de resistencia como la autofagia (Livesey *et al* 2012).

Estos reportes abren la posibilidad de determinar si el cisplatino induce la liberación de la proteína HMGB1 de las células tumorales en apoptosis, favoreciendo así la apoptosis inmunogénica y en consecuencia la activación del sistema inmunológico para generar una eficaz respuesta antitumoral.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer pulmonar es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. En México, se encuentra entre los primeros lugares en incidencia y mortalidad dentro de la población. Debido a esto, actualmente se tienen diversos tratamientos antitumorales a nivel clínico, dentro de los cuales, los más empleados son la cirugía, la radioterapia localizada, la quimioterapia o la combinación de éstas.

Recientemente, se ha reportado que varios agentes quimioterapéuticos pueden inducir un tipo de estrés y muerte celular que puede estimular la participación de la respuesta inmunológica. Esto implica que las células tumorales que han muerto pueden servir como una “vacuna” terapéutica que estimule una respuesta inmunológica antitumoral. Este tipo de respuesta controlaría algunos de los problemas más comunes que se presentan en la terapia contra el cáncer como son las células tumorales residuales y la resistencia a la quimioterapia.

A nivel mundial, el cisplatino es el principal agente antitumoral utilizado en contra del adenocarcinoma pulmonar, el tipo histológico más frecuente en los pacientes con cáncer de pulmón. Este fármaco tiene como principales mecanismos de acción la formación de aductos en el DNA y generar estrés oxidativo. Por lo tanto, debido a su amplio uso en la clínica, es de vital importancia determinar si el cisplatino induce apoptosis inmunogénica en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar, a través de la medición de la expresión y/o liberación de uno de las alarminas más estudiadas dentro del proceso de apoptosis inmunogénica: la proteína HMGB1.

4. HIPÓTESIS

Si el cisplatino induce apoptosis inmunogénica en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar se observará un cambio en la distribución subcelular de la HMGB1, así como su liberación al medio extracelular.

5. OBJETIVO

Determinar si el cisplatino induce apoptosis inmunogénica en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar, mediante un cambio en la distribución subcelular de la HMGB1 así como su subsecuente liberación.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Adaptar gradualmente las líneas celulares al medio condicionado con 1% de suero fetal bovino.
- ❖ Determinar la concentración inhibitoria 50 de cisplatino en las líneas celulares cultivadas en medio conteniendo suero fetal bovino al 1% y 10%.
- ❖ Determinar si el cisplatino induce apoptosis en las líneas celulares empleadas.
- ❖ Observar un cambio en la distribución celular de la HMGB1 en las líneas celulares tratadas con cisplatino.
- ❖ Determinar si las líneas celulares liberan la HMGB1 al sobrenadante en respuesta al cisplatino.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CULTIVO CELULAR

Se estudiaron 4 líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Las líneas celulares A-549 y SK-LU-1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y las líneas 1.3.11 y 3B1A se establecieron a partir del derrame pleural de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar sin tratamiento previo (López González *et al* 1998).

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (*HyClone, UT, USA*) al 10% (v/v). Las células se adaptaron gradualmente al medio suplementado con 1% de SFB (v/v). 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 la viabilidad de las células tumorales mediante tinción por exclusión con azul tripano (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*). El conteo y ajuste de concentración de células para los distintos ensayos se realizó empleando la cámara de Neubauer. De la suspensión celular obtenida se procedió a cultivar en: i) portaobjetos con cámara de 8 ó 4 pozos (*Falcon BD, Bedford, USA*), ii) placas de 96 pozos (*Nunclon, Roskilde, Denmark*) y iii) botellas de 25 o 80 cm² (*Nunclon, Roskilde, Denmark*).

6.2 PREPARACIÓN DEL CISPLATINO

La solución de cisplatino (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) se preparó a una concentración final de 3.3 mM utilizando como disolvente solución de NaCl al 0.9%. La solución de cisplatino se guardó en alícuotas a -70°C hasta su uso.

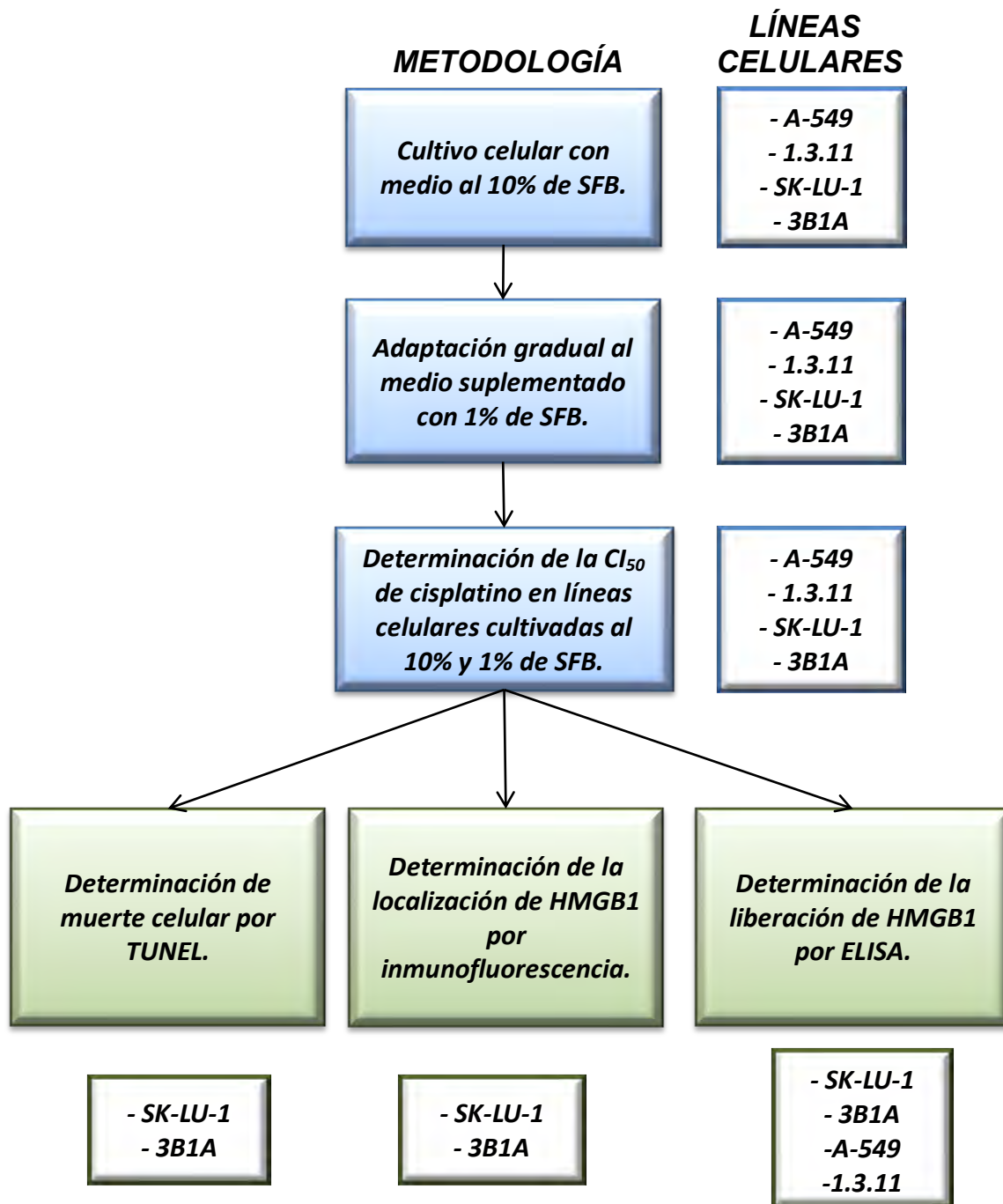


Figura 6.1 Metodología llevada a cabo para el protocolo experimental. Se adaptaron cuatro líneas celulares a un medio suplementado con 1% SFB. En cada línea se determinó la CI_{50} del cisplatino, para posteriormente llevar a cabo la determinación de: i) apoptosis; ii) localización de la HMGB1 y iii) liberación de la HMGB1.

6.3 DETERMINACIÓN DE LA CI_{50} DEL CISPLATINO POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

Después de haberse formado la monocapa celular en placas de 96 pozos, las células se trataron con diferentes concentraciones de cisplatino en 100 μ L por 24 h. El sobrenadante se almacenó y las células se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2.5% (v/v). Una vez que se lavaron las células con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4, se adicionó la solución de cristal violeta (*Merck, Darmstadt, Germany*) al 0.2% (w/v) por 15 min. Después de un lavado exhaustivo con PBS, las células se lisaron con una solución de ácido acético al 33% (v/v) por 20 min. Finalmente, se tomó lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Multiskan Ascent (*Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) empleando una longitud de onda de 540 nm. Cada ensayo requirió: i) un blanco, consistente en pozos sin células cultivadas para considerar la absorbancia que pudieran presentar los reactivos utilizados; ii) un control de tratamiento, consistente de un pozo con células sin tratar para tener un valor equivalente al 0% de mortalidad y poderlo comparar contra los valores de células expuestas al cisplatino. Cada condición se realizó al menos por triplicado. A continuación se muestra la fórmula empleada para calcular el porcentaje de mortalidad de cada condición:

$$\% \text{ de Mortalidad} = 100 - \left(\frac{\text{Células tratadas} - \text{Blanco}}{\text{Células no tratadas} - \text{Blanco}} \times 100 \right)$$

6.4 DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR POR TUNEL

Una vez formada la monocapa celular en portaobjetos con cámara de 8 pozos, las células se trataron con diferentes concentraciones de cisplatino por 24 h. A continuación, las células se lavaron con PBS pH 7.4 y se fijaron con una solución de formaldehído al 3.7% (v/v) por 10 min. Se determinó la muerte celular utilizando el kit TumorTACS™ *In Situ* Apoptosis Detection Kit (*Trevigen Inc, Gaithersburgh, MD, USA*) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante. En breve, se bloqueó la

peroxidasa endógena de las células fijadas con una solución de H₂O₂ al 3% (v/v) en metanol por 5 min. Posteriormente, las células se incubaron con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y con nucleótidos marcados con biotina a 37°C por 1 h. Finalmente se incubaron con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa por 10 min a T.A. Las células TUNEL-positivas fueron reveladas usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno y fueron contrateñidas con el colorante verde de metilo. De cada condición, se tomaron micrografías en un aumento de 40x (magnificación total 400x) con un microscopio óptico Leica modelo DMLB (*Leica Geosystems St. Gallen, Switzerland*). Las imágenes se adquirieron utilizando el software LAS V.3.6.0. Cada ensayo requirió: i) un control negativo, consistente en células sin tratamiento para comprobar la viabilidad de las células en condiciones normales; ii) un control negativo de la reacción, consistente en omitir la enzima TdT para comprobar que no hay marcaje inespecífico; iii) un control positivo, consistente en células sin tratamiento y, una vez fijadas, expuestas a un tratamiento con nucleasa por 1 h para comprobar que el sistema funciona correctamente.

6.5 LOCALIZACIÓN DE LA HMGB1 POR INMUNOFLUORESCENCIA

Después de formada la monocapa celular en portaobjetos con cámara de 8 pozos, las células se trataron con diferentes concentraciones de cisplatino en 100µL por distintos tiempos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS pH 7.4 y se fijaron con etanol absoluto por 15 min. A continuación, las células se rehidrataron y fueron permeabilizadas con una solución de SDS en PBS al 1% (w/v) durante 5 min. Después de lavar, las células se incubaron con la solución bloqueadora (PBS y suero de cerdo al 2% (v/v)) durante 30 min a T.A. Las células se incubaron con el anticuerpo (Ac) primario policlonal de conejo anti-HMGB1 humana (*Abcam, Cambridge, UK*) toda la noche a 4°C en cámara húmeda; la dilución empleada fue 1:150 establecida como óptima. Posteriormente, las células se incubaron con el Ac anti-conejo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes, CA, USA*) a 32°C por 1.5 h; la dilución empleada fue de 1:150 establecida previamente como óptima. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con la solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (*Sigma*

Aldrich, St. Louis, MO, USA) usando una dilución 1:150 establecida previamente como óptima. Finalmente, a las laminillas se les adicionó medio de montaje Vectashield (*Vector Laboratories, CA, USA*) para observarlas en un microscopio de fluorescencia marca Leica modelo DMLB. Se adquirieron las fotos con el software LAS V 3.6.0. En cada ensayo se empleó un control de pegado inespecífico que consistió en omitir el Ac primario y adicionar el anticuerpo secundario.

6.6 CUANTIFICACIÓN DE LA HMGB1 POR ELISA

De los ensayos para determinar la CI_{50} de cisplatino, se recuperaron los sobrenadantes los cuales se centrifugaron a 2000 rpm a 4°C por 10 min para remover restos celulares y se congelaron a -70°C hasta su uso. Para medir la HMGB1 presente en los sobrenadantes se utilizó el kit HMGB1 ELISA (*Shino-Test Co., Tokio, Japan*) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante. Se tomó lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Multiskan Ascent empleando una longitud de onda de 450 nm. En cada ensayo se realizó: i) una curva estándar de la HMGB1; ii) un control positivo que consistió en adicionar una dilución de la HMGB1 recombinante para comprobar que el sistema funciona correctamente; iii) un blanco que consistió en omitir el sobrenadante para considerar la absorbancia que pudieran tener los reactivos utilizados; iv) un control de medio para considerar la cantidad de la HMGB1 presente en el medio de cultivo. Cada condición se realizó por duplicado.

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron expresados mediante las siguientes medidas de resumen. La medida de tendencia central para las variables continuas fue la media aritmética y como medida de dispersión se empleó la desviación estándar. Se utilizó la prueba *t* de Student para comparar la mortalidad entre dos grupos. Se consideró como diferencia significativa una $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 ADAPTACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES AL MEDIO DE CULTIVO CONDICIONADO CON 1% DE SFB

Uno de los objetivos del trabajo fue medir la proteína HMGB1 en el sobrenadante de los cultivos. Para determinar si el SFB utilizado contiene dicha proteína, se cuantificó la HMGB1 presente en el medio suplementado con diferentes porcentajes de SFB empleando la técnica de ELISA (*Tabla 7.1*).

Tabla 7.1 Concentración de HMGB1 en el medio RPMI-1640 suplementado con SFB

Porcentaje de SFB	HMGB1 ng/mL
10%	4.65
5%	2.93
1%	0.9

SFB.- Suero fetal bovino

Ya que se encontraron concentraciones altas de la HMGB1 en el medio suplementado con 10% de SFB, se realizó un proceso de adaptación celular que consistió en disminuir gradualmente el porcentaje de SFB en los cultivos. En cada etapa de este proceso se determinó la viabilidad de las líneas celulares. La viabilidad celular se mantuvo arriba del 85% en las líneas empleadas (*Tabla 7.2*).

Tabla 7.2 Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares

Línea celular	Medio de cultivo conteniendo: (Promedio ± D.E.)			
	10% SFB	7.5% SFB	5% SFB	1% SFB
3B1A	93.8 ± 1.4	86.9 ± 1.6	85.8 ± 5.2	91.7 ± 2.6
SK-LU-1	95.6 ± 1.5	93.7 ± 2.1	92.3 ± 2.9	95.1 ± 2.1
A-549	96.9 ± 1.3	96.2 ± 0.9	94.3 ± 1.4	95.9 ± 1.3
1.3.11	90.5 ± 2.2	87.7 ± 0.6	87.8 ± 2.1	87.9 ± 3.4

D.E.- Desviación estándar. SFB.- Suero fetal bovino

7.2 CI_{50} DE CISPLATINO EN LAS LÍNEAS CELULARES CULTIVADAS EN MEDIO CON 10% Y 1% DE SFB

Para comparar el efecto del cisplatino entre las distintas líneas celulares, se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) del fármaco en cada línea cultivada en medio al 10% de SFB por tinción con cristal violeta.

Las 4 líneas celulares mostraron una CI_{50} de cisplatino particular. Es de notar que las líneas SK-LU-1 y 3B1A necesitaron el doble de concentración del fármaco para alcanzar la CI_{50} al compararse con las líneas A-549 y 1.3.11 (**Tabla 7.3**).

Tabla 7.3. CI_{50} de cisplatino en las líneas celulares

Línea Celular	Cisplatino (μM)
A-549	20
1.3.11	25
SK-LU-1	40
3B1A	40

Para determinar si las líneas celulares suplementadas con 1% de SFB presentan la misma sensibilidad al cisplatino, se evaluó la CI_{50} del fármaco en estas células. Las curvas dosis-respuesta de las líneas celulares en ambas condiciones no presentan diferencias significativas (prueba t de Student $p > 0.05$), por lo que el proceso de adaptación no afectó la sensibilidad de las líneas al cisplatino (**Figura 7.1**).

Los cultivos celulares expuestos a concentraciones de hasta $40\mu M$ de cisplatino presentan un aumento en el porcentaje de mortalidad celular; en particular la línea 1.3.11 que alcanzó el 90% de mortalidad. Sin embargo, en las 3 líneas celulares restantes, a pesar de que se aumente varias veces más la concentración de la CI_{50} de cisplatino, el porcentaje de mortalidad no incrementa (**Figura 7.1**). Las observaciones morfológicas realizadas en los cultivos celulares expuestos a la CI_{50} de cisplatino con microscopía de luz sugieren características apoptóticas; mientras que, a concentraciones mayores del fármaco la morfología celular es distinta al evento de apoptosis.

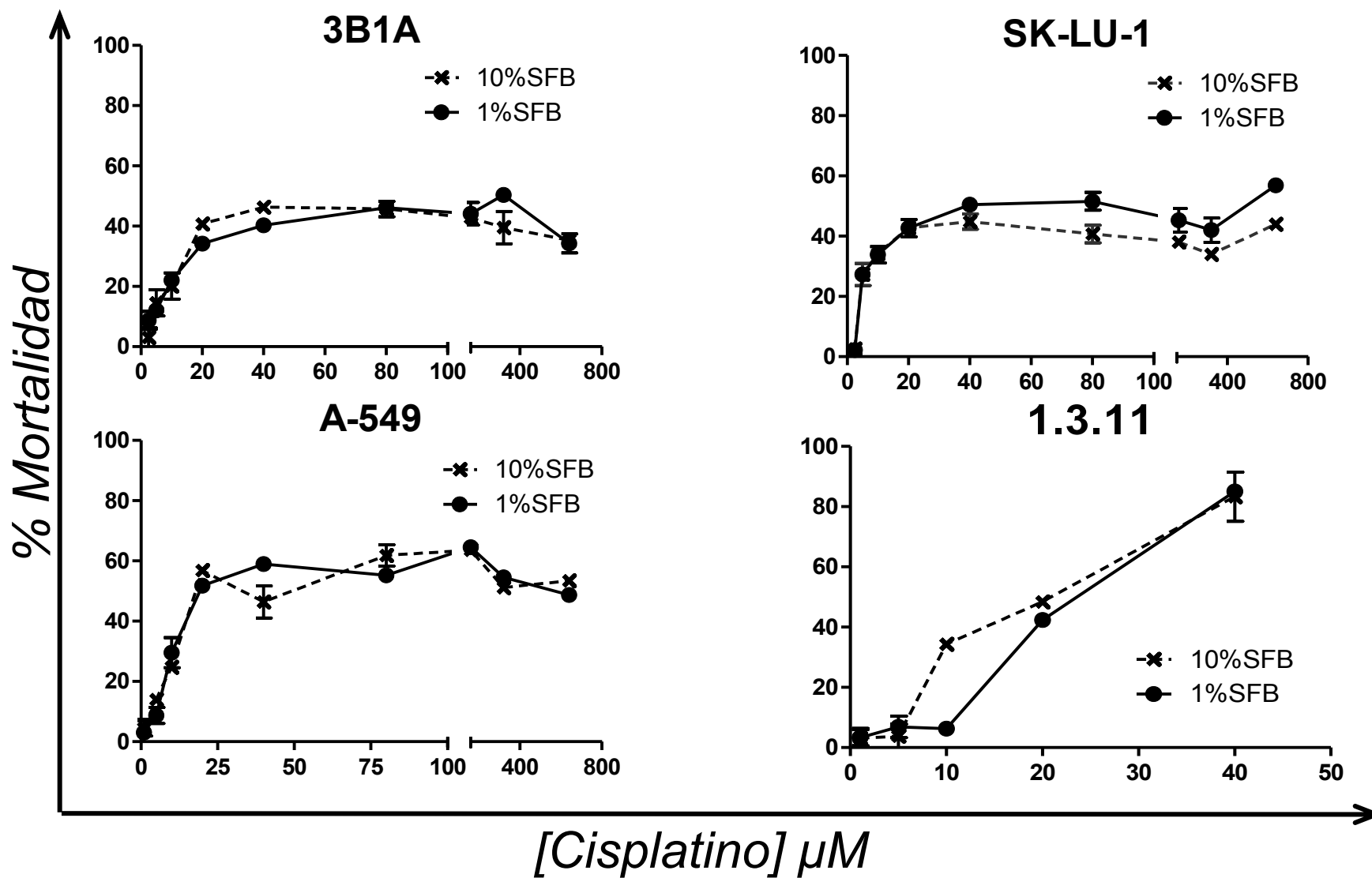


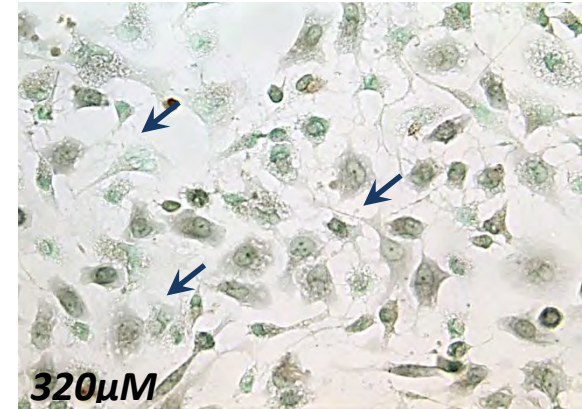
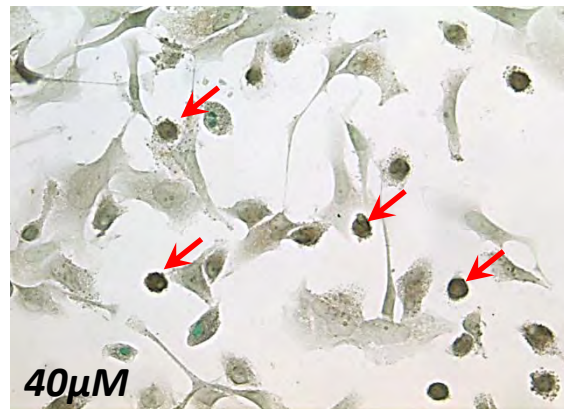
Figura 7.1 Porcentaje de mortalidad en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar inducido por cisplatino. Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% y 1% de SFB y se expusieron a diferentes concentraciones de cisplatino por 24 h. Se realizaron dos ensayos por cuadruplicado. Se indica la media y la desviación estándar.

7.3 DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CISPLATINO

En las líneas 3B1A y SK-LU-1 tratadas con la CI_{50} de cisplatino, se encontraron células positivas para TUNEL. Estas células muestran un núcleo condensado y una disminución en el tamaño celular, las cuales son características del evento de apoptosis. Se encontró un aumento de células TUNEL-positivas con respecto al control sin tratamiento. Sin embargo, en ambas líneas celulares tratadas con concentraciones mayores a la CI_{50} de cisplatino, se encontraron muy pocas células TUNEL-positivas. La mayoría de las células presenta una morfología distinta a la de un evento apoptótico, destacando la aparición de prolongaciones en el citoplasma y en ocasiones vacuolización del mismo (**Figura 7.2**).

Estos resultados sugieren que el cisplatino induce muerte celular con características de apoptosis en las células tratadas con la CI_{50} ; sin embargo, a concentraciones mayores, el fármaco parece promover otro fenómeno en las células que no es la muerte por efecto del cisplatino.

3B1A



SK-LU-1

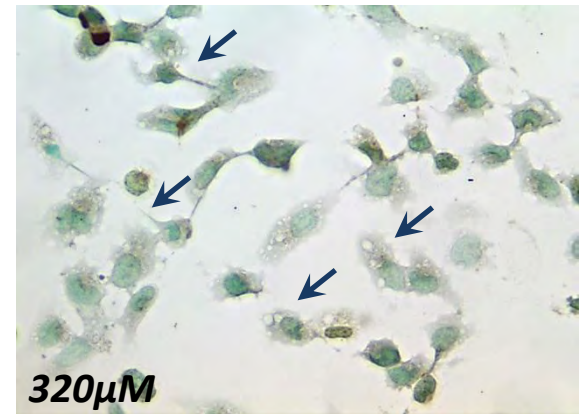
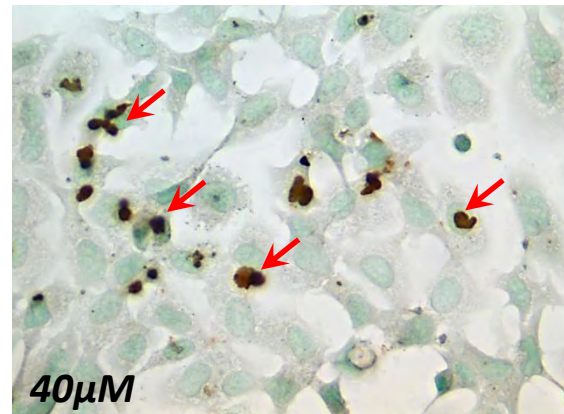
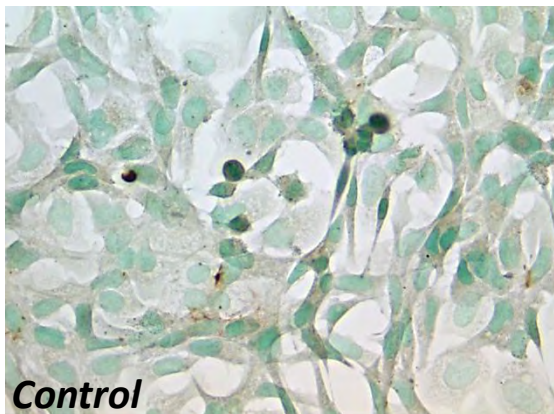


Figura 7.2. Muerte celular inducida por cisplatino en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de cisplatino por 24 h. Las micrografías muestran las células TUNEL-positivas (flechas rojas) y las células TUNEL-negativas pero con cambios morfológicos como alargamiento y presencia de vacuolas (flechas azules). Aumento total 400x.

7.4 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEÍNA HMGB1 POSTERIOR A LA EXPOSICIÓN DE CISPLATINO.

Posteriormente, se estudió el efecto que induce el cisplatino en la localización de la HMGB1 a distintos tiempos. En las líneas celulares 3B1A y SK-LU-1, la proteína HMGB1 se localiza inicialmente en el citoplasma de la célula. Sin embargo, al tratar a las células con la CI_{50} de cisplatino, la HMGB1 se relocaliza a las 4 h en el núcleo. Finalmente, a las 24 h posteriores a la exposición al fármaco, la HMGB1 se localiza nuevamente en el citoplasma de las células que presentan una morfología apoptótica. Estas características apoyan los resultados anteriores que indican que el cisplatino induce muerte celular por apoptosis a esta concentración (**Figura 7.3**).

Por otro lado, cuando las células son tratadas con una concentración de cisplatino mayor a la CI_{50} , la célula relocaliza a la HMGB1 antes de 4 h en el núcleo; sin embargo, la proteína permanece retenida en este sitio hasta 24 h después del tratamiento, donde la morfología no es apoptótica, lo que apoyaría los resultados que indican que el cisplatino a altas concentraciones no induce muerte celular por apoptosis (**Figura 7.4**).

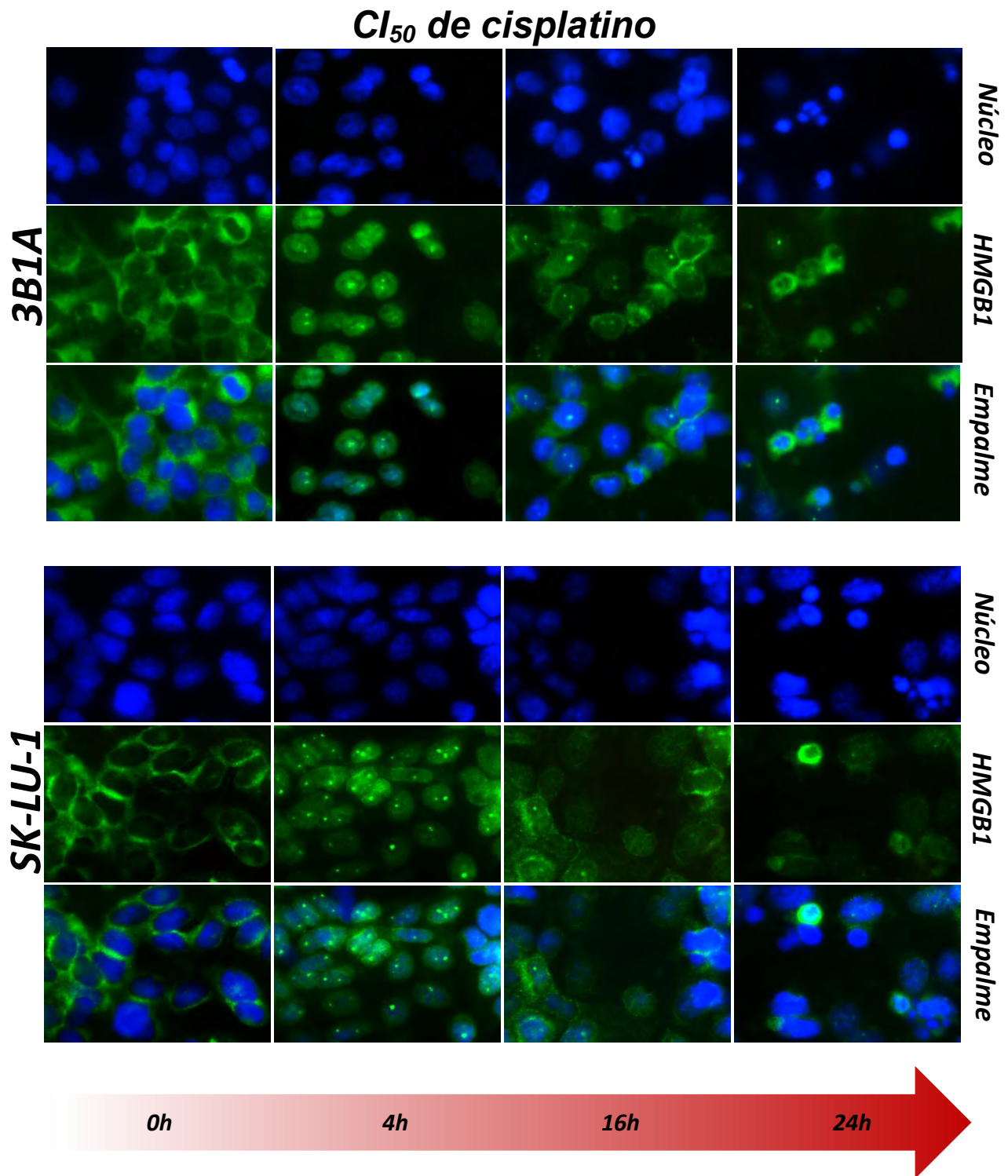


Figura 7.3 Localización subcelular de la HMGB1 inducida por cisplatino en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Las micrografías indican la distribución subcelular de HMGB1 en líneas celulares tratadas con una concentración de 40 μ M de cisplatino en diferentes tiempos. Tinción en verde HMGB1, tinción en azul DAPI. Aumento total 1000x.

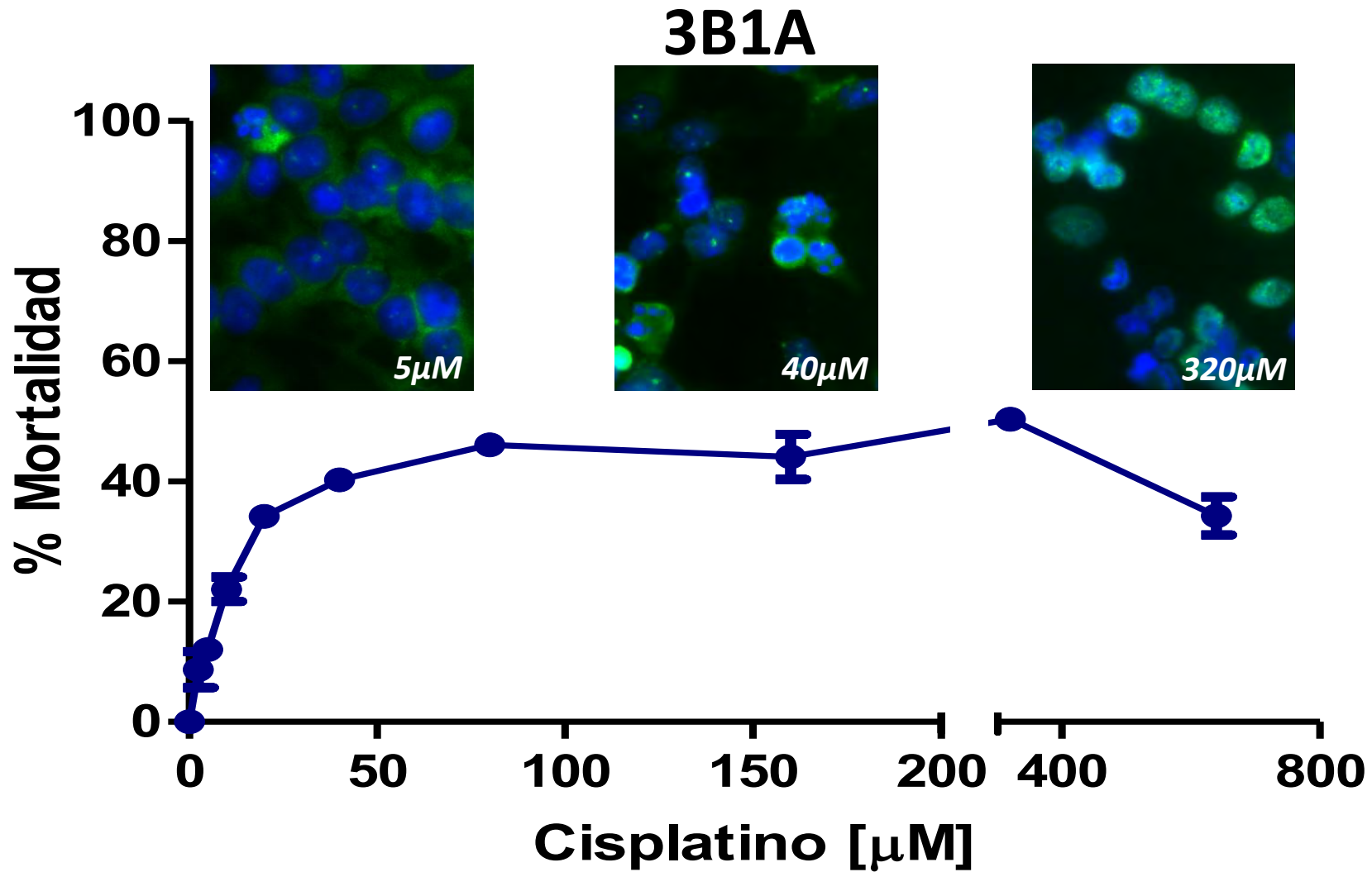


Figura 7.4.- Localización subcelular de la HMGB1 inducida por el cisplatino en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. La gráfica indica el porcentaje de mortalidad inducida a diferentes concentraciones de cisplatino durante 24h. Las micrografías muestran la localización subcelular de la HMGB1 detectada por inmunofluorescencia indirecta en 3 condiciones de tratamiento empleadas. Aumento total 1000x.

7.5 DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LA HMGB1 A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CISPLATINO

Los resultados anteriores sugieren que la HMGB1 es liberada en etapas tardías de la muerte celular por efecto del cisplatino a concentraciones menores a la CI_{50} ya que se encuentra en el citoplasma de estas células. Para corroborar esto, se realizó un ELISA para cuantificar a la proteína HMGB1 en los sobrenadantes de las 4 líneas celulares suplementadas al 1% de SFB expuestas a diferentes concentraciones del fármaco.

Los resultados muestran que en las 4 líneas celulares, hasta concentraciones iguales a la CI_{50} de cisplatino, hay un aumento en la cantidad de la HMGB1 en el sobrenadante. Lo anterior se asocia al aumento en el porcentaje de mortalidad celular. Sin embargo, a concentraciones mayores de la CI_{50} del fármaco, la cantidad de la HMGB1 en el sobrenadante disminuye mientras que el porcentaje de mortalidad se mantiene constante en 3 de las 4 líneas celulares. Cabe destacar que la línea 1.3.11, donde se encontró un aumento en su mortalidad hasta valores cercanos al 100%, también presentó un aumento constante de la HMGB1 en el sobrenadante con respecto a la concentración de cisplatino (**Figura 7.4**).

En conjunto, estos resultados indican que el cisplatino a concentraciones menores a la CI_{50} induce apoptosis y la liberación de la HMGB1 al medio extracelular, mientras que a concentraciones mayores de la CI_{50} , el fármaco no induce muerte por apoptosis y la proteína es retenida dentro del núcleo.

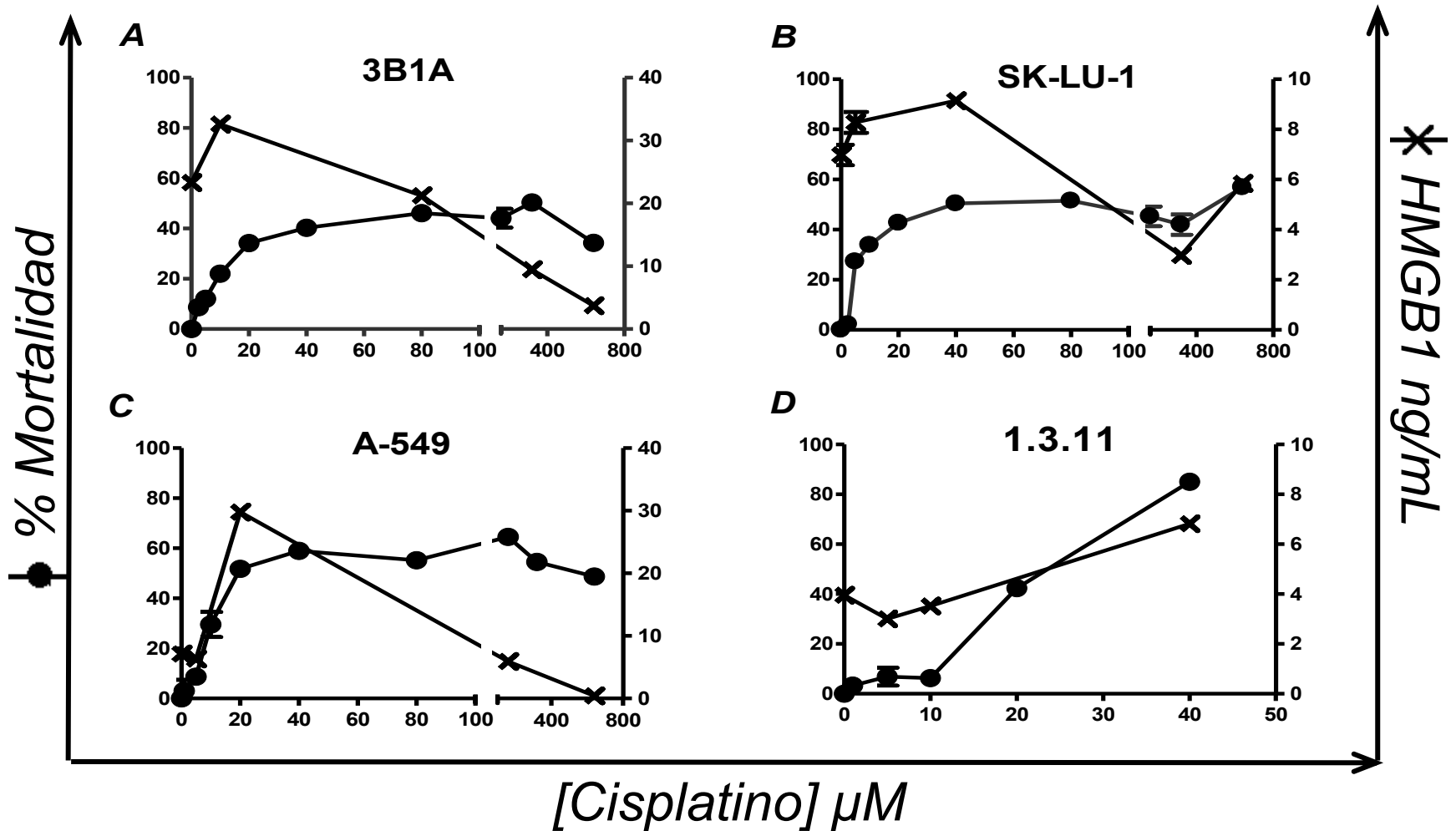


Figura 7.4 Liberación de la HMGB1 por efecto del cisplatino a diferentes concentraciones. Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 1% de SFB y se expusieron a diferentes concentraciones de cisplatino por 24 h. Se cuantificó la HMGB1 liberada por la técnica de ELISA. Se muestran los resultados de un ensayo por duplicado. Se indica la media y la desviación estándar.

8. DISCUSIÓN

Muchos agentes quimioterapéuticos utilizados actualmente en la clínica ejercen su citotoxicidad al inducir apoptosis en las células tumorales. Este tipo de muerte se ha considerado como un proceso inmunológicamente silencioso (Zitvogel *et al* 2008). Estudios recientes en modelos animales sugieren que algunos agentes antineoplásicos, como el grupo de las antraciclinas y el oxaliplatino, inducen un tipo de apoptosis en las células tumorales al que se le ha llamado apoptosis inmunogénica (Tesniere *et al* 2008). En este tipo de muerte, las células neoplásicas liberan una serie de moléculas de forma espacio-temporal llamadas DAMPs. Dentro de estos DAMPs, la proteína HMGB1 ha sido la que mejor se ha caracterizado con múltiples funciones observadas en el organismo, siendo una de ellas el atraer y activar a células del sistema inmunológico para mejorar la eficiencia en el procesamiento y presentación de antígenos tumorales (Zitvogel *et al* 2010). Esto favorece que se establezca una respuesta específica en contra de las células neoplásicas (Kepp *et al* 2011). En el cáncer pulmonar, el principal agente antitumoral empleado es el cisplatino, y es importante conocer si éste induce la liberación de la HMGB1 a partir de las células tumorales de pulmón en apoptosis, lo cual activaría a la respuesta inmunológica del huésped en contra de las células malignas residuales.

Estudios *in vitro* han cuantificado a la proteína HMGB1 en sobrenadantes de cultivos celulares. En estos ensayos se ha utilizado medio suplementado con 10% de SFB (Yang *et al* 2010). Ya que el SFB contiene HMGB1, lo que puede interferir en su cuantificación correcta, otros grupos han optado por realizar un cambio del medio de cultivo a uno sin suplementar 24 h previo al ensayo (Jube *et al* 2012). No obstante, consideramos que el cambio repentino de medio provoca un alto estrés celular por disminución súbita de nutrientes, lo que se ha asociado a la liberación de la HMGB1 (Tang *et al* 2010a). Con el fin de evitar esta alteración en las células, en el presente trabajo las líneas celulares se adaptaron gradualmente a proporciones cada vez menores de SFB hasta mantenerlas en medio condicionado con 1% de SFB. La adaptación no influyó en la viabilidad de las células; sin embargo se observó una menor velocidad de proliferación celular asociada a la disminución gradual de factores de

crecimiento contenidos en el suero fetal (Kroemer *et al* 2010). A pesar de lo anterior, las curvas dosis-respuesta de las líneas celulares al cisplatino, en ambas condiciones de SFB, no presentaron diferencias significativas, por lo que el proceso de adaptación de las células no afectó su sensibilidad al cisplatino.

A la fecha, no existe consenso si la proteína HMGB1 es liberada durante el proceso de apoptosis (Scaffidi *et al* 2002, Yamada *et al* 2011), lo que parece depender de la estirpe celular o línea celular empleada y del agente inductor de apoptosis. Para evaluar si la HMGB1 es liberada de las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar por efecto del cisplatino, primero estudiamos el tipo de muerte que indujo el fármaco en las líneas celulares.

Concentraciones menores o igual a la CI_{50} de cisplatino indujeron en las líneas celulares la presencia de células TUNEL-positivas con morfología apoptótica; además, la tinción con DAPI mostró fragmentación nuclear. Estos resultados apoyan que el cisplatino a concentraciones menores o igual a la CI_{50} induce apoptosis, como ha sido reportado previamente en líneas de cáncer de colon (Tesniere *et al* 2010). Sin embargo, los parámetros detectados también pueden presentarse en otros tipos de muerte; por ejemplo, la degradación del DNA se ha observado en necrosis y la fragmentación del núcleo en la catástrofe mitótica (Golstein *et al* 2007, Vakifahmetoglu *et al* 2008). Por lo tanto, es necesario evaluar empleando distintos procedimientos otras características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis para corroborar que el cisplatino a la CI_{50} induce sólo este tipo de muerte en las células tumorales de pulmón.

Por otro lado, las células tratadas con concentraciones mayores a la CI_{50} de cisplatino no presentaron incremento en el porcentaje de mortalidad. A pesar del aumento en la concentración del fármaco, las células fueron TUNEL-negativas y no presentaron fragmentación nuclear. Tampoco mostraron características relacionadas a la necrosis como turgencia celular. No obstante, en las células se observaron cambios morfológicos importantes destacando, la aparición de prolongaciones citoplasmáticas y abundante vacuolización en el citoplasma, lo que sugiere un evento distinto a la muerte celular.

El cisplatino forma aductos en el DNA y causa un daño generalizado a nivel del citoplasma provocando un aumento en el estrés oxidativo lo que, en conjunto, lleva a la inducción de la apoptosis (Galluzi *et al* 2012a, Siddik 2003). El efecto de este fármaco en la célula depende de múltiples factores como: i) la vía metabólica empleada, ii) la cantidad de canales de cobre que contengan las células y que permitan el paso del cisplatino, iii) la concentración de enzimas de detoxificación y otras proteínas que inactiven al fármaco, iv) mecanismos de reparación del DNA, entre otros (Galluzi *et al* 2012a). Debido a que los cultivos empleados no se encontraban sincronizados y a las bajas concentraciones de fármaco empleado, probablemente algunas células pudieron reparar el daño o no incorporaron la concentración de cisplatino suficiente para inducir el efecto citotóxico. En cambio, exposiciones súbitas a concentraciones superiores a la CI_{50} de cisplatino, las células tal vez pudieran desencadenar mecanismos de resistencia a la apoptosis, o bien, activar eventos como la senescencia o autofagia. Existen reportes que indican que algunos agentes quimioterapéuticos, además de inducir la apoptosis, favorecen los eventos biológicos antes indicados (Chang *et al* 1999, Ren *et al* 2010). Tal vez la senescencia o la autofagia pueden presentarse a concentraciones altas de cisplatino. Precisar los fenómenos que en las células tumorales de pulmón induce el cisplatino a sus distintas concentraciones, discriminando entre apoptosis, necrosis, autofagia, senescencia u otros, permitirá conocer los procesos en que se liberan DAMPs a fin de estimular una eficiente respuesta antitumoral.

En las células tumorales de pulmón, la HMGB1 se expresa constitutivamente en el citoplasma, lo que se ha reportado previamente en otros tipos de cáncer (Jube *et al* 2012, Livesey *et al* 2012). Por otro lado, después de tratar a las células tumorales con diferentes concentraciones de cisplatino, observamos que la HMGB1 es translocada rápidamente del citoplasma al núcleo. Lo anterior se debe a que, entre las funciones de la HMGB1 se encuentra reconocer los aductos formados por el cisplatino y reclutar proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del material genético (Tang *et al* 2011, Cardinal *et al* 2009). En las líneas de adenocarcinoma pulmonar, esta actividad biológica parece depender del tiempo de exposición y la concentración de cisplatino ya que, concentraciones menores a la CI_{50} y después de 24 h, HMGB1 es relocalizada en

el citoplasma. En cambio, las células tumorales tratadas con concentraciones mayores a la CI_{50} retienen HMGB1 en el núcleo. Se ha estudiado en macrófagos o en algunas líneas celulares tumorales que la translocación de la HMGB1 del núcleo al citoplasma se encuentra regulada a través de modificaciones post-traduccionales (Bonaldi *et al* 2003, Lee *et al* 2012), o bien, depende del estado redox de la proteína (Hoppe *et al* 2006). Será necesario definir si estas alteraciones en la HMGB1 están asociadas directamente a la concentración de cisplatino empleada. Lo anterior con el objetivo de evitar la reparación del daño causado por el fármaco y favorecer el proceso de apoptosis en la célula tumoral.

Las células tumorales de pulmón liberan constitutivamente HMGB1. Se ha reportado en células del sistema inmunológico activadas que la HMGB1 es liberada a través de microvesículas secretorias (Gardella *et al* 2002). No se conoce si esta forma de liberación se presenta en las células de adenocarcinoma pulmonar. Reportes recientes indican que HMGB1, en el espacio extracelular, tiene una función pro-tumoral estimulando la proliferación celular, angiogénesis, metástasis e invasión (Tang *et al* 2010b). El grupo de Lotze *et al* observó que HMGB1 liberada por las células tumorales durante el proceso de autofagia favorece la resistencia a varios agentes quimioterapéuticos (Tang *et al* 2010c). Se ha propuesto que HMGB1 ejerce estos eventos al unirse a su receptor RAGE ampliamente expresado en varios tipos de cáncer (Todorova *et al* 2012). Tal vez la liberación constitutiva de la HMGB1 por las células tumorales de pulmón podría estar participando en este tipo de eventos pro-tumorales.

De acuerdo a nuestros resultados, en células tratadas con cisplatino, la liberación de HMGB1 presentó un comportamiento bifásico. Después de 24 h, células expuestas a concentraciones menores a la CI_{50} relocalizaron a la HMGB1 en el citoplasma y debido a que aproximadamente el 50% de la población celular presentó apoptosis, estas células podrían ser la fuente de la HMGB1 liberada. En cambio, células tratadas con concentraciones mayores a la CI_{50} de cisplatino no liberaron, e incluso disminuyeron la producción basal de HMGB1. Este fenómeno puede deberse a que esta molécula se encuentra fuertemente retenida a nivel nuclear (aductos y nucleosomas) activando

mecanismos de reparación del DNA y favoreciendo la resistencia al fármaco. Son necesarios más estudios para aclarar si estos eventos se presentan en las células tumorales al exponerlas a altas concentraciones de cisplatino.

Finalmente, los resultados de este trabajo sientan las bases para el inicio de estudios clínicos en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar tratados con cisplatino donde se determine el papel que lleva a cabo la proteína HMGB1, ya sea participando a favor de la progresión tumoral o bien, activando al sistema inmunológico para inducir una eficiente respuesta antitumoral.

8. CONCLUSIONES

- ❖ Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar adaptadas al medio condicionado con 1% de SFB no afectaron su viabilidad ni su sensibilidad al cisplatino
- ❖ El cisplatino a concentraciones inferiores a la CI_{50} indujo apoptosis de las células tumorales, detectada mediante la presencia de células TUNEL-positivas y fragmentación nuclear
- ❖ El cisplatino a concentraciones mayores a la CI_{50} indujo un fenómeno distinto a la apoptosis, donde destaca la presencia de células TUNEL-negativas con prolongaciones y vacuolización del citoplasma
- ❖ Posterior a la exposición a bajas concentraciones del cisplatino, la HMGB1 citoplasmática es translocada al núcleo y posteriormente relocalizada al citoplasma. Mientras que a altas concentraciones del fármaco, la HMGB1 se queda retenida en el núcleo
- ❖ Las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar liberan la HMGB1 de manera constitutiva. Exposiciones a concentraciones inferiores a la CI_{50} de cisplatino incrementan la liberación de la proteína al medio extracelular, mientras que cuando las células son tratadas con concentraciones mayores, la liberación de HMGB1 disminuye por debajo de la basal

10. REFERENCIAS

1. Acosta JC., Gil J. **Senescence: a new weapon for cancer therapy**. Trends Cell Biol. 2012; 22: 211-9.
2. Barrett JC. **Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment**. Environ Health Perspect. 1993; 100: 9-20.
3. Bell CW., Jiang W., Reich CF 3rd, Pisetsky DS. **The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death**. Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 291: C1318-25.
4. Bianchi E. **DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger**. J Leukoc Biol. 2007; 81: 1-5.
5. 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: 5551-60.
6. Brambilla E., Travis W., Colby T., Corrinz B., Shimosato Y. **The new World Health Organization classification of lung tumours**. Eur Respir J. 2001; 18: 1059-68.
7. Breuer R., Postmus P., Smit E. **Molecular pathology of non-small-cell lung cancer**. Respiration. 2005; 72: 313-333.
8. Cardinal J., Pan P., Dhupar R., Ross M., Nakao A., Lotze M., *et al* **Cisplatin prevents high mobility group box 1 release and is protective in a murine model of hepatic ischemia/reperfusion injury**. Hepatology. 2009; 50: 565-74.
9. Casares N., Pequignot M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Roux S., Chaput N., *et al* **Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death**. J Exp Med. 2005; 202: 1691-701.
10. Chang BD., Broude EV., Dokmanovic M., Zhu H., Ruth A., Xuan Y., *et al* **A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents**. Cancer Res. 1999; 59: 3761-7.
11. Chao M., Jaiswal S., Weissman-Tsukamoto R., Alizadeh A., Gentles A., Volkmer J., *et al* **Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47**. Sci Transl Med. 2010; 2: 63ra94.
12. Chen G., Tang J., Zheng P., Liu Y. **CD24 and siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses**. Science. 2009; 323: 1722-5.
13. Chipuk JE., Green DR. **How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization**. Trends Cell Biol. 2008; 18: 157-64.
14. Couraud S., Zalcman G., Milleron B., Morin F., Swouquet PJ. **Lung cancer in never smokers—a review**. Eur J Cancer. 2012; 48: 1299-311.
15. Croce CM. **Oncogenes and cancer**. N Engl J Med. 2008; 358: 502-11.
16. De Petris L., Crinò L., Scagliotti GV., Gridelli C., Galetta D., Metro G. **Treatment of advanced non-small cell lung cancer**. Ann Oncol. 2006; 17: ii36-41
17. Dunn G., Old L., Schreiber R. **The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting**. Immunity. 2004a; 21: 137-148.
18. Dunn G., Old L., Schreiber R. **The tree Es of cancer immunoediting**. Annu Rev Immunol. 2004b; 22: 329-60.
19. Fink S., Cookson B. **Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells**. Infect Immun. 2005; 74: 1907-17.
20. Fuertes MA., Alonso C., Pérez JM. **Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance**. Chem Rev. 2003; 103: 645-62.

21. Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O. *et al* **Molecular mechanisms of cisplatin resistance**. *Oncogene*. 2012a; 31: 1869-83.
22. Galluzzi L., Senovilla L., Zitvogel L., Kroemer G. **The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs**. *Nat Rev Drug Discov*. 2012b; 11: 215-33.
23. Galluzzi L., Vitale I., Abrams JM., Alnemri ES., Baehrecke EH., Blagosklonny MV., *et al* **Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012**. *Cell Death Differ*. 2012c; 19: 107-20.
24. Gardai SJ., McPhillips KA., Frasca SC., Janssen WJ., Starefeldt A., Murphy-Ullrich JE. *et al* **Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through *trans*-activation of LRP on the phagocyte**. *Cell*. 2006; 123: 321-334.
25. Gardella S., Andrei C., Ferrera D., Lotti LV., Torrisi MR., Bianchi ME., *et al* **The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway**. *EMBO Rep*. 2002; 3: 995-1001.
26. Garg AD., Nowis D., Golab J., Vandenabeele P., Krysko DV., Agostinis P. **Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation**. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1805: 53-71.
27. Garg AD., Krysko DV., Verfaillie T., Kaczmarek A., Ferreira GB., Marysael T. *et al* **A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death**. *EMBO J*. 2012; 31: 1062-79.
28. Garrido G., Rabasa A., Sánchez B., López MV., Blanco R., López A. *et al* **Induction of immunogenic apoptosis by blockade of epidermal growth factor receptor activation with a specific antibody**. *J Immunol*. 2011; 187: 4954-66.
29. Gillies RJ., Verduzco D., Gatenby RA. **Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work**. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12: 487-93.
30. Globocan. Ferlay J SH, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Globocan 2008 v1.2, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase no. 10 [internet]. Lyon, France: International agency for research on cancer; 2010. Disponible de: <http://globocan.iarc.fr> Fecha de acceso 17 de septiembre de 2012.
31. Gold LI., Eggleton P., Sweetwyne MT., Van Duyn LB., Greives MR., Naylor SM., *et al* **Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease**. *FASEB J*. 2010; 24: 665-83.
32. Golden EB., Pellicciotta I., Demaria S., Barcellos-Hoff MH., Formenti SC. **The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways**. *Front Oncol*. 2012 (DOI: 10.3389/fonc.2012.00088)
33. Golstein P., Kroemer G. **Cell death by necrosis: towards a molecular definition**. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32: 37-43.
34. Gonzalez V., Fuertes M. **Is cisplatin-induced cell death always produced apoptosis?** *Mol Pharmacol*. 2001; 59: 657-63.
35. Green DR., Ferguson T., Zitvogel L., Kroemer G. **Immunogenic and tolerogenic cell death**. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9: 353-63.
36. Häcker G., Weber A. **BH3-only proteins trigger cytochrome c release, but how?** *Arch Biochem Biophys*. 2007; 462: 150-155.
37. Hanahan D., Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation**. *Cell*. 2011; 144: 646-74.
38. Hecht SS. **Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention**. *Lancet Oncol*. 2002; 8: 461-9.
39. Heist RS., Engelman JA. **SnapShot: non-small cell lung cancer**. *Cancer Cell*. 2012; 21: 448.e2.
40. Hengartner MO. **The biochemistry of apoptosis**. *Nature*. 2000; 407: 770-6.
41. Herbst RS., Heymach JV., Lippman SM. **Lung cancer**. *N Engl J Med*. 2008; 359: 1367-80.

42. Hoppe G., Talcott KE., Bhattacharya., Crabb JW., Sears JE. **Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1**. *Exp Cell Res*. 2006; 312: 3526-38.
43. Hotchkiss RS., Strasser A., McDunn JE., Swanson PE. **Cell death**. *N Engl J Med*. 2009; 361: 1570-83.
44. Hreggvidsdóttir HS., Lundberg AM., Aveberger AC., Klevenvall L., Andersson U., Harris HE. **High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor**. *Mol Med*. 2012; 18: 224-30.
45. INEGI Estadísticas vitales 2011. Disponible de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51> Fecha de acceso 17 de septiembre de 2012.
46. Ito N., DeMarco RA., Mailliard RB., Han J., Rabinowich H., Kalinski P. *et al* **Cytolytic cells induce HMGB1 release from melanoma cell lines**. *J Leukoc Biol*. 2007; 81: 75-83.
47. Jube S., Rivera ZS, Bianchi ME., Powers A., Wang E., Pagano I. *et al* **Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma**. *Cancer Res*. 2012; 72: 3290-301.
48. Kazama H., Ricci JE., Herndon JM., Hoppe G., Green DR., Ferguson TA. **Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein**. *Immunity*. 2008; 29: 21-32.
49. Kelland L. **The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy**. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 573-84.
50. Kepp O., Galluzzi L., Martins I., Schlemmer F., Adjeminan S., Michaud M., *et al* **Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy**. *Cancer Metastasis Rev*. 2011; 30: 61-9.
51. Kirkwood JM., Butterfield LH., Tarhini AA., Zarour H., Kalinski P., Ferrone S. **Immunotherapy of cancer in 2012**. *CA Cancer J Clin*. 2012; 62: 309-35.
52. Kono H., Rock KL. **How dying cells alert the immune system to danger**. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8: 279-89.
53. Kroemer G., Zitvogel L. **Death, danger, and immunity: an infernal trio**. *Immunol Rev*. 2007; 220: 5-7.
54. Kroemer G., Levine B. **Autophagic cell death: the story of a misnomer**. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9: 1004-10.
55. Kroemer G., Mariño G., Levine B. **Autophagy and the integrated stress response**. *Mol Cell*. 2010; 40: 280-93.
56. Lee H., Park M., Shin N., Kim G., Kim YG., Shin JS., *et al* **High mobility group box-1 is phosphorylated by protein kinase C zeta and secreted in colon cancer cells**. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 424: 321-6.
57. Livesey KM., Kang R., Vernon P., Buchser W., Loughran P., Watkins SC. **p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis**. *Cancer Res*. 2012; 72: 1996-2005.
58. López González JS., García Herrera V., Aguilar Cázares D., Medina Morales F., Rivera Rosales RM., Mandoki JJ., *et al* **Efecto citoestático de la cumarina y de la 7 hidroxycumarina en tres líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar humano**. *Rev Inst Nal Enf Res Mex*. 1998; 11: 261-7
59. Lotze MT., Tracey KJ. **High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal**. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 331-42.
60. Lu B., Nakamura T., Inouye K., Li J., Tang Y., Lundbäck P., *et al* **Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release**. *Nature*. 2012; 488: 670-4.
61. Ma WW., Adjei AA. **Novel agents on the horizon for cancer therapy**. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59: 111-37.

62. Martinon F., Pétrilli V., Mayor A., Tardivel A., Tschopp J. **Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome.** *Nature.* 2006; 440: 237-41.
63. Matzinger P. **The danger model: a renewed sense of self.** *Science.* 2002; 296: 301-305.
64. Menger L., Vacchelli E., Adjemian S., Martins I., Ma Y., Shen S., *et al* **Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death.** *Sci Transl Med.* 2012; 4: 143ra99.
65. Michaud M., Martins I., Sukkurwala AQ, Adjemian S., Ma Y., Pellegatti P., *et al* **Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice.** *Science.* 2011; 334: 1573-7.
66. Minna JD., Roth JA., Gazdar AF. **Focus on lung cancer.** *Cancer Cell.* 2002; 1: 49-52.
67. Molina JR., Yang P., Cassivi SD., Schild SE., Adjei AA. **Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship.** *Mayo Clin Proc.* 2008; 83: 584-94.
68. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia GM., Apetoh L., Perfettini JL., *et al* **Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death.** *Nat Med.* 2007a; 13: 54-61.
69. Obeid M., Tesniere A., Panaretakis T., Tufi R., Joza N., van Endert P., *et al* **Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy.** *Immunol Rev.* 2007b; 220: 22-34.
70. Obeid M., Panaretakis T., Joza N., Tufi R., Tesniere A., van Endert P., *et al* **Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis.** *Cell Death Differ.* 2007c; 14: 1848-50.
71. Panaretakis T., Kepp O., Brockmeier U., Tesniere A., Bjorklund AC., Chapman DC., *et al.* **Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death.** *EMBO J.* 2009; 28: 578-90.
72. Parkin DM., Bray F., Ferlay J., Pisani P. **Global cancer statistics, 2002.** *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
73. Ren JH., He WS., Nong L., Zhu QY., Hu K., Zhang RG., *et al.* **Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy.** *Cancer Biother Radiopharm.* 2010; 25: 75-80.
74. Risch A., Plass C. **Lung cancer epigenetics and genetics.** *Int J Cancer.* 2008; 123: 1-7.
75. Rossi A., Gridelli C. **Chemotherapy of advanced non-small cell lung cancer in elderly patients.** *Ann Oncol.* 2006; 17: ii58-60.
76. Ryungsa K., Manabu E., Kazuaki T. **Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape.** *Immunology.* 2007; 21: 1-14.
77. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi ME. **Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation.** *Nature.* 2002; 418: 191-5.
78. Schiavoni G., Sistigu A., Valentini M., Mattei F., Sestili P., Spadaro F., *et al* **Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis.** *Cancer Res.* 2011; 71: 768-78.
79. Sculier JP., Berghmans T., Meert AP. **Update in lung cancer and mesothelioma 2009.** *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 181: 773-81.
80. Siddik ZH. **Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance.** *Oncogene.* 2003; 22: 7265-79.
81. Spisek R., Charalambous A., Mazumder A., Vesole DH., Jagannath S., Dhodapkar MV. **Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications.** *Blood.* 2007; 109: 4839-45.
82. Talhout R., Schulz T., Florek E., van Benthem J., Wester P., Opperhuizen A. **Hazardous compounds in tobacco smoke.** *Int J Environ Res Public Health.* 2011; 8: 613-28.
83. Tanaka H., Matsushima H., Nishibu A., Clausen BE., Takashima A. **Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation.** *Cancer Res.* 2009; 69: 6987-94.

84. Tang D., Kang R., Livesey KM., Cheh CW., Farkas A., Loughran P., *et al* **Endogenous HMGB1 regulates autophagy.** J Cell Biol. 2010a; 190: 881-92.
85. Tang D., Kang R., Zeh III HJ., Lotze MT. **High-mobility Group Box 1 and Cancer.** Biochim Biophys Acta. 2010b; 1799: 13-40.
86. Tang D., Kang R., Cheh CW., Livesey KM., Liang X., *et al* **HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells.** Oncogene. 2010c; 29: 5299-310.
87. Tang D., Kang R., Zeh III HJ., Lotze MT. **High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease.** Antioxid Redox Signal. 2011; 14: 1315-35.
88. Tesniere A., Apetoh L., Ghiringhelli F., Joza N., Panaretakis T., Kepp O. **Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm.** Curr Opin Immunol. 2008; 20: 504-11.
89. Tesniere A., Schlemmer F., Boige V., Kepp O., Martins I., Ghiringhelli F. **Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin.** Oncogene. 2010; 29: 482-91.
90. Thielen A., Klus H., Müller L. **Tobacco smoke: unraveling a controversial subject.** Exp Toxicol Pathol. 2008; 60: 141-56.
91. Todorova J., Pasheva E. **High mobility group B1 protein interacts with its receptor RAGE in tumor cells but not in normal tissues.** Oncol Lett. 2012; 3: 214-218.
92. Ulloa L., Messmer D. **High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe.** Cytokine Growth Factor Rev. 2006; 17: 189-201.
93. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Zhivotovsky B. **Death through a tragedy: mitotic catastrophe.** Cell Death Differ. 2008; 15: 1153-62.
94. Vermeulen K., Von Bockstaele D., Berneman Z. **Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer.** Ann Hematol. 2005; 84: 627-639.
95. Webb SJ., Harrison DJ., Wyllie AH. **Apoptosis: an overview of the process and its relevant in disease.** Adv Pharmacol. 1997; 41: 1-34.
96. Willingham SB., Volkmer JP., Gentles AJ., Sahoo D., Dalerba P., Mitra SS., *et al* **The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPα) interaction is a therapeutic target for human solid tumors.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109: 6662-7.
97. Yamada Y., Fujii T., Ishijima R., Tachibana H., Yokoue N., Takasawa R., *et al* **The release of high mobility group box 1 in apoptosis is triggered by nucleosomal DNA fragmentation.** Arch Biochem Biophys. 2011; 506: 188-93.
98. Yang H., Hregvidsdottir HS., Palmblad K., Wang H., Ochani M., Li J., *et al* **A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 11942-7.
99. You JS., Jones PA. **Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?** Cancer Cell. 2012; 22: 9-20.
100. Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., Kroemer G. **Immunological aspects of cancer chemotherapy.** Nat Rev Immunol. 2008; 8: 59-73.
101. Zitvogel L., Kepp O., Senovilla L., Menger L., Chaput N., Kroemer G. **Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway.** Clin Cancer Res. 2010; 16: 3100-4.