



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA ALARMINA HMGB1
EN PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR TRATADOS
CON QUIMIOTERAPIA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

RUBÉN REYES SALGADO



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

VOCAL: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO

SECRETARIO: Profesor: DOLORES AGUILAR CÁZARES

1er. SUPLENTE: Profesor: JULIO CESAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

2° SUPLENTE: Profesor: GIBRAN PÉREZ MONTESINOS

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

ASESOR DEL TEMA: DOLORES AGUILAR CÁZARES

SUSTENTANTE: RUBÉN REYES SALGADO

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	8
CÁNCER	8
CARCINOGENESIS	8
AGENTES CARCINÓGENOS	8
INICIACIÓN DEL TUMOR	9
PROMOCIÓN DEL TUMOR	9
ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMOR	10
PROGRESIÓN DEL TUMOR	10
CÁNCER PULMONAR	11
TRATAMIENTO EN EL CÁNCER PULMONAR	12
CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER PULMONAR	13
NSCLC	13
ADENOCARCINOMA PULMONAR	13
CARCINOMA EPIDERMÓIDE O DE CÉLULAS ESCAMOSAS	15
CARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES	15
SCLC	15
MESOTELIOMA	16
SISTEMA INMUNE Y CÁNCER	18
MODELO DE DAÑO	18
HIGH-MOBILITY GROUP Box 1	22
FUNCIONES NUCLEARES DE HMGB1	22
FUNCIONES DE LA MOLÉCULA HMGB1 EXTRACELULARES	24
HMGB1: FUNCIÓN EXTRACELULAR EN EL CÁNCER	25
ANTECEDENTES	29
NIVELES SÉRICOS DE HMGB1 REPORTADOS EN DISTINTOS TIPOS DE CÁNCER	29
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS PARTICULARES	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
MATERIAL BIOLÓGICO	34
ENSAYO INMUNO-ENZIMÁTICO TIPO SÁNDWICH (ELISA)	36
RESULTADOS	39
1. NIVELES SÉRICOS DE HMGB1 EN LOS GRUPOS CONTROL	39
2. NIVELES SÉRICOS DE HMGB1: GRUPO CONTROL VS PACIENTES	40
3. NIVELES SÉRICOS DE HMGB1 A LO LARGO DEL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR	41
3.1 CONCENTRACIÓN SÉRICA DE HMGB1 A LO LARGO DEL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE ADENOCARCINOMA	42

3.2 CONCENTRACIÓN SÉRICA DE HMGB1 A LO LARGO DEL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE MESOTELIOMA	43
3.3 CONCENTRACIÓN SÉRICA DE HMGB1 A LO LARGO DEL TRATAMIENTO EN BASE AL TRATAMIENTO ADMINISTRADO	44
4. INCREMENTO Y DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES SÉRICOS DE HMGB1 AL FINAL DE LA QUIMIOTERAPIA	46
4.1 SOBREVIDA DE LOS PACIENTES EN BASE A UN INCREMENTO O UN DESCENSO EN LOS NIVELES SÉRICOS DE HMGB1 AL FINAL DE LA QUIMIOTERAPIA	47
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
BIBLIOGRAFÍA	53

Abreviaturas

DNA	Deoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico.
EGF	Epidermal growth factor, factor de crecimiento epidérmico.
TGF- β	Transforming growth factor beta, factor de crecimiento transformante beta.
BRCA1/BRCA2	Breast cancer 1/Breast cancer 2, cáncer de mama 1/cáncer de mama 2.
NSCLC	Non-small-cell lung cancer, cáncer pulmonar de células no pequeñas.
SCLC	Small cell lung cancer, cáncer pulmonar de células pequeñas.
APCs	Antigen presenting cells, células presentadoras de antígeno.
QT	Quimioterapia.
MM	Mesotelioma maligno.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns, patrones moleculares asociados a patógenos.
DAMPs	Damage-associated molecular patterns, patrones moleculares asociados a daño.
TLRs	Toll-like receptors, receptores tipo Toll.
HMGB1	High-Mobility Group Box 1, proteína del grupo de alta movilidad caja 1.
HSPs	Heat shock proteins, proteínas de choque térmico.
TNF- α	Tumor necrosis factor alfa, factor de necrosis tumoral alfa.
IL-1 β .	Interleucina 1 beta.
IL-1 α	Interleucina 1 alfa.
IL	Interleucina.
iDCs	Immature dendritic cells, células dendríticas inmaduras.
DCs	Dendritic cells, células dendríticas.
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts, receptores para los compuestos de glicosilación avanzada.
MHC	Major histocompatibility complex, Complejo mayor de histocompatibilidad.
IFN- γ	Interferon gamma, Interferón gamma.

Introducción

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades (se han descrito más de 100 tipos de cáncer) que se caracteriza por una división celular descontrolada y que tienen la capacidad de invadir otros tejidos^{1,2}.

Carcinogénesis

El proceso de transformación celular por el cual una célula, a través de cambios genéticos y epigenéticos, se convierte en una célula tumoral con capacidad de invadir y generar metástasis es llamado carcinogénesis³. Este proceso comprende distintas etapas y se desarrolla a lo largo de varios años¹. Para su estudio (Figura 1), la carcinogénesis es separada en tres etapas: iniciación del tumor, promoción del tumor y progresión del tumor⁴.

Agentes carcinógenos

Las mutaciones alteran la estructura del DNA de las células y son consecuencia de la interacción de este con distintos agentes carcinógenos, como son: i) físicos (ej. la luz ultravioleta y la radiación ionizante), ii) químicos (ej. hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas y asbesto), y iii) biológicos (ej. el cáncer cervicouterino por el virus del papiloma humano, el linfoma de Burkitt por el virus de Epstein-Barr, el cáncer gástrico por *Helicobacter pylori* y el cáncer de vejiga por *Schistosoma mansoni*)⁵. Además, los factores de susceptibilidad de la persona son de vital importancia, entre los cuales se encuentran las mutaciones heredadas, mutaciones por errores de las enzimas DNA polimerasas, los cambios hormonales, las deficiencias inmunes y las mutaciones debidas al metabolismo celular dadas por la formación de especies reactivas de oxígeno⁶.

Iniciación del tumor

Es el proceso inicial de alteración del DNA de una célula normal⁷. Un carcinógeno químico modifica la estructura molecular del DNA, lo que deriva en una mutación tras la síntesis del material genético⁸. Esta mutación puede ser una transición de bases o pequeñas deleciones de un segmento de DNA¹. Este evento es un requisito pero no es suficiente para el inicio del tumor, por lo que es necesario que se produzca al menos un ciclo celular completo con división de la misma para que el daño inducido se fije y sea permanente y, por consecuencia, sea transmitido a las células hijas⁴.

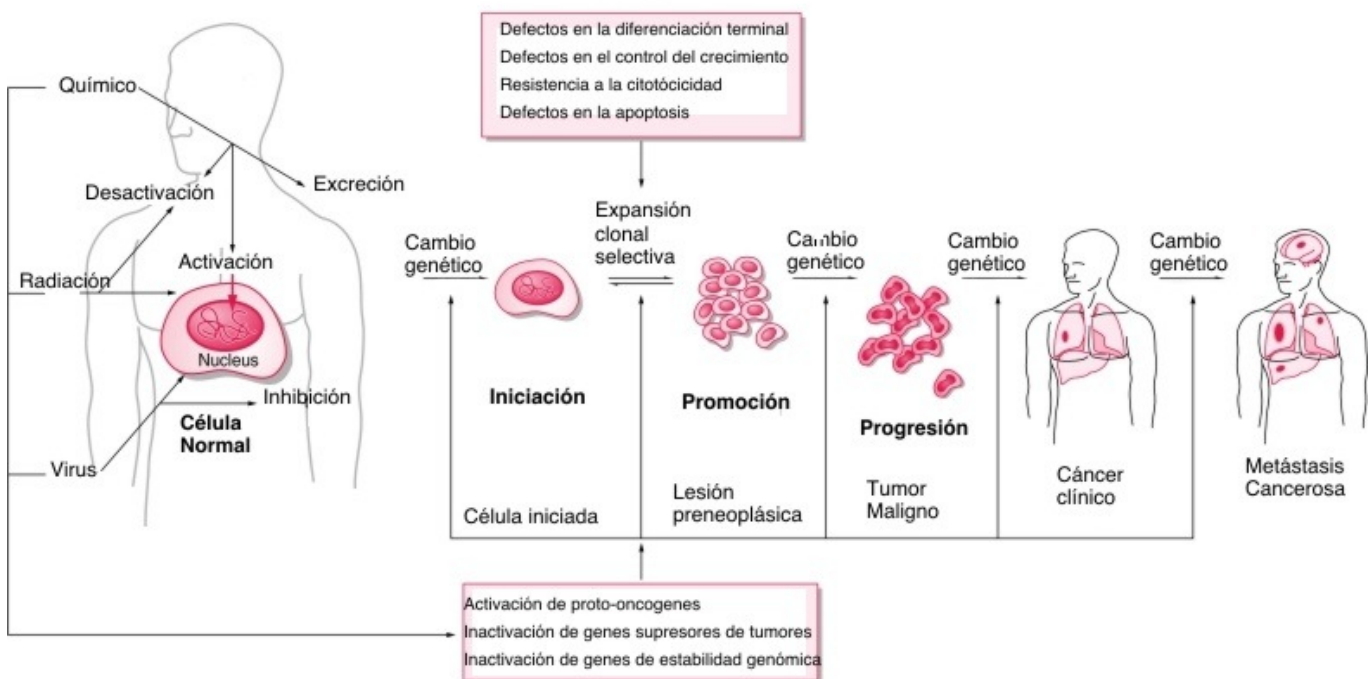


Figura 1. Etapas de la carcinogénesis.

Promoción del tumor

La forma en que ocurre la promoción del tumor es a través de la expansión clonal de las células iniciadas². El producto final de la promoción es un foco de células capaces de transformarse a células tumorales. Estas células deben sufrir uno o más cambios adicionales durante la progresión hacia una neoplasia maligna⁹. Las sustancias promotoras de la expansión clonal no son mutagénicas y median su efecto biológico sin actividad metabólica,

ejemplos de estas sustancias son el 13-acetato de 2-O-tetradecanoilforbol (TPA) y las hormonas.

Oncogenes y genes supresores de tumor

Dos categorías de genes juegan un papel central en la formación del tumor, ya que estos genes controlan el crecimiento y ciclo celular.

La primera categoría son los proto-oncogenes, que son genes que codifican proteínas que participan en la división y diferenciación celular. Los oncogenes son genes mutados a partir de los proto-oncogenes. Un oncogén le proporciona a la célula ganancia de función, permitiéndole proliferar de manera descontrolada. Los proto-oncogenes pueden ser genes que codifiquen para: a) Factores de crecimiento como son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), etc. b) Receptores para los factores de crecimiento anteriormente indicados. c) Transductores de señales como la proteína Ras, la cual se activa en respuesta a una señal mitótica y puede activar a otras proteínas para promover la división celular y d) Proteínas que regulan la apoptosis, como la proteína Bcl-2 que muestra actividad anti-apoptótica^{10,11,12}.

La otra categoría de genes son los genes supresores de tumor que codifican proteínas que inhiben la división celular y su mutación genera pérdida de función. Entre ellos se encuentran: a) Genes que controlan la división celular, como es el caso de RB (retinoblastoma). b) Genes involucrados en la reparación del DNA, como son BRCA1 y BRCA2 y c) Genes que participan en la apoptosis, como P53¹⁰.

Progresión del tumor

Como resultado de las alteraciones antes indicadas, algunas células llevan a cabo la expresión del fenotipo tumoral y la tendencia a invadir tejidos adyacentes. Además, las células tumorales pueden sintetizar enzimas proteolíticas, tales como las metaloproteasas (MMP) degradando la membrana basal y entrando así al sistema vascular generando tumores secundarios en otros órganos; proceso conocido como metástasis⁴.

Cáncer Pulmonar

A nivel mundial, el cáncer pulmonar es el tumor de mayor incidencia, hasta 2008 había un estimado de 16.1 millones de nuevos casos, que representaron el 16.5% de todos los casos nuevos de cáncer en el mundo¹³. También es el de mayor mortalidad, con 1.38 millones de muertes (22.5% del total). El cáncer de pulmón sigue siendo el cáncer más común en hombres a nivel mundial (1.1 millones de casos, 16.5% del total) siendo más frecuente entre la quinta y la séptima décadas de la vida¹⁴. En las mujeres, el cáncer de pulmón es ahora el cuarto cáncer más frecuente (516 000 casos, 8.5% del todos los cánceres)¹⁵.

El principal factor de riesgo relacionado con esta neoplasia es el hábito tabáquico¹⁶. Hasta un 85% de las neoplasias pulmonares se relacionan con el tabaquismo, estando directamente relacionada su aparición con la edad de inicio del hábito tabáquico, el número de cigarrillos que se consumen al día, la exposición prolongada y los cigarrillos sin filtro¹⁴. El humo de cigarro contiene más de 4,500 compuestos en fase gaseosa y particulada; sin embargo, los principales carcinógenos contenidos en el humo de cigarro que se han relacionado directamente al cáncer pulmonar son: el benzo[a]pireno y la nitrosamina 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales una vez activados por enzimas específicas, como el citocromo P450, producen alteraciones en el DNA de las células y dan inicio al proceso de carcinogénesis¹⁷.

Existen otros carcinógenos que incrementan el riesgo de padecer esta neoplasia y están relacionados con factores ocupacionales, entre los cuales se encuentran, el humo de leña o carbón, la exposición al radón o la exposición al asbesto, este último suele encontrarse comúnmente en vinilos para techos, cielos rasos y en material de aislamiento, cemento y materiales de frenos de automóviles¹⁸.

La mayoría de los pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados en una etapa muy avanzada. La realización de una tomografía axial computarizada toraco-abdominal es fundamental para una correcta estadificación tumoral, que sigue la clasificación Tumor Nódulo Metástasis (TNM)¹⁴. El 87% de los pacientes con cáncer pulmonar son diagnosticados en

etapas avanzadas, en esta etapa la tasa de supervivencia a 5 años es del 4% (Tabla I)¹⁹. Los lugares más frecuentes de diseminación son el hígado, el hueso, las glándulas suprarrenales y el cerebro¹⁴. La sintomatología más frecuente que se presenta en estadios avanzados son tos, disnea, dolor torácico, hemoptisis, disfagia y disfonía¹⁹.

Tratamiento en el Cáncer Pulmonar

Las principales opciones de tratamiento para el cáncer pulmonar son la resección quirúrgica, la radioterapia y quimioterapia adyuvante o paliativa (Tabla I), solas o combinadas, dependiendo del estadio, el tipo de carcinoma pulmonar y el estado de salud del paciente^{14, 19}.

Los tratamientos locales como la cirugía (CIR) y la radioterapia (RT) son potencialmente curativos en estadios poco avanzados de la enfermedad. En estadios avanzados, las opciones terapéuticas son la radioterapia y la quimioterapia (QT) que producen una importante paliación de los síntomas¹⁹.

Tabla I. Principales opciones de tratamiento en base al estadio de la enfermedad y su tasa de sobrevida.

Tratamiento del Cáncer pulmonar en base al estadio			
Estadio	Tratamiento primario	Terapia adyuvante	Tasa de supervivencia a 5 años (%)
Carcinoma de células no pequeñas			
I	Resección	Quimioterapia	60 a 70
II	Resección	Quimioterapia con o sin radioterapia	40 a 50
IIIA (Resecable)	Resección con o sin quimioterapia pre-operativa	Quimioterapia con o sin radioterapia	15 a 30
IIIA (No resecable) o IIIB	Quimioterapia con actual o subsecuente radioterapia	Ninguna	10 a 20
IV	Quimioterapia para eliminar metástasis primarias al cerebro y tumores primarios	Ninguna	10 a 15 (Sobrevida a 2 años)
Carcinoma de células pequeñas			
Enfermedad limitada	Quimioterapia y radioterapia	Ninguna	15 a 20
Enfermedad extendida	Quimioterapia	Ninguna	<5

Clasificación histológica del cáncer pulmonar

La clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) divide al cáncer pulmonar en dos grandes categorías por sus características histopatológicas: i) carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) que comprende alrededor del 20% de los carcinomas pulmonares y ii) carcinoma pulmonar de células no-pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) que comprende alrededor del 80%²⁰. Cabe señalar que esta clasificación tiene importantes implicaciones para el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad¹⁴.

Otro tipo de cáncer de pulmón que está ganando gran incidencia en la población por su factor de riesgo con el asbesto, es el mesotelioma, el cual surge principalmente de la pleura y es responsable del 3-4% de los cánceres de pulmón¹⁸.

NSCLC

El NSCLC comprende un grupo heterogéneo de diversos tipos histológicos de cáncer pulmonar, los tipos más frecuentes son adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes²⁰. Todos comparten enfoques similares de tratamiento y pronóstico, pero tienen distintas características histológicas y clínicas¹⁹.

Adenocarcinoma pulmonar

Deriva del epitelio de los alveolos y las glándulas mucosas bronquiales. Tiene una incidencia de alrededor del 40% de todos los casos de cáncer pulmonar²⁰. De acuerdo a la OMS, los adenocarcinomas pueden ser sub clasificados como: papilar, acinar, bronquialveolar, adenocarcinoma mixto y adenocarcinoma sólido con formación de mucina. Los adenocarcinomas pulmonares son frecuentemente heterogéneos y consisten en una mezcla de subtipos histológicos; sin embargo, la producción de mucina y la formación de glándulas son

características que distinguen a los adenocarcinomas de los demás carcinomas pulmonares. Los subtipos acinares (glandular) y papilar son reconocibles por el patrón de crecimiento celular e invasión²¹. Este tumor es de localización periférica, afectando incluso a la pleura o pared torácica. Es de lento crecimiento y puede tomar años en desarrollarse de un cáncer confinado a un cáncer metastásico²¹.

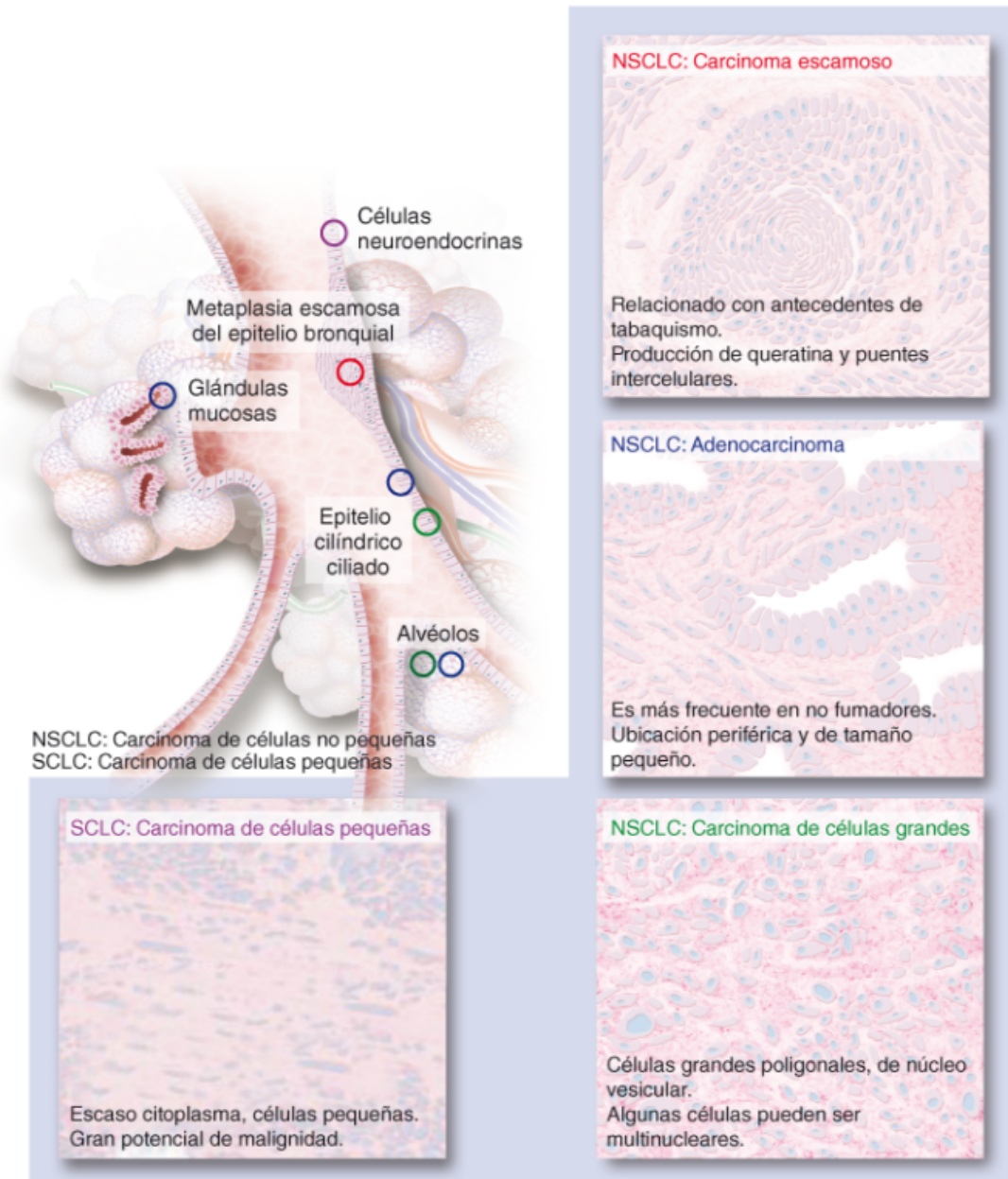


Figura 2. Principales tipos histológicos de carcinomas pulmonares

Las células cancerosas de adenocarcinoma son largas, cilíndricas y forman patrones glandulares reconocibles. Por inmunohistoquímica, el diagnóstico de adenocarcinoma se obtiene mediante el resultado positivo a los marcadores factor de transcripción tiroideo (TTF-1, por sus siglas en inglés) y citoqueratina 7 (CK-7)^{19, 22}.

Carcinoma epidermoide o de células escamosas

Representa aproximadamente el 38% de todos los casos de cánceres pulmonares diagnosticados. Histológicamente se caracteriza por presentar queratinización de células tumorales con formación de perlas de queratina y puentes intercelulares. Las células tumorales son delgadas y planas. Por lo general se desarrollan en los grandes tubos bronquiales del centro de los pulmones, su desarrollo es más lento en comparación con otros subtipos de cánceres de pulmón²¹.

Carcinoma de células grandes

Comprende alrededor del 9% de todos los cánceres pulmonares²⁰. Tiene un gran espectro de morfología, la mayoría consiste en abundante citoplasma y gran núcleo con prominente nucléolo. Estos carcinomas también incluyen variantes específicas, incluyendo el carcinoma neuroendocrino de células grandes¹⁹.

SCLC

Este tipo de tumor comprende aproximadamente del 10-25% de todos los casos de cáncer pulmonar a nivel mundial²³. El SCLC se desarrolla usualmente en las células neuroendocrinas que recubren los bronquios, por lo que ésta región es donde usualmente inicia el desarrollo de este tipo de tumor. El SCLC es la forma más agresiva de carcinoma pulmonar, este tipo de tumor se desarrolla rápidamente y forma grandes tumores. Las células drenan a los nódulos del pulmón, para hacer metástasis rápidamente. Por su gran capacidad metastásica temprana, los SCLC son de muy mal pronóstico²¹. Estas células cancerosas producen hormonas, con lo que pueden causar síndromes paraneoplásicos¹⁹.

Mesotelioma

El mesotelioma maligno (MM) es otro tipo de cáncer pulmonar, las células cancerosas se originan a partir de la transformación tumoral de las células mesoteliales de la pleura (la capa delgada de tejido que reviste la cavidad torácica y los pulmones)²⁰.

Mientras que el hábito tabáquico es considerado como la causa primordial de los carcinomas pulmonares, el asbesto es la causa primordial del MM¹⁸; aunque el hábito tabáquico y el asbesto tienen un efecto sinérgico en la patogénesis del cáncer pulmonar. Aproximadamente el 80% de los casos de MM está asociado con exposición a asbestos y se estima que cerca del 5% de los trabajadores de la industria del asbesto desarrollan mesotelioma^{18, 24}.

La patogénesis del MM ocurre cuando las fibras de asbesto alcanzan la región alveolar, la respuesta inicial del cuerpo es fagocitar y remover dichas fibras del pulmón, aunque, si dichas fibras son demasiado largas estas no pueden ser removidas²⁵. Las fibras de asbesto alcanzan la pleura a través de los bazo linfáticos o por penetración directa causando fibrosis, placas pleurales, y eventualmente MM^{18, 25}. Una vez que las fibras alcanzan la pleura, causan cambios mutagénicos a través de una interacción física directa o indirectamente por la producción de especies reactivas de oxígeno, tales como los radicales hidroxilo y aniones superóxido, dando lugar a rupturas de la cadena de DNA y a deleciones en el material genético^{26,27}. Las partículas de asbesto afectados alteran la función de los genes que regulan el ciclo celular y que están alterados en varios tipos de cáncer humano, tales como los genes supresores de tumores *TP53* y *Rb*^{18,25}.

Para la clasificación del mesotelioma maligno se emplean las siguientes etapas: i) Mesotelioma maligno localizado, comprende la etapa I, en la cual el cáncer se encuentra en el recubrimiento de la cavidad torácica, cerca del pulmón o el corazón, o en el diafragma o el pulmón; ii) Mesotelioma maligno avanzado comprende las siguientes etapas, etapa II en la que el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos del área; en la etapa III, el cáncer se ha diseminado a la pared torácica, al centro del tórax, al corazón, a través del diafragma o al recubrimiento

abdominal y en algunos casos a los ganglios linfáticos adyacentes, y la etapa IV, en la que el cáncer se ha diseminado a órganos o tejidos distantes; iii) Mesotelioma maligno recurrente, en la que el cáncer ha vuelto a aparecer después de haber sido tratado²⁰.

El mesotelioma pleural maligno es predominantemente una enfermedad locoregional, difusa y agresiva, con una supervivencia media de 9 a 17 meses. Sin embargo, el pronóstico depende de la etapa en que se diagnostica al tumor, la edad, la salud general del paciente y si la cirugía es o no opción para el paciente^{28,18}.

Sistema inmune y cáncer

El sistema inmune es una red en la que participan diferentes tipos de células y de moléculas. La acción coordinada de todos sus elementos permite que se desarrolle una respuesta eficaz contra los tumores²⁹.

El sistema inmune presenta diversos mecanismos que le permiten reconocer y eliminar las células tumorales, en estos eventos hay interacción de distintas moléculas como las del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), el receptor de los linfocitos T (TCR), moléculas de adhesión, antígenos tumorales y citocinas. Sin embargo, en algunas ocasiones, la respuesta inmune no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal, lo que trae como consecuencia el desarrollo de un tumor. El papel que desempeña el sistema inmune en el control de tumores fue propuesto inicialmente por Thomas y Burnet en 1957, con la teoría de la "vigilancia inmunológica". Esta teoría postula que, dentro de un organismo, continuamente se están generando células tumorales, pero que éstas son identificadas y destruidas rápidamente por el sistema inmune. La importancia de la vigilancia inmunológica ha sido comprobada por el incremento en la aparición de tumores en animales timectomizados y en humanos que presentan inmunosupresión³⁰.

Modelo de daño

En 1989, Janeway³¹ postuló que la discriminación entre lo infeccioso, lo no infeccioso y moléculas no propias es hecho por las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) del sistema inmune innato, a través de receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) presentes en microorganismos³². Los PAMPs están naturalmente asociados con los procesos infecciosos y son componentes de muchos adyuvantes³¹. El modelo de Janeway es en gran parte correcto; sin embargo, no puede explicar el hecho de que el sistema inmune posee mecanismos para sensor la muerte celular necrótica primaria y secundaria, además de la respuesta inmune innata y adaptativa relacionada a ésta, incluyendo la robusta respuesta de células T generada

en respuesta a trasplantes, tumores y enfermedades autoinmunes, debido a que todas estas enfermedades carecen de componente microbiano³³.

Considerando estas excepciones, en 1994 Matzinger³¹ propuso la hipótesis del daño, en ella se postula que el sistema inmune adaptativo evolucionó para responder no solo a la infección *per se*, si no también a la muerte celular no fisiológica, daño o estrés. En este modelo, las células que se encuentran en proceso de muerte liberan un conjunto de moléculas llamadas alarminas, éstas junto con los PAMPs, pueden ser consideradas subgrupos de un gran grupo de moléculas, que usando una nomenclatura similar a los PAMPs, han sido llamadas Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés)^{31,32}.

Las alarminas son moléculas intracelulares que poseen una determinada función dentro de las células viables, por lo cual se encuentran ocultas del reconocimiento del sistema inmune bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, cuando son liberadas de las células, son rápidamente reconocidas por el sistema inmune³⁴.

Para que una molécula sea considerada una alarmina debe poseer ciertas características: i) ser liberada rápidamente después de la muerte celular no programada (por ejemplo necrosis) pero no de células en apoptosis fisiológica; ii) las células del sistema inmune pueden ser inducidas a producir y liberar estas alarminas sin morir; iii) las alarminas pueden reclutar y activar células del sistema inmune innato, incluyendo monocitos/macrófagos y células dendríticas; iv) y finalmente, las alarminas contribuyen a restablecer la homeostasis, promoviendo la reconstrucción del tejido destruido³².

La forma en la que las células mueren tiene un profundo efecto sobre el sistema inmune (Figura 3), cuando las células mueren por necrosis se pierde la integridad de la membrana celular y se produce una liberación pasiva de estas alarminas conduciendo a un proceso inflamatorio. Mientras que la muerte celular por apoptosis fisiológica conduce principalmente al secuestro de este conjunto de moléculas dentro de cuerpos apoptóticos que conducen a respuestas para generar reparación tisular y tolerancia a nivel del sistema inmune³⁵.

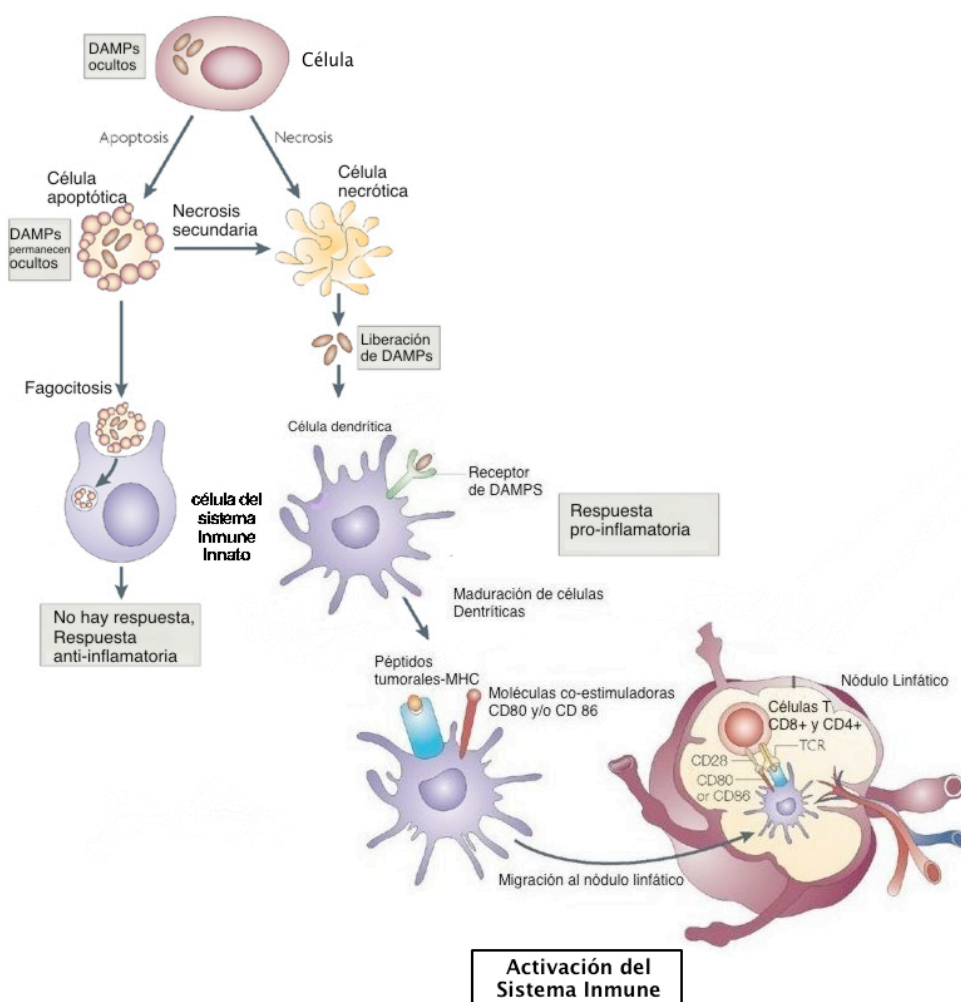


Figura 3. En condiciones fisiológicas, “las alarminas” se encuentran cumpliendo una función dentro de las células, cuando son liberadas durante la necrosis y por células inmunes activadas tienen efectos sobre la respuesta inmune innata y adaptativa. ^{Adaptado de referencia 36}

Recientemente se ha descrito otro tipo de muerte celular, esta muerte es generada en respuesta a ciertos tipos de tratamiento, tales como la quimioterapia y la radiación ultravioleta. Este tipo de muerte celular se ha denominado apoptosis inmunogénica³⁶. A diferencia de la apoptosis fisiológica, la inmunogenicidad de este tipo de muerte celular es mediada por la exposición y liberación de las alarminas³⁷. Una vez expuestas o liberadas de las células moribundas, las alarminas interactúan con receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) y receptores tipo NOD (NLRs, por sus siglas en inglés). Una de las principales características de las alarminas es ejercer varios efectos en las APCs, como maduración, activación, procesamiento y presentación de antígenos³⁸.

El concepto de apoptosis inmunogénica es un concepto relativamente nuevo y a diferencia de la apoptosis fisiológica, la apoptosis inmunogénica inicia una respuesta inmune adaptativa, favoreciendo la activación y maduración de células dendríticas (CDs) que posteriormente migran a los ganglios linfáticos para activar a los linfocitos T cooperadores (CD4+) y T citotóxicos (CD8+)³⁶.

En primera instancia, la inducción de una efectiva inmunidad antitumoral (*in vitro* e *in vivo*) fue observada en ratones inmunocompetentes con tumores, que al ser tratados con antraciclinas, presentaron regresión tumoral³⁹. Pronto se encontró que aparte de las antraciclinas, otros agentes quimioterapéuticos producían una muerte inmunogénica en las células tumorales. En otro estudio *in vitro* se reportó que las células tumorales al ser tratadas con bortezomib (agente quimioterapéutico) activaban a las células dendríticas (DC's) y subsecuentemente se inducía una respuesta específica de células T en contra del tumor en "modelos murinos"⁴⁰. Subsecuentemente, el concepto de muerte celular inmunogénica fue apoyado por una serie de estudios que demostraban que las células tumorales implantadas en ratones inmunocompetentes tratadas *in vitro* con antraciclinas, oxaliplatino o radiación ionizante, activaban respuestas inmunes adaptativas en contra de las células tumorales, en ausencia de cualquier adyuvante o sustancia inmunoestimuladora⁴¹.

Las alarminas mejor caracterizadas que participan en estos procesos son las proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés), la familia de proteínas S100, ácido úrico, citocinas como la IL-1 α e IL-33, productos de degradación de la matriz extracelular tales como fragmentos de ácido hialurónico, y proteínas asociadas al núcleo celular como HMGB1³⁵. En el presente trabajo se analizará la molécula HMGB1, considerada una alarmina clásica, que además, cumple con todas las características antes mencionadas de las alarminas.

High-Mobility Group Box 1

La HMGB1 es una proteína nuclear tipo no-histona, miembro de la familia del grupo de proteínas de alta movilidad electroforética⁴². Estas proteínas están divididas en tres subgrupos: HMGB, HMGN, HMGA. Estos subgrupos son similares en varias características físicas; sin embargo, cada familia tiene un motivo de secuencia funcional característico, el cual es el sitio principal de interacción con el DNA. El motivo funcional de la familia HMGB es llamado HMG-Box⁴³. La familia HMGB está compuesta por HMGB1, HMGB2 y HMGB3⁴⁴.

La HMGB1 es la más abundante de las proteínas HMGB. El gen *Hmgb1* está localizado en el cromosoma 13q12 en el humano, consiste de seis exones que codifican para una proteína de 215 aminoácidos con un peso molecular de 30 kDa, tiene dos dominios de unión al DNA (llamados caja A y caja B) y un carboxilo terminal⁴². Estructuralmente HMGB1 consiste en tres α -hélices dispuestas en forma de L⁴². Los dominios cajas A y B poseen cada una alrededor de 75 aminoácidos de longitud, y el dominio carboxilo-terminal que esta cargado negativamente consiste en un tramo continuo de residuos de glutamato y aspartato⁴⁵. Tanto los dominios A y B de HMGB1 se unen al surco menor del DNA, el dominio A tiene una mayor afinidad por estructuras de DNA distorsionadas (aductos de ADN formados por cisplatino); en contraste el dominio B es menos afín a estas estructuras⁴⁶. El dominio C-terminal modula los efectos de HMGB1 sobre el DNA, tales como la interacción de HMGB1 con las proteínas de la maquinaria de remodelación de los nucleosomas y la cromatina⁴⁷.

Funciones nucleares de HMGB1

Cuando la célula esta viable, la HMGB1 se localiza en el núcleo. Su localización nuclear se debe a que posee dos secuencias señal de localización nuclear (NLS1 y 2)⁴⁸. La HMGB1 se encuentra asociada transitoriamente a los nucleosomas (Figura 4), se une a estos en una manera dependiente de conformación pero independiente de secuencia⁴⁹. En el núcleo de las células, las funciones de HMGB1 son participar en los procesos de replicación celular, recombinación de genes, transcripción y reparación del DNA. Tanto el dominio caja A como el

B son requeridos para facilitar la unión de algunos complejos de nucleoproteínas, tal como el complejo de recombinación V(D)J y el enhanceosoma ZEBRA^{49,47}.

Además, se ha reportado que la HMGB1 dentro del núcleo de las células cancerígenas interactúa (aumentando la actividad) con un gran número de factores de transcripción implicados en el desarrollo del cáncer, estos incluyen p73, Oct-1 y 2, HoxD9, RB, miembros de la familia Rel/NF-κB y receptores hormonales nucleares incluyendo el receptor a estrógenos^{47,49}.

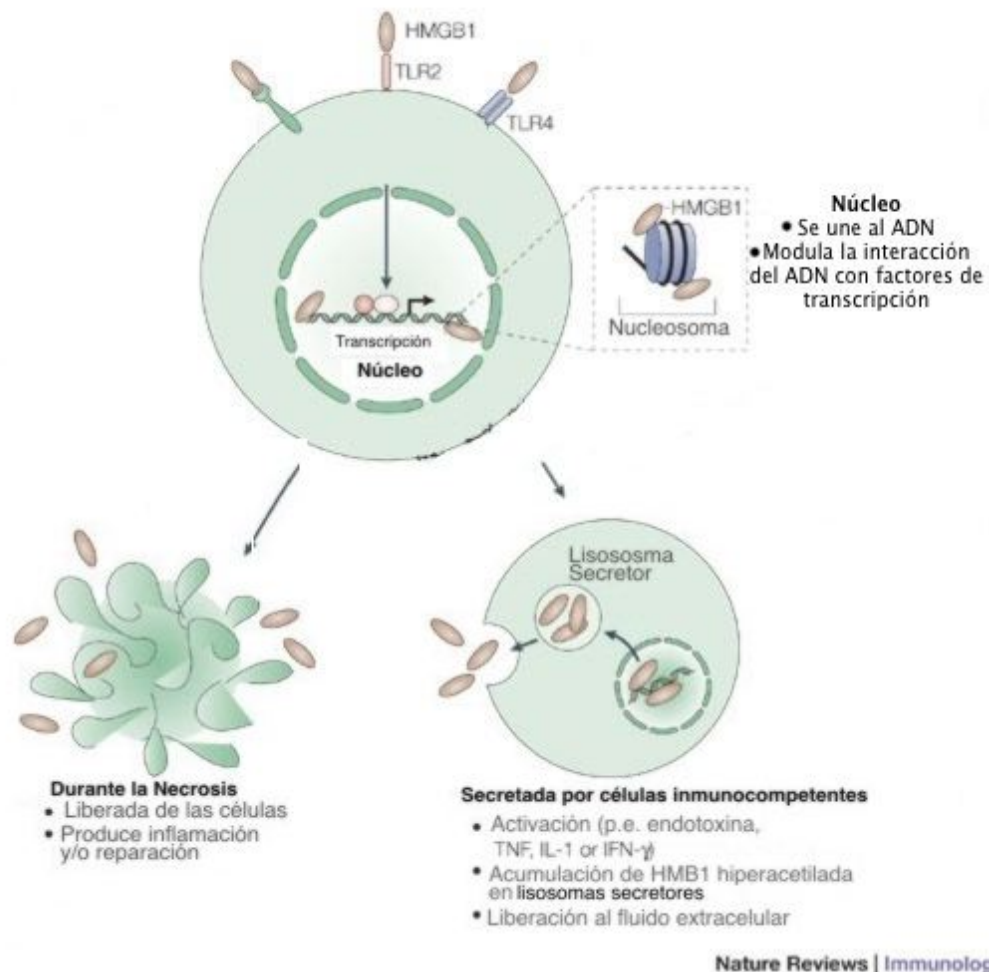


Figura 4. Funciones Intracelulares y Extracelulares de HMGB1. Adaptado de referencia 52

Funciones de la molécula HMGB1 extracelulares

La localización de HMGB1 es principalmente nuclear; sin embargo, puede ser translocada al citoplasma y posteriormente secretada al microambiente extracelular, actuando como una alarmina³².

La HMGB1 es expresada de forma ubicua en todas las células del cuerpo, pero su nivel de expresión y localización celular depende tanto del tipo de célula como su estado de activación. En el caso de las células del sistema inmune, los niveles de expresión de la HMGB1 aumentan cuando la célula se encuentra en un estado activado (Figura 4).

HMGB1 puede relocalizarse de núcleo a citoplasma a través de 2 vías distintas (Figura 4):

I) De forma pasiva, cuando las células mueren por necrosis, la cual está asociada con la pérdida de la compartimentalización de las membranas nuclear y citoplasmática y con la liberación de los componentes intracelulares³¹.

II) De forma activa, los monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras, en respuesta a lipopolisacárido, TNF- α , o por estimulación con IL-1 β , secretan activamente HMGB1, además de otras alarminas tales como ácido úrico, HSPs, etc.

El grado de acetilación de HMGB1 puede influir en su localización intracelular. La proteína acetilada en las lisinas 2 y 11 puede ser liberada por las células en proceso de muerte. En contraste, la HMGB1 acetilada en todas las lisinas presentes en su secuencia (incluyendo los dominios de localización nuclear) es secretada activamente. La proteína acetilada puede entrar a los lisosomas secretorios que son vesículas intracelulares cuyo contenido es liberado al medio extracelular. Otras modificaciones postraduccionales como son la fosforilación posiblemente facilitan el transporte núcleo/citoplasma de HMGB1 dentro de las células⁵⁰, mientras que la metilación hace que HMGB1 se encuentre menos unida al DNA y como consecuencia de esto difunda pasivamente al citoplasma de los neutrófilos⁵¹.

La HMGB1 después de ser liberada puede participar en procesos patológicos como son el Alzheimer⁵², artritis⁵³ y cáncer^{46,48,54,55}. La HMGB1 participa en estas patologías como una alarmina funcionando como:

I) Señal de peligro y como un factor quimiotáctico sobre monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas³². Otras células que responden quimiotácticamente a HMGB1 incluyen, enterocitos, células pre-endoteliales y de músculo liso⁵⁶.

II) Induce un proceso inflamatorio debido a que, en este contexto, HMGB1 puede actuar como una citocina pro-inflamatoria e inducir la liberación de otras citoquinas proinflamatorias de células mononucleares como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina 1- α (IL-1 α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), y la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa y beta (MIP-1 α y MIP-1 β)⁵⁷.

III) Promueve la supervivencia celular. La HMGB1 se une con gran afinidad a RAGE, un receptor multiligando que activa vías de supervivencia que involucran al factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la proteína cinasa activada por mitógenos p38 (MAPK, por sus siglas en inglés)³².

IV) Activa la respuesta inmune innata y adaptativa. La HMGB1 interactúa con el TLR4 y el TLR2 presente en las células dendríticas inmaduras (iDCs) implicadas en la presentación cruzada de antígenos a linfocitos T *in vivo*⁵⁸.

HMGB1: Función extracelular en el cáncer

En el desarrollo tumoral la HMGB1 tiene una función tanto protumoral como anti-tumoral. Actuando como protumoral puede promover una angiogénesis y progresión tumoral, mientras que como antitumoral puede participar en la generación de una respuesta inmune anti-neoplásica dependiente de células T⁵⁹.

Funciones protumorales de HMGB1

La progresión tumoral requiere una estrecha colaboración entre las células del tumor, las del sistema inmune y de los elementos del estroma⁶⁰. Datos recientes han llevado a la conclusión de que el constante crecimiento del tumor sumado a la muerte de células tumorales por falta de oxígeno y nutrientes, genera zonas de hipoxia y un estado anti-inflamatorio dado por un microambiente compuesto principalmente por IL-10 y TGF- β (ambas producidas por las células tumorales), el cual activa la neo angiogénesis en un tumor sólido e inhibe la respuesta anti-tumoral de los macrófagos y linfocitos³⁰. La constante muerte de células tumorales (Figura 5) en estas áreas de hipoxia es acompañada por la liberación crónica de alarminas, entre estas HMGB1⁶¹. La HMGB1 presente en el microambiente ejerce varios efectos, incluyendo supervivencia celular, angiogénesis, migración e invasión de las células tumorales a través de la activación del receptor RAGE^{59,29}.

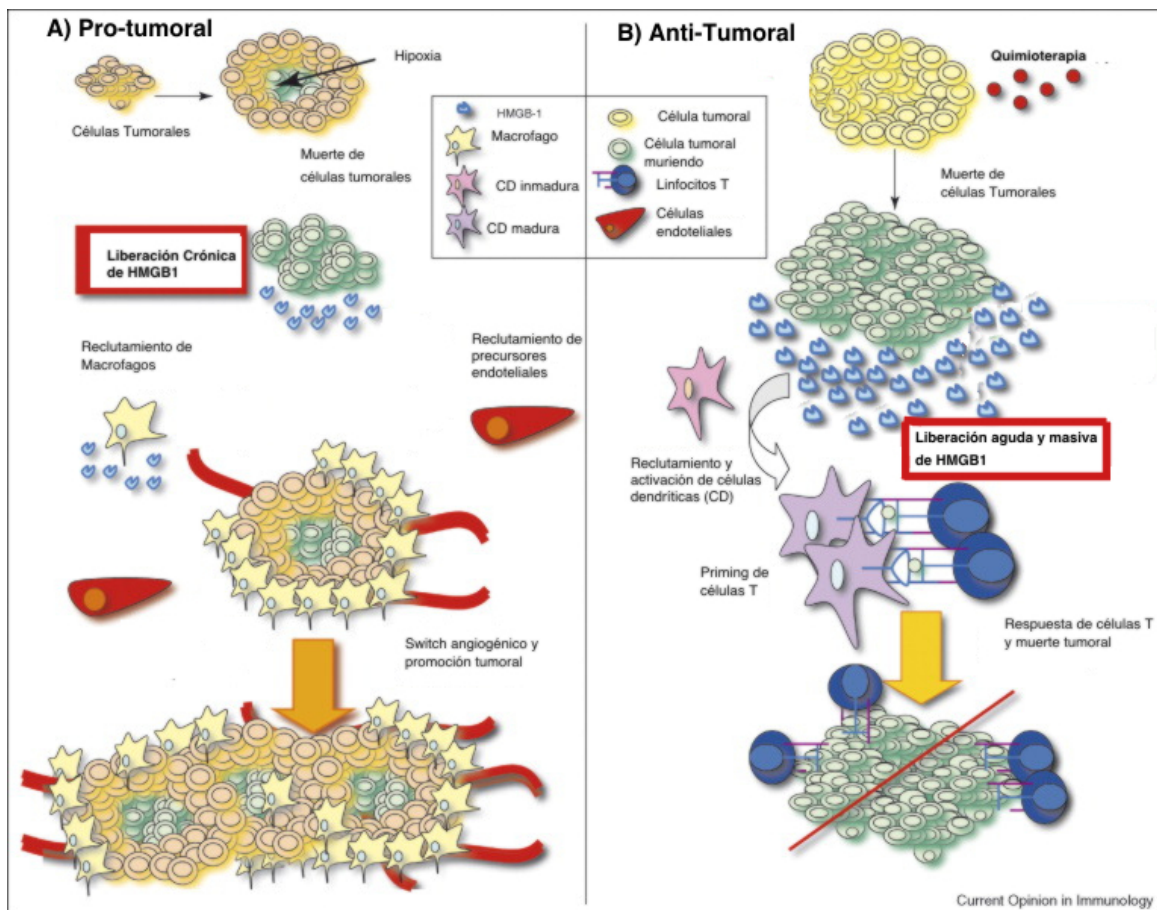


Figura 5. La doble acción de HMGB1 a nivel extracelular en el cáncer. A) La persistente hipoxia en los tumores sólidos causa una liberación crónica de HMGB1 que favorece la angiogénesis y progresión tumoral. B) Por otro lado, la liberación aguda y masiva de HMGB1 después de los tratamientos antineoplásicos promueve la formación de una respuesta inmune anti-tumoral. Adaptado de referencia 63

La HMGB1 promueve la formación de respuestas inmunes en contra de tumores

La cirugía, la quimioterapia y la radiación son actualmente las tres principales opciones para el tratamiento contra el cáncer¹⁹. La cirugía elimina los principales nichos tumorales, mientras que la quimioterapia y la radioterapia destruyen células tumorales remanentes y circulantes a través del proceso de apoptosis³⁸. Recientemente se ha demostrado en modelos *in vitro* y modelos murinos que ciertos compuestos quimioterapéuticos tienen la capacidad de producir una muerte inmunogénica en las células tumorales⁶². Este tipo de muerte se caracteriza por la liberación y exposición, en forma aguda de alarminas (Figura 5) por las células tumorales susceptibles al tratamiento⁵⁹. Entre estas alarminas se encuentra la HMGB1⁵⁰. Como una alarmina liberada por efecto del tratamiento quimioterapéutico, la HMGB1 tiene varios efectos sobre el sistema inmune, entre los que se encuentran:

I) Como ya se mencionó, HMGB1 puede unirse a varios receptores como son RAGE, TLR2 y TLR4. La interacción HMGB1-RAGE en las iDCs favorece la reorganización de su citoesqueleto (de manera dependiente de proteína G) para interrumpir su adhesión con las células que las rodean y los componentes de la matriz tisular, facilitando así su entrada en la linfa a través de los vasos linfáticos^{56,63}. Una vez dentro de la linfa, la interacción HMGB1-TLR4 en las DCs favorece el aumento en la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, cuyos ligandos CCL19 y CCL21 son expresados en los ganglios linfáticos⁶⁴. Estos dos eventos son cruciales para que las DC implicadas en el reconocimiento y captación de antígenos, dejen el sitio del tumor y migren hacia los órganos linfoides secundarios, en donde estas podrán interactuar con linfocitos T naïve y linfocitos T de memoria⁵⁶.

II) Estudios recientes en modelos murinos han demostrado que la proteína HMGB1 es indispensable para los mecanismos inmunoadyuvantes de la quimioterapia, tales como el procesamiento y presentación cruzada de antígenos provenientes de células tumorales⁶⁵. Dichos mecanismos no están totalmente estudiados, sin embargo se ha demostrado que la interacción HMGB1-TLR4 previene la degradación acelerada de la carga fagocítica dentro de las iDCs, permitiendo así un óptimo procesamiento de los antígenos tumorales⁶⁶. Además, se ha estudiado que la presentación cruzada de antígenos derivados de células tumorales, por parte de las DCs a linfocitos T es dependiente de la interacción HMGB1-TLR4 y el adaptador

MyD88⁶⁶.

III) En modelos *in vitro* se ha demostrado que las DCs tratadas con HMGB1 incrementan su grado de maduración, es decir “expresan” CD83, un marcador de maduración de DCs, además se aumenta la expresión de moléculas de superficie necesarias para la presentación de antígenos, tales como CD80, CD86 y moléculas del MHC de clase II⁶⁷.

IV) También se ha estudiado que la proteína HMGB1 puede incrementar la secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como, interleucina-12, IL-6, IL-1 α , IL-8, TNF- α y RANTES⁵⁷. La expresión de estas citocinas es dependiente de la vía MAPK p38⁵⁰

V) Dentro de las principales funciones de la proteína HMGB1 en contra del tumor, se encuentra la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo Th1, mediante la inducción de la secreción de IL-12 por parte de las células dendríticas maduras, y de IL-2 e INF- γ por las células T. Ambos eventos contribuyen a la formación de linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos en contra del cáncer^{68,69}.

Antecedentes

Como se mencionó, debido a su papel multifuncional la proteína HMGB1 tiene un rol importante en distintas condiciones patológicas incluyendo el cáncer^{46,48,54,55}.

Apetoh⁶⁵, Casares³⁹ y Tesniere⁷⁰ han reportado que el efecto citotóxico de la quimioterapia y radioterapia induce la exposición y liberación de un conjunto de moléculas llamadas alarminas, entre ellas HMGB1. Este proceso de exposición y liberación de alarminas es llamado muerte inmunogénica y se caracteriza por activar tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa³⁶. Posterior al tratamiento, la liberación de la HMGB1 se da en forma aguda y en concentraciones mayores a las condiciones sin tratamiento debido a la destrucción de las células tumorales sensibles a los fármacos quimioterapéuticos.

El aumento en la expresión de HMGB1 se ha reportado en casi todos los tipos de tumor, apoyando la hipótesis de que HMGB1 es una señal de peligro³². Dentro de nuestro grupo de trabajo se ha observado en cortes histológicos provenientes de biopsias que en las células del epitelio pulmonar bronquial normal, así como en la región alveolar cercana al tumor la distribución de HMGB1 es a nivel nuclear, mientras que en las células de adenocarcinomas pulmonares la distribución de HMGB1 fue, en la mayoría de los casos, en el citoplasma o en el núcleo y citoplasma de las células tumorales⁷⁹. Así mismo, la adición de cisplatino a las líneas tumorales de adenocarcinoma induce la apoptosis y la liberación de HMGB1⁷¹.

Niveles séricos de HMGB1 reportados en distintos tipos de cáncer

En biopsias de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, se ha observado que los niveles de la proteína HMGB1, medidos por tinción inmunohistoquímica, se encuentran elevados cuando se les compara con tejido normal de sujetos sanos⁷¹. Además, se ha observado que dicho aumento puede ser un marcador de buen pronóstico en los pacientes que han recibido cirugía y quimioterapia adyuvante. En los pacientes con cáncer gástrico que recibieron quimioterapia dicho aumento en la expresión de la HMGB1 se asocia de manera

positiva con la sobrevida libre de cáncer^{72,71}.

En pacientes con cáncer cervicouterino se ha observado que los niveles séricos de la HMGB1 se encuentran elevados en comparación a sujetos sanos, y este incremento en las concentraciones séricas de la HMGB1 es un marcador útil para evaluar el peor pronóstico de la enfermedad en términos de recurrencia y metástasis⁷³.

Cheng⁷⁴ y colaboradores reportaron que en pacientes con diagnóstico de cáncer hepatocelular sin tratamiento, los niveles séricos de la HMGB1 están significativamente más elevados en comparación con los niveles séricos de pacientes con cirrosis hepática, hepatitis crónica y sujetos sanos; por lo que sugieren que el incremento en los niveles séricos de la HMGB1 puede ser un marcador útil para evaluar el estadio del tumor, además de que se puede asociar a un mal pronóstico de la enfermedad⁷⁴.

En cáncer pulmonar existen pocos reportes acerca de la cuantificación a nivel sérico en pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar. Se ha reportado que los niveles séricos de la HMGB1 están significativamente más elevados en pacientes con cáncer pulmonar en comparación con pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y sujetos normales sanos. Además, los investigadores proponen que la proteína HMGB1 puede ser un marcador clínico útil para evaluar la progresión del cáncer de pulmón en pacientes que no han recibido tratamiento⁷⁵.

Justificación

A nivel mundial, el cáncer pulmonar es el tumor de mayor incidencia, hasta 2008 había un estimado de 16.1 millones de nuevos casos, que representaron el 16.5% de todos los casos nuevos de cáncer en el mundo¹³. También es el de mayor mortalidad, con 1.38 millones de muertes (22.5% del total). En nuestro país, el cáncer pulmonar ocupa los primeros lugares en incidencia y mortalidad en relación al cáncer. Anualmente diez mil mexicanos reciben un diagnóstico de esta enfermedad, los cuales en su mayoría son detectados en etapas avanzadas de la enfermedad. La HMGB1 se expresa en todas las células del cuerpo y su función a nivel nuclear es facilitar la unión de factores de transcripción al DNA, participar en la remodelación de nucleosomas y participar en procesos de reparación del DNA⁴⁵. La muerte inmunogénica provocada por la quimioterapia puede inducir la liberación de HMGB1 al medio; posterior a esto, la interacción entre la HMGB1 liberada con el TLR4 presente en células dendríticas es necesaria para el procesamiento y presentación cruzada de antígenos tumorales y para el desarrollo de respuestas tipo células T específicas en contra del tumor. Varias líneas de investigación han reportado que la HMGB1 puede ser un adyuvante durante el tratamiento en contra del cáncer y puede ser un factor pronóstico de la enfermedad, por lo que resulta importante realizar investigaciones que relacionen los niveles séricos de la proteína HMGB1 con parámetros clínicos de pacientes, tales como sobrevida y calidad de vida. Investigar el tipo de relación que exista entre estos parámetros y los niveles séricos de la HMGB1 contribuirá a un mayor conocimiento del cáncer.

Hipótesis

La quimioterapia destruye células tumorales, entonces estas liberarán HMGB1, esta alamina será cuantificada, y las variaciones de HMGB1 durante la quimioterapia se podrán relacionar directamente con la sobrevida de los pacientes con cáncer pulmonar.

Objetivo General

Cuantificar la molécula HMGB1 a nivel sérico en pacientes con cáncer pulmonar, antes, durante y después de la quimioterapia convencional y correlacionar los niveles con la sobrevida de los pacientes

Objetivos Particulares

- i) Determinar la concentración de la HMGB1 en el suero de pacientes con cáncer pulmonar que se encuentran bajo tratamiento con quimioterapia convencional
- ii) Estudiar el efecto de la quimioterapia en los niveles séricos de la HMGB1 de los pacientes a lo largo del régimen quimioterapéutico
- iii) Determinar si existe una asociación entre los niveles séricos de HMGB1 y la sobrevida en pacientes con cáncer pulmonar y si puede ser un biomarcador de respuesta al tratamiento quimioterapéutico

Materiales y Métodos

Material Biológico

Grupo de estudio: Controles Sujetos Sanos

El estudio incluyó un total de 13 sujetos fumadores y 9 sujetos no fumadores designados como grupos controles.

Los criterios de inclusión para los sujetos control fueron, en el caso de sujetos fumadores que fueran: sujetos con nacionalidad mexicana y una edad entre 40 y 60 años, fumadores pesados (IT >2.5); es decir, que consuman una o más de una cajetilla diaria de 20 cigarrillos y que aceptaran proporcionar una única muestra sanguínea.

Los sujetos no fumadores fueron: voluntarios sin ninguna enfermedad de tipo aguda o crónica, de nacionalidad mexicana con una edad entre 40 y 60 años, sin consumo de tabaco y que aceptaran proporcionar una única muestra sanguínea.

Las características de los grupos control se resumen en la tabla II.

Grupo de estudio: Pacientes

El estudio incluyó un total de 42 pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar provenientes del servicio de neumo-oncología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los pacientes se incluyeron cuando eran candidatos a la quimioterapia de 1ª línea. De los 42 pacientes con cáncer pulmonar 31 fueron diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar primario (estadio clínico III y IV) y 11 con mesotelioma (estadio clínico III y IV). El diagnóstico se realizó por el servicio de patología empleando el material de biopsia pulmonar. El estado clínico incluyó examen clínico, radiografía de tórax estándar, tomografía axial computarizada de tórax, abdomen y cerebro, broncoscopia y escaneo de huesos. El estadio de cáncer pulmonar se realizó de acuerdo al sistema de clasificación internacional TNM.

Los criterios de inclusión para el estudio, en el caso de los pacientes fueron: pacientes con nacionalidad mexicana y más de 18 años, que presenten un diagnóstico confirmado de cáncer pulmonar primario, que fueran candidatos a la quimioterapia y que hayan leído, aceptado y

firmado el consentimiento informado para proporcionar una muestra sanguínea antes de la administración del primer ciclo de tratamiento (tiempo cero), una muestra al tercer ciclo y una muestra al sexto ciclo de tratamiento.

Los criterios de exclusión del estudio fueron: pacientes con cáncer pulmonar de origen desconocido, con historial de otro cáncer (No primario de pulmón), con nacionalidad extranjera y que por su estado de salud no les sea posible proporcionar una muestra sanguínea.

Los criterios de eliminación de muestras fueron: pacientes que no terminaron la primera línea de tratamiento. Las características de los pacientes se resumen en la tabla II.

Tabla II. Grupos de estudio.

Grupo Analizado	Diagnóstico	n	Rango de Edad
Controles (Sujetos sanos) (n=22) Sexo: Mujeres (n=11) Hombres (n=11)	Fumadores	13	50-60 años media: 53 años
	No Fumadores	9	
Pacientes (n=42)	Adenocarcinoma	31	34-80 años media: 59 años
	Mesotelioma	11	

Características del grupo:

- a) Estadio: **IIIB-IV**
- b) Karnofsky: **80-90%**
- c) Sexo: **Mujeres** (n=23)/ **Hombres** (n=19)
- d) Tratamiento administrado: **1)CDDP/ Paclitaxel** (n=14)
2)CDDP/ Vinorelbine (n=14)
3)CDDP/ Pemetrexed (n=14)

*CDDP= Cisplatino

De cada sujeto del grupo control incluido en el estudio se recolectó una muestra de sangre periférica (15mL con anticoagulante EDTA). De cada paciente en tratamiento quimioterapéutico, que consiste en seis ciclos (uno cada tres semanas) de cisplatino más otro fármaco quimioterapéutico, se recolectaron muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: antes de la administración del primer ciclo (tiempo cero), del tercer y del sexto ciclo de la quimioterapia.

Las muestras fueron procesadas empleando un gradiente de Ficoll (Lymphoprep™)1:1 con la muestra sanguínea, el gradiente se centrifugó a 1500 r.p.m durante 30 minutos. El plasma se recolectó y centrifugó nuevamente a 1800 r.p.m para eliminar las células que pudiesen haberse arrastrado de la capa de células mononucleares. El plasma se congeló a -30°C para su posterior empleo en la determinación de HMGB1 mediante ELISA.

Ensayo inmuno-enzimático tipo sándwich (ELISA)

Principio del método

Para la determinar la concentración de la HMGB1 se empleó el kit comercial HMGB1 ELISA (HMGB1 Elisa Kit II, Shino-Test Corp., Japan), el cual es un ensayo inmuno-enzimático tipo sándwich. Los pocillos de la microplaca están recubiertos con un anticuerpo anti-HMGB1 purificado. La HMGB1 presente en las muestras se une específicamente al anticuerpo inmovilizado y es reconocido por un segundo anticuerpo marcado con una enzima. Después de la reacción con el sustrato, la concentración de HMGB1 es determinada por la intensidad del color.

Procedimiento del ensayo

Curva estándar

A partir de una solución stock de HMGB1 a la concentración de 320 ng/mL se realizaron diluciones seriadas para obtener un rango de concentraciones de 0 a 10 ng/mL para emplearse como curva estándar. La sensibilidad del ensayo fue de 0.2 ng/mL de HMGB1.

Cuantificación de la proteína HMGB1 en plasma

Procedimiento del ensayo:

1. Se colocaron 50 μL de buffer diluyente en todos los pocillos de la placa recubierta con el anticuerpo policlonal α -HMGB1.
2. A cada pocillo se agregaron 50 μL del control positivo (HMGB1 de cerdo), así como de cada dilución de la curva estándar de HMGB1 y de cada una de las muestras de plasma de pacientes y de los sujetos del grupo control. La determinación se realizó por duplicado. La placa se agitó suavemente por 30 seg y posteriormente se incubó por 21 h a 37°C en cámara húmeda.
3. Se descartó la solución y la placa se lavó cinco veces con 400 μL de buffer de lavado conteniendo 0.5 % de Tween 20. Se removió el exceso de solución colocando la placa en una toalla de papel absorbente.
4. Se colocaron 100 μL del anticuerpo secundario α -HMGB1 acoplado a peroxidasa en cada uno de los pocillos de la placa y se incubó por 2 h a 25°C.
5. Se removió la solución y la placa se lavó como se mencionó anteriormente.
6. Se colocaron 100 μL de la solución de color (3,3',5,5'-tetrametil-bencidina en un buffer con H_2O_2 al 0.005 mol/L) en todos los pocillos de la placa y se incubó por 30 min a temperatura ambiente.
7. La reacción colorida se detuvo añadiendo 100 μL de solución de paro (H_2SO_4 0.35 M) en todos los pocillos de la placa.
8. Se determinó la absorbancia a 450 nm con el equipo Multiskan Ascent y el software Ascent Software y a partir de la curva estándar se extrapolaron las absorbancias obtenidas de los plasmas de los pacientes y sujetos control para obtener las concentraciones de la molécula HMGB1.

Análisis Estadístico

Una vez recogida y analizada, la información se almacenó en una base de datos generada en Bento 3 versión 3.06 (FileMaker, Inc., USA). Para su procesamiento se empleó el paquete estadístico Prism 5.0a (Graphpad Soft Inc., CA, USA). Las variables analizadas fueron:

- a) Concentración sérica de HMGB1 en pacientes y grupos control.
- b) Análisis de sobrevida de los pacientes con cáncer pulmonar.

a) Concentración de HMGB1

La primera fase del análisis fue descriptivo: se usó la media, mediana, promedios y desviación estándar para la determinación de las características cada grupo en el estudio. Una vez obtenidas las características de los grupos casos y controles, se empleó como prueba estadística para analizar la normalidad de los datos de cada grupo, la prueba de D'Agostino-Pearson. Cuando las variables de cada grupo tenían una distribución normal se utilizaron las pruebas estadísticas t de Student, Tukey o ANOVA para analizar los promedios de cada grupo. En los casos en que las variables no tenían una distribución normal, se utilizaron las pruebas estadísticas no paramétricas Mann-Whitney, Dunns o Kruskal-Wallis.

b) Curvas de Sobrevida

Las curvas de sobrevida fueron generadas utilizando el método de Kaplan-Meier y la diferencia significativa fue determinada por la prueba log-rank (Mantel-Cox) usando el software Prism 5.0a. Para el análisis de sobrevida, la concentración sérica de la HMGB1 en los pacientes fue dividida en dos grupos: Grupo A presentó un incremento en la concentración de la HMGB1 al final del tratamiento y Grupo B donde la concentración de la HMGB1 se mantuvo y/o disminuyó al final de la quimioterapia.

ASPECTOS ÉTICOS DEL ESTUDIO

Toda la información obtenida procede de aquellos sujetos que expresamente dieron su consentimiento firmado tras la exposición de los objetivos del estudio.

Toda la información recogida es estrictamente confidencial y de exclusivo manejo por parte del grupo investigador. Los resultados son expresados de manera estratificada o global sin distinción de personas.

Resultados

1. Niveles séricos de HMGB1 en los grupos control

La concentración media de los valores séricos de HMGB1 determinada en los sujetos control fue de: 2.89 ± 0.31 ng/mL para el grupo de fumadores y de 2.16 ± 0.11 ng/mL para el grupo de no fumadores. Con el fin de conocer qué efecto tiene el hábito tabáquico sobre las concentraciones séricas de la HMGB1 se realizó un análisis estadístico comparando ambos grupos. El resultado de este análisis indica que los valores séricos de la HMGB1 del grupo de fumadores son significativamente mayores a los niveles de los no fumadores, tal como se aprecia en la figura 6.

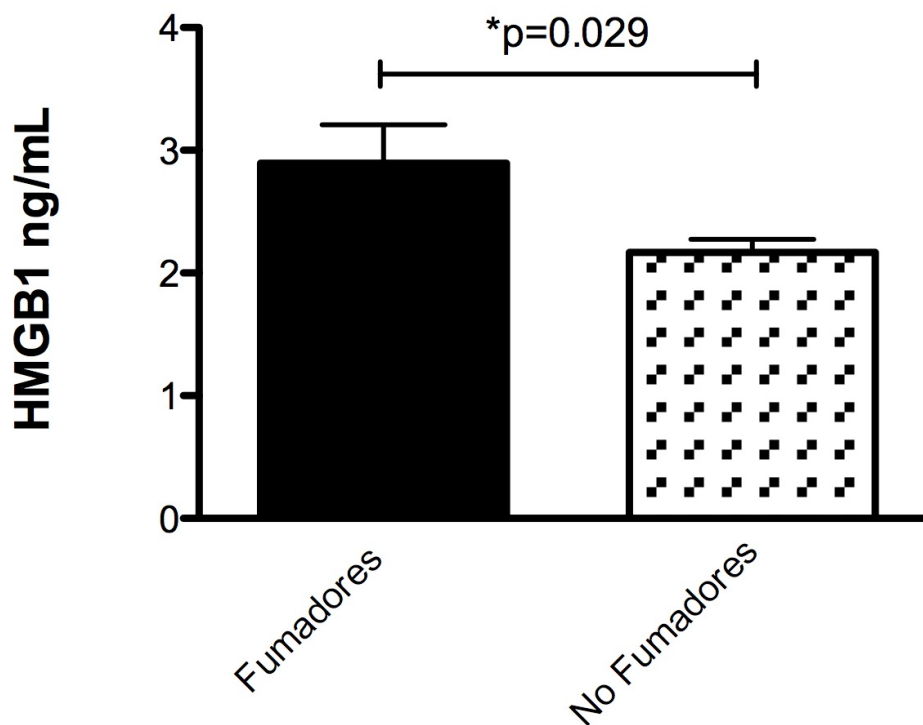


Figura 6. Concentración sérica de HMGB1 en los grupos control: fumadores y no fumadores. Se indica la media \pm desviación estándar.

2. Niveles séricos de HMGB1: grupo control vs pacientes

Con el propósito de conocer los niveles séricos de la HMGB1 en los pacientes con cáncer pulmonar se analizaron sus concentraciones al tiempo cero de tratamiento (T0), es decir, pacientes con diagnóstico confirmado pero sin tratamiento quimioterapéutico. Estos datos se compararon con los sujetos control (grupo de fumadores y grupo de no fumadores).

Para este análisis se realizó la prueba estadística de Kruskal Wallis y la prueba de Dunn. Los resultados obtenidos al comparar a los pacientes con cáncer pulmonar (Figura 7) de acuerdo al tipo histológico con el grupo de fumadores muestran que no existieron diferencias significativas entre los niveles séricos de pacientes en base a los tipos histológicos estudiados al tiempo cero y los sujetos fumadores. Sin embargo, en estos últimos los niveles séricos de HMGB1 tienden a ser mayor en pacientes.

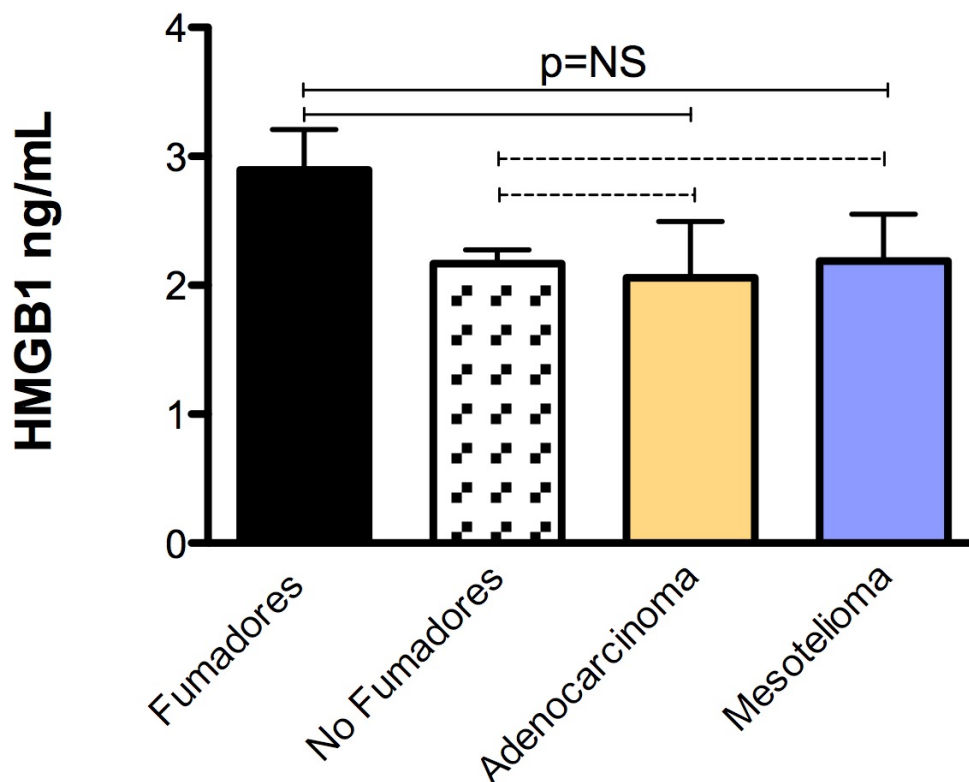


Figura 7. Comparación de los niveles séricos de HMGB1 entre los pacientes en base al diagnóstico al tiempo cero, contra los niveles séricos de los sujetos fumadores y no fumadores. Se indica la media \pm la desviación estándar. NS= valor de p no significativo.

De igual manera se analizó por una prueba estadística de Kruskal Wallis y la prueba de Dunn, que no existen diferencias significativas entre los niveles séricos de los sujetos no fumadores y los niveles séricos de los pacientes previo al tratamiento en base al diagnóstico de adenocarcinoma y al diagnóstico de mesotelioma como se muestra en la figura 7.

3. Niveles séricos de HMGB1 a lo largo del tratamiento de los pacientes con cáncer pulmonar

Para estudiar si en los pacientes con cáncer pulmonar la quimioterapia modifica los niveles séricos de HMGB1, se cuantificó la concentración sérica de HMGB1 al tiempo cero, al 3º ciclo y al sexto ciclo. La media de los valores séricos de la HMGB1 obtenidas al tiempo cero, tercer y sexto ciclo del tratamiento fue de 2.27 ± 0.22 ng/mL, 2.48 ± 0.22 ng/mL y 2.69 ± 0.22 ng/mL, respectivamente (Fig 8).

La prueba de normalidad realizada a los datos demostró que estos no seguían una distribución normal, por lo que para el análisis estadístico se empleó la prueba de Kruskal Wallis, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn. El análisis estadístico de estos datos indicó que no existen diferencias significativas entre las concentraciones séricas de HMGB1 con respecto al ciclo de tratamiento, como se muestra en la figura 8.

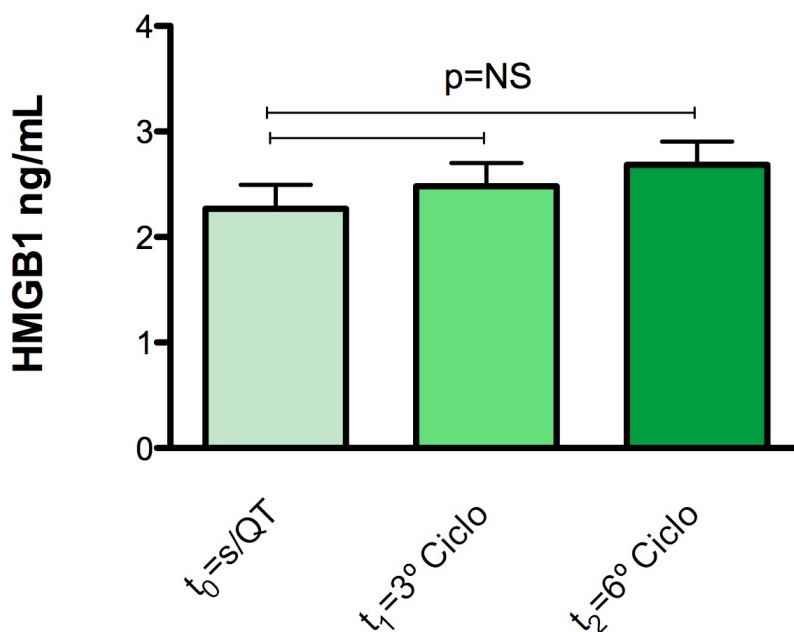


Figura 8. Niveles séricos de HMGB1 en los pacientes a lo largo de la quimioterapia. Las concentraciones de HMGB1 se obtuvieron al tiempo cero (T0), tercer y sexto ciclo del tratamiento. Se indica la media \pm la desviación estándar. NS= valor de p no significativo. s/QT= Tiempo cero, antes de la administración del 1º ciclo de quimioterapia.

No se encontraron diferencias significativas en los niveles séricos de HMGB1 de los pacientes con cáncer con respecto al ciclo de tratamiento.

Por lo que se decidió estratificar los valores séricos de HMGB1 en base al diagnóstico, es decir en los adenocarcinoma pulmonares y los mesoteliomas, como se muestra a continuación:

3.1 Concentración sérica de HMGB1 a lo largo del tratamiento de los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma

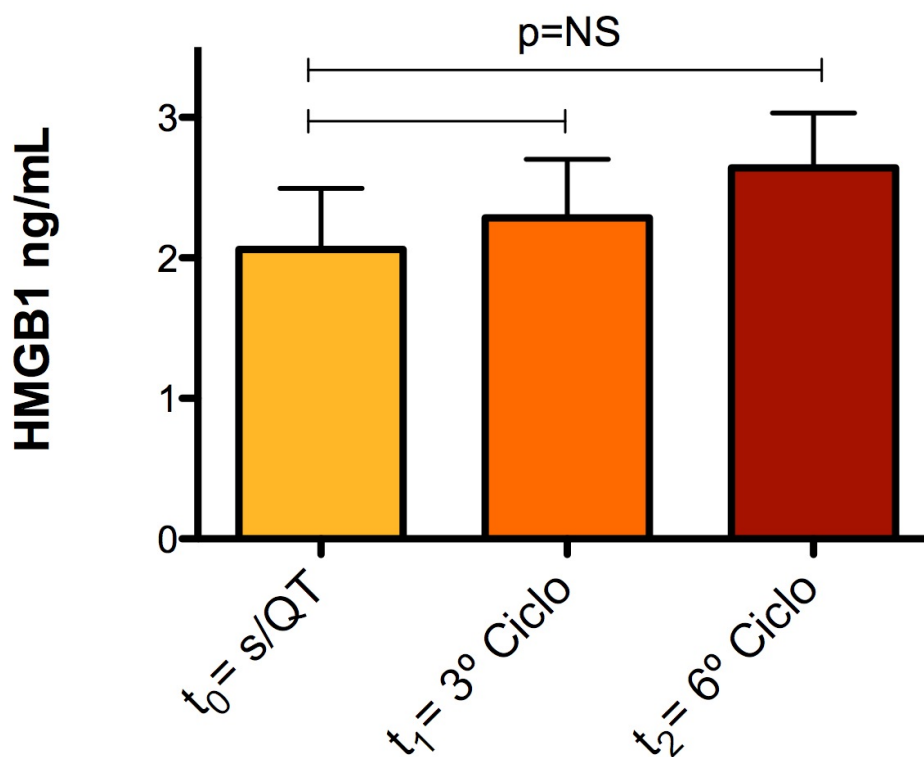


Figura 9. Concentración sérica de HMGB1 a lo largo del tratamiento en pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar. Se indica la media \pm la desviación estándar. NS= Valor de p no significativo. s/QT= Tiempo cero, antes de la administración del 1^{er} ciclo de quimioterapia.

En los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar, la concentración media de la alarmina HMGB1 al tiempo cero (T_0), tercer y sexto ciclo de tratamiento fue de 2.3 ± 0.26 ng/mL, 2.2 ± 0.41 ng/mL y 2.87 ± 0.28 ng/mL, respectivamente. Ver figura 9.

Estos datos siguen una distribución normal, por lo que para analizar las concentraciones de HMGB1 a lo largo de la quimioterapia se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de Tukey.

El análisis estadístico de los niveles séricos de HMGB1 en base al diagnóstico y ciclo de tratamiento reveló que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de HMGB1 entre los ciclos a lo largo del tratamiento.

3.2 Concentración sérica de HMGB1 a lo largo del tratamiento de los pacientes con diagnóstico de mesotelioma

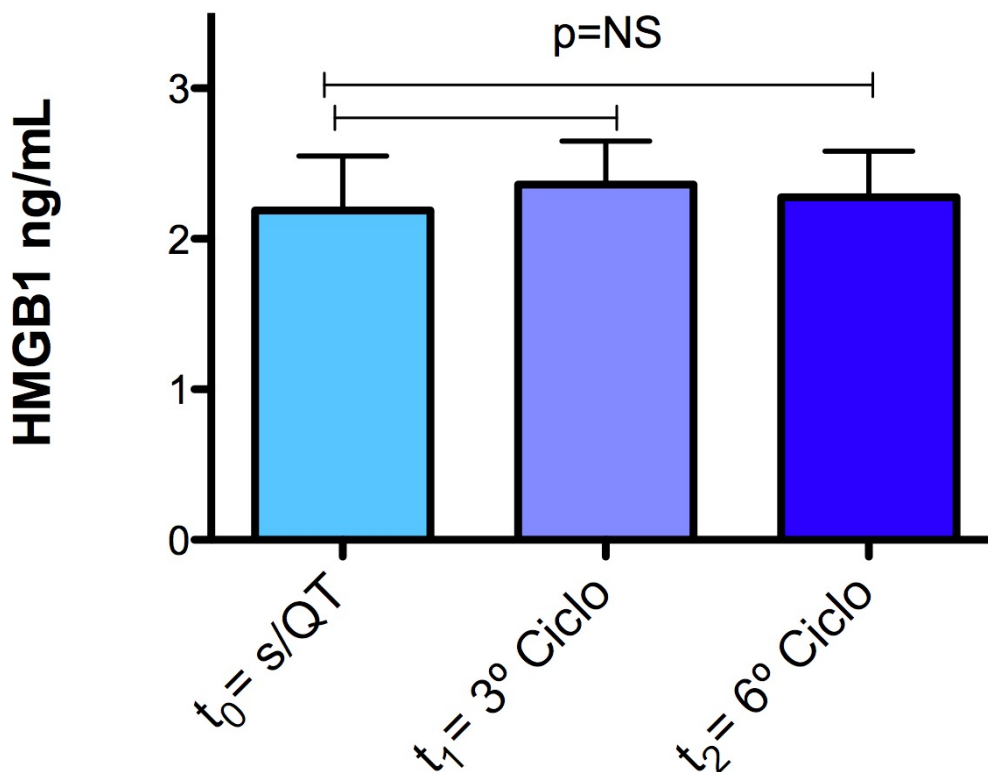


Figura 10. Concentración sérica de HMGB1 a lo largo del tratamiento en pacientes con diagnóstico de mesotelioma. Se indica la media \pm la desviación estándar. NS= valor de p no significativo. s/QT= Tiempo cero, antes de la administración del 1^{er} ciclo de quimioterapia.

En el caso de los pacientes con diagnóstico de mesotelioma, la concentración media de la alarmina HMGB1 al tiempo cero (T0), tercer y sexto ciclo de tratamiento fue de 2.19 ± 0.36 ng/mL, 2.36 ± 0.29 ng/mL y 2.27 ± 0.30 ng/mL, respectivamente. Ver figura 10.

Estos datos no siguen una distribución normal, por lo que para analizar las concentraciones a lo largo de la quimioterapia se procedió a realizar la prueba estadística de Kruskal Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn.

El análisis estadístico de los niveles séricos de HMGB1 en base al diagnóstico y ciclo de tratamiento reveló que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de HMGB1 entre los ciclos a lo largo del tratamiento.

3.3 Concentración sérica de HMGB1 a lo largo del tratamiento en base al tratamiento administrado

Debido a que no se encontraron diferencias entre los niveles séricos de HMGB1 en base al ciclo de tratamiento y diagnóstico de los pacientes, procedimos a estudiar el efecto de la combinación quimioterapéutica como primera línea de tratamiento en los pacientes con cáncer pulmonar. Las combinaciones administradas fueron: cisplatino más paclitaxel, cisplatino más pemetrexed y cisplatino más vinorelbine. Los resultados se muestran en la figura 11.

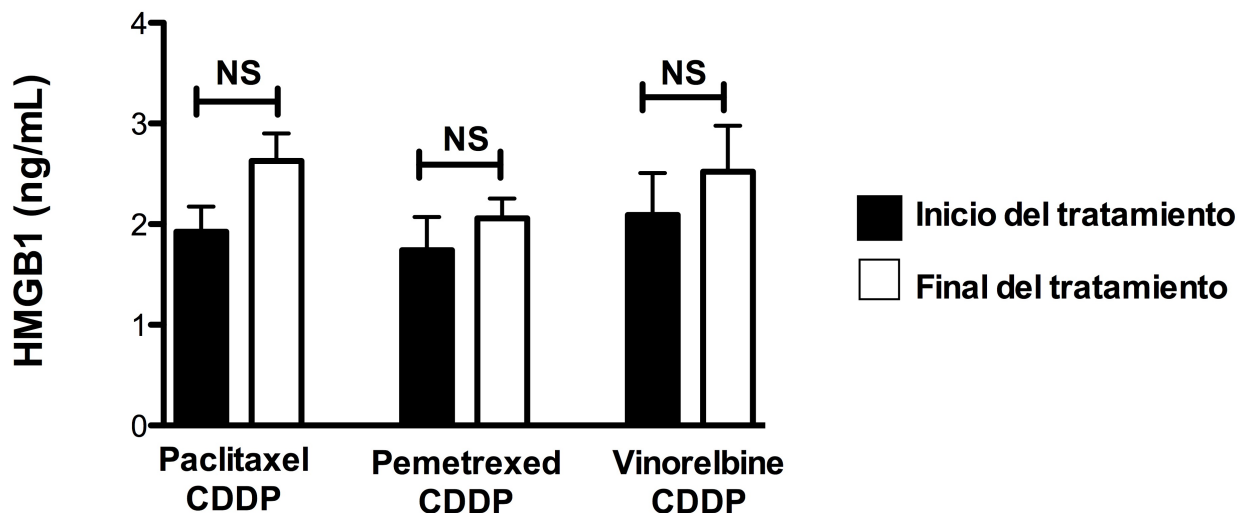


Figura 11. Concentración sérica de HMGB1 al inicio y final de la combinación quimioterapéutica administrada como primera línea de tratamiento. Se indica la media \pm la desviación estándar. NS= valor de p no significativo.

La media de los valores séricos de HMGB1 obtenidas al inicio y final del tratamiento fueron: para la combinación CDDP y paclitaxel 1.94 ± 0.25 ng/mL y 2.63 ± 0.27 ng/mL, respectivamente. Para la combinación con el pemetrexed 1.74 ± 0.32 ng/mL y 2.06 ± 0.19 ng/mL, respectivamente y para el CDDP con vinorelbine 2.09 ± 0.41 ng/mL y 2.52 ± 0.45 ng/mL. No existieron diferencias significativas entre los niveles de mostrados por los pacientes tratados con distintas combinaciones quimioterapéuticas.

4. Incremento y disminución en los niveles séricos de HMGB1 al final de la quimioterapia

Con base al estudio de los niveles séricos de la HMGB1 a lo largo del régimen quimioterapéutico se observó que en algunos pacientes, las concentraciones séricas de la HMGB1 en algunos pacientes exhiben una tendencia a incrementar al final de la quimioterapia, en base a lo anterior la concentración sérica de la HMGB1 fue dividida en dos grupos: el grupo de pacientes que presentó un incremento en la concentración de la HMGB1 al final del tratamiento (Grupo A) y el grupo de pacientes cuya concentración de la HMGB1 se mantuvo y/o disminuyó al final de la quimioterapia (Grupo B). El análisis realizado y las concentraciones se muestran en la tabla III. Mediante el análisis estadístico realizado (el cual consistió en una prueba de t de Student) se encontró que tanto el incremento como la disminución de los niveles séricos de HMGB1 al final del tratamiento presentan una diferencia significativa con respecto al inicio de la quimioterapia ($p < 0.0001$ y 0.0098 , respectivamente).

Tabla III. Análisis del incremento (Grupo A) o disminución (Grupo B) al final del tratamiento en la concentración de HMGB1.

Grupo	n		HMGB1 (ng/mL) \pm Desv est	p
A	25	Inicio	1.72 \pm 0.14	<0.0001
		Final	3.01 \pm 0.22	
B	17	Inicio	2.62 \pm 0.29	0.009
		Final	1.85 \pm 0.18	

4.1 Sobrevida de los pacientes en base al incremento o descenso en la concentración de HMGB1 al final del tratamiento quimioterápico

La sobrevida de los pacientes se asoció a los dos grupos propuestos en el punto 4.0: grupo A presentó un incremento en la concentración de la HMGB1 al final del tratamiento y grupo B la concentración de la HMGB1 se mantuvo y/o disminuyó al final de la quimioterapia. De este análisis se encontró que, un aumento en los niveles séricos de HMGB1 al final de la quimioterapia se relaciona con un mejor tiempo de sobrevida media (22 meses) para los pacientes. Contrario a esto, una disminución de dichos niveles al final del tratamiento se relaciona con menor tiempo de sobrevida media (11 meses) en los pacientes tal y como se ilustra en la figura 12. El aumento en la sobrevida es significativo ($p=0.045$) y el 95 por ciento de intervalo de confianza abarca el 90 por ciento de nuestros resultados.

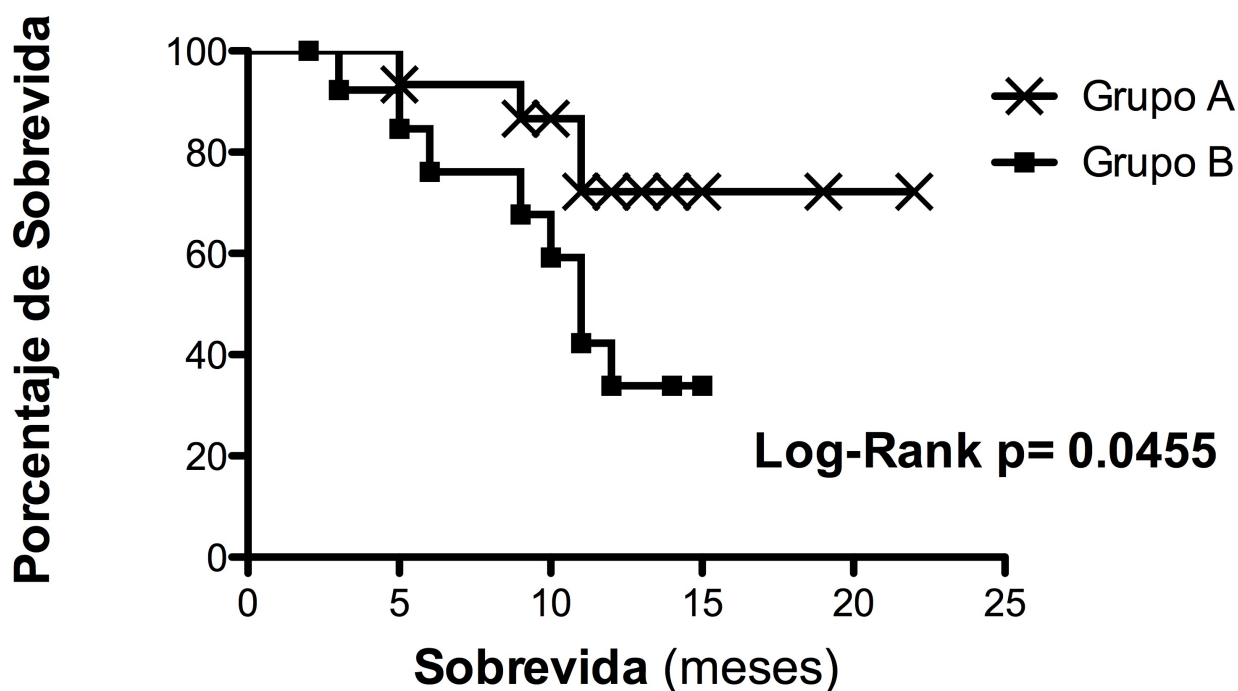


Figura 12. Curva de sobrevida en base a un incremento (Grupo A) o descenso (Grupo B) de los niveles séricos de la alarmina HMGB1 determinada en los pacientes al final de la quimioterapia.

Discusión de resultados

En modelos animales con distintos tipos de cáncer se ha demostrado que el tratamiento con radioterapia o distintos compuestos empleados en la quimioterapia, induce la muerte de las células malignas. Estudios recientes demuestran que durante el proceso de muerte celular, se re-localizan y liberan una serie de moléculas denominadas DAMP's. Uno de los DAMP's más estudiados es la molécula HMGB1, la cual en el presente trabajo, se cuantificó a nivel plasmático en los pacientes con cáncer pulmonar que recibieron quimioterapia paliativa y su concentración se correlacionó con la sobrevida de los pacientes.

El grupo de sujetos fumadores presentó un ligero incremento no significativo de HMGB1 con respecto al grupo de sujetos no fumadores. El grupo de Ferhani y col. ha reportado que en lavados bronquioloalveolares (LBA) de sujetos fumadores, la HMGB1 se encuentra dos veces más elevada con respecto a LBA provenientes de sujetos no fumadores, la inflamación crónica causada por el hábito tabáquico pudiera ser responsable de dicho incremento. En nuestro estudio, la HMGB1 detectada a nivel sistémico pudiera provenir de la producida localmente, que al entrar al torrente sanguíneo disminuye su concentración; lo anterior puede explicar el aumento de HMGB1 no significativo detectado en los sujetos fumadores.

Cuando se compararon los niveles plasmáticos de HMGB1 de los pacientes con cáncer pulmonar previos al tratamiento con los grupos control (sujetos sanos fumadores y no fumadores) no se encontraron diferencias significativas. A pesar de que los pacientes con diagnóstico de cáncer pulmonar tenían una historia de fumadores pesados la concentración plasmática de HMGB1 fue similar a la del grupo no fumador. Lo anterior puede deberse a la actividad pro-tumoral de HMGB1. En este sentido HMGB1, liberada por el tumor o por las células del estroma, puede unirse al receptor RAGE expresado por las células tumorales para favorecer su proliferación y progresión. Lo anterior, llevaría a que se encontrara una disminución de HMGB1 a nivel sistémico comparado con el grupo de sujetos fumadores. Naumnik y col. encuentra concentraciones séricas de HMGB1 muy similares entre los sujetos no fumadores y los pacientes con NSCLC previo al tratamiento; sin embargo, su estudio carece de un grupo de sujetos fumadores⁷⁷.

A nivel sanguíneo se ha determinado la concentración de HMGB1 en cáncer hepatocelular, mesotelioma y de cabeza y cuello encontrando que estas correlacionan positivamente con un mal pronóstico de la enfermedad^{35,75,80}.

Los pacientes con cáncer pulmonar reclutados en este trabajo se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad. En estas etapas, el tratamiento es la quimioterapia a base de cisplatino en combinación con otro fármaco, como el paclitaxel, el vinorelbine o el pemetrexed. Dicha combinación de fármacos se administra por un periodo de seis ciclos (un ciclo cada 3 semanas). Durante este lapso, se cuantificó la HMGB1. Las concentraciones plasmáticas de HMGB1 al inicio del tratamiento (T_0), antes del tercer ciclo (T_1) y antes del sexto ciclo (T_3) no presentaron diferencias significativas. Naumnik y cols. no encuentran cambios en la HMGB1 al comparar su concentración sérica de manera previa y posterior al tratamiento⁷⁷.

En nuestro estudio, el fármaco asociado al cisplatino, no incidió en la concentración de HMGB1, a pesar de detectarse un incremento no significativo al final del tratamiento con cualquier combinación.

Al relacionar la sobrevida total de los pacientes con la concentración plasmática de HMGB1, se observó que los pacientes con mayor sobrevida correlacionaban con incremento plasmático de HMGB1. En contraste, los pacientes con menor sobrevida presentaron una disminución de HMGB1. El cambio en la concentración de HMGB1, en ambos casos, mostró diferencias significativas.

Aunque es necesario realizar otra serie de estudios clínicos de gabinete (tomografía) así como determinaciones inmunológicas, estos resultados sugieren que el tratamiento elimina a una parte de las células tumorales. También sabemos por estudios hechos en nuestro grupo de trabajo⁷⁹, que la molécula HMGB1 se localiza en el citoplasma y núcleo de células tumorales de adenocarcinoma pulmonar antes del tratamiento. Estas células al morir liberan HMGB1 lo que se refleja como un incremento de HMGB1 al final del tratamiento. En consecuencia, la disminución de la masa tumoral incrementa la sobrevida del paciente. De manera contraria, si

el tratamiento no induce la muerte de las células tumorales, no se liberará HMGB1 y por lo tanto la sobrevida del paciente disminuirá.

A pesar de que se requieren un mayor número de estudios, los resultados iniciales nos permiten proponer a la proteína HMGB1 como un marcador asociado a la respuesta al tratamiento.

Conclusiones

Se logró cuantificar los niveles séricos de la proteína HMGB1 en una población de pacientes con cáncer pulmonar antes y a lo largo de la administración de un tratamiento quimioterapéutico para conocer los cambios a nivel sérico de esta proteína a consecuencia de la quimioterapia.

Nuestra población de pacientes con cáncer pulmonar presentó niveles séricos de HMGB1 similares antes y a lo largo de todo el tratamiento quimioterapéutico, sin embargo se observó que en todos los análisis realizados se presenta una tendencia a incrementar en los niveles séricos de HMGB1 a lo largo de la quimioterapia.

Al realizar una estratificación de los niveles séricos de HMGB1 en base a un incremento o un descenso a lo largo del tratamiento quimioterapéutico y correlacionar estos cambios con la supervivencia de los pacientes, se encontró que el incremento en la concentración sérica de HMGB1 a lo largo del tratamiento se correlaciona directamente con un incremento en la supervivencia de los pacientes, mientras el descenso en la concentración sérica de HMGB1 durante el tratamiento se correlacionó con un menor tiempo de supervivencia.

Este trabajo sugiere que la cuantificación de los niveles séricos de la proteína HMGB1 proporciona información acerca de la efectividad del tratamiento.

Perspectivas

Ya que se observa un incremento de HMGB1 es necesario evaluar si éste se asocia con un incremento en la respuesta inmune antitumoral. Lo anterior tiene como base los reportes que indican que HMGB1 activa la respuesta inmune innata, actuando principalmente en las células dendríticas para estimular la respuesta inmune antitumoral adaptativa.

Bibliografía

1. Klug, W. S.; Cummings, M. R.; Spencer, C. A., *Conceptos de genética*. Pearson: **2007**. p 920-940.
2. Pitot, H. C.; Dragan, Y. P., Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB (Fed Am Soc Exp Biol) J* **1991**, 5 (9), 2280-6.
3. Balmain, A.; Harris, C. C., Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis* **2000**, 21 (3), 371-7.
4. Vincent, T. L.; Gatenby, R. A., An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* **2008**, 32 (4), 729-37.
5. Schulz, W. A., *Molecular Biology of Human Cancers: An Advanced Student's Textbook*. Springer: **2007**. p.13-29.
6. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, 144 (5), 646-74.
7. Efferth, T.; Kaina, B., *Chemical Carcinogenesis: Genotoxic and Nongenotoxic Mechanisms* John Wiley & Sons: **2008**. p 151-163.
8. Barrett, J. C., Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ. Health Perspect.* **1993**, 100, 9-20.
9. Weinberg, R. A., Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis* **2008**, 29 (6), 1092-5.
10. Croce, C. M., Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* **2008**, 358 (5), 502-11.

11. Kaye, F. J., Molecular biology of lung cancer. *Lung Cancer* **2001**, 34 (Supplement 2), S35-S41.
12. Breuer, R. H.; Postmus, P. E.; Smit, E. F., Molecular pathology of non-small-cell lung cancer. *Respiration* **2005**, 72 (3), 313-30.
13. OMS Organización Mundial de la Salud
. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html> (accessed 09/05/2012).
14. Ferreiro, C.; Alcamo, I. E., Cancer and the Lungs. En: *Lung Cancer: Deadly diseases and epidemics*. Chelsea House: **2007**. p. 8 - 19.
15. GLOBOCAN, W. H. O. GLOBOCAN **2008** Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008. <http://globocan.iarc.fr/> (accessed 09/05/2012).
16. Alejandro Corvalan and Ignacio I. Wistuba. Molecular Pathology of Lung Cancer. En: Stewart, D. J., *Lung Cancer: Prevention, Management, and Emerging Therapies*. Springer Verlag: **2009**. p. 1 - 26.
17. Dasgupta, P.; Rizwani, W.; Pillai, S.; Kinkade, R.; Kovacs, M.; Rastogi, S.; Banerjee, S.; Carless, M.; Kim, E.; Coppola, D.; Haura, E.; Chellappan, S., Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. *Int. J. Cancer* **2009**, 124 (1), 36-45.
18. Carbone, M.; Kratzke, R. A.; Testa, J. R., The pathogenesis of mesothelioma. *Semin. Oncol.* **2002**, 29 (1), 2-17.
19. H. Johnson, J. Blot, P. Carbone, Gonzalez A., Hallahan D., P. Massion, Putnam J. P., B. Sandler. Cancer of the Lung: Non-Small Cell Lung Cancer and Small Cell Lung Cancer. En: Abeloff, M. D.; Armitage, J. O.; Niederhuber, J. E., *Abeloff's clinical oncology*. Churchill Livingstone/Elsevier: **2008**. p 3024 - 3100.

20. Travis, W. D., Classification of lung cancer. *Semin. Roentgenol.* **2011**, *46* (3), 178-86.
21. Travis, W. D., Pathology of lung cancer. *Clin. Chest Med.* **2002**, *23* (1), 65-81.
22. Di Loreto, C.; Puglisi, F.; Di Lauro, V.; Damante, G.; Beltrami, C. A., TTF-1 protein expression in pleural malignant mesotheliomas and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Lett.* **1998**, *124* (1), 73-8.
23. Travis, W. D.; Rekhtman, N., Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: strategic management of tissue for molecular testing. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *32* (1), 22-31.
24. Stampfli, M. R.; Anderson, G. P., How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9* (5), 377-384.
25. Boutin, C.; Dumortier, P.; Rey, F.; Viallat, J. R.; De Vuyst, P., Black spots concentrate oncogenic asbestos fibers in the parietal pleura. Thoracoscopic and mineralogic study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1996**, *153* (1), 444-9.
26. Choe, N.; Tanaka, S.; Kagan, E., Asbestos fibers and interleukin-1 upregulate the formation of reactive nitrogen species in rat pleural mesothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1998**, *19* (2), 226-36.
27. Tanaka, S.; Choe, N.; Hemenway, D. R.; Zhu, S.; Matalon, S.; Kagan, E., Asbestos inhalation induces reactive nitrogen species and nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat. *J. Clin. Invest.* **1998**, *102* (2), 445-54.
28. NIH National Cancer Institute at the National Institutes of Health. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/healthprofessional> (accessed 09/05/2012).

29. Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M., Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **2010**, *140* (6), 883-99.
30. Dunn, G. P.; Bruce, A. T.; Ikeda, H.; Old, L. J.; Schreiber, R. D., Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3* (11), 991-8.
31. Kono, H.; Rock, K. L., How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8* (4), 279-89.
32. Bianchi, M. E., DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81* (1), 1-5.
33. Rubartelli, A.; Lotze, M. T., Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol.* **2007**, *28* (10), 429-36.
34. Chen, G. Y.; Nunez, G., Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10* (12), 826-37.
35. Sims, G. P.; Rowe, D. C.; Rietdijk, S. T.; Herbst, R.; Coyle, A. J., HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 367-88.
36. Garg, A. D.; Nowis, D.; Golab, J.; Vandenabeele, P.; Krysko, D. V.; Agostinis, P., Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1805* (1), 53-71.
37. Tesniere, A.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Joza, N.; Panaretakis, T.; Kepp, O.; Schlemmer, F.; Zitvogel, L.; Kroemer, G., Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20* (5), 504-11.
38. Zitvogel, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Kroemer, G., Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8* (1), 59-73.

39. Casares, N.; Pequignot, M. O.; Tesniere, A.; Ghiringhelli, F.; Roux, S.; Chaput, N.; Schmitt, E.; Hamai, A.; Hervas-Stubbs, S.; Obeid, M.; Coutant, F.; Metivier, D.; Pichard, E.; Aucouturier, P.; Pierron, G.; Garrido, C.; Zitvogel, L.; Kroemer, G., Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.* **2005**, *202* (12), 1691-701.
40. Spisek, R.; Charalambous, A.; Mazumder, A.; Vesole, D. H.; Jagannath, S.; Dhodapkar, M. V., 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* (11), 4839-45.
41. Obeid, M.; Tesniere, A.; Ghiringhelli, F.; Fimia, G. M.; Apetoh, L.; Perfettini, J.-L.; Castedo, M.; Mignot, G.; Panaretakis, T.; Casares, N.; Metivier, D.; Larochette, N.; van Endert, P.; Ciccocanti, F.; Pientini, M.; Zitvogel, L.; Kroemer, G., Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **2007**, *13* (1), 54-61.
42. Thomas, J., HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29* (4), 395-401.
43. Bustin, M., Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19* (8), 5237-46.
44. Bustin, M., Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26* (3), 152-3.
45. Thomas, J. O.; Travers, A. A., HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26* (3), 167-74.
46. Tang, D.; Kang, R.; Zeh, H. J., 3rd; Lotze, M. T., High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1799* (1-2), 131-40.

47. Knapp, S.; Muller, S.; Digilio, G.; Bonaldi, T.; Bianchi, M. E.; Musco, G., The long acidic tail of high mobility group box 1 (HMGB1) protein forms an extended and flexible structure that interacts with specific residues within and between the HMG boxes. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *43* (38), 11992-7.
48. Lotze, M. T.; Tracey, K. J., High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5* (4), 331-42.
49. Grosschedl, R.; Giese, K.; Pagel, J., HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* **1994**, *10* (3), 94-100.
50. Castiglioni, A.; Canti, V.; Rovere-Querini, P.; Manfredi, A. A., High-mobility group box 1 (HMGB1) as a master regulator of innate immunity. *Cell Tissue Res.* **2011**, *343* (1), 189-99.
51. Sahu, D.; Debnath, P.; Takayama, Y.; Iwahara, J., Redox properties of the A-domain of the HMGB1 protein. *FEBS Lett.* **2008**, *582* (29), 3973-8.
52. Takata, K.; Kitamura, Y.; Kakimura, J.; Shibagaki, K.; Tsuchiya, D.; Taniguchi, T.; Smith, M. A.; Perry, G.; Shimohama, S., Role of high mobility group protein-1 (HMG1) in amyloid-beta homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *301* (3), 699-703.
53. Ulloa, L.; Messmer, D., High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth F R.* **2006**, *17* (3), 189-201.
54. Ellerman, J. E.; Brown, C. K.; de Vera, M.; Zeh, H. J.; Billiar, T.; Rubartelli, A.; Lotze, M. T., Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13* (10), 2836-48.
55. Lotze, M. T.; DeMarco, R. A., Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *4* (12), 1405-1409.

56. Dumitriu, I. E.; Bianchi, M. E.; Bacci, M.; Manfredi, A. A.; Rovere-Querini, P., The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81* (1), 84-91.
57. Yamada, S.; Maruyama, I., HMGB1, a novel inflammatory cytokine. *Clin. Chem. Acta* **2007**, *375* (1-2), 36-42.
58. Bianchi, M. E., HMGB1 loves company. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *86* (3), 573-6.
59. Campana, L.; Bosurgi, L.; Rovere-Querini, P., HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20* (5), 518-23.
60. Bui, J. D.; Schreiber, R. D., Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol.* **2007**, *19* (2), 203-8.
61. Scaffidi, P.; Misteli, T.; Bianchi, M. E., Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **2002**, *418* (6894), 191-5.
62. Haynes, N. M.; van der Most, R. G.; Lake, R. A.; Smyth, M. J., Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20* (5), 545-57.
63. Yang, D.; Chen, Q.; Yang, H.; Tracey, K. J.; Bustin, M.; Oppenheim, J. J., High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81* (1), 59-66.
64. Smyth, M. J.; Godfrey, D. I.; Trapani, J. A., A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* **2001**, *2* (4), 293-9.

65. Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Tesniere, A.; Criollo, A.; Ortiz, C.; Lidereau, R.; Mariette, C.; Chaput, N.; Mira, J. P.; Delaloge, S.; Andre, F.; Tursz, T.; Kroemer, G.; Zitvogel, L., The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol. Rev.* **2007**, *220*, 47-59.
66. Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Tesniere, A.; Obeid, M.; Ortiz, C.; Criollo, A.; Mignot, G.; Maiuri, M. C.; Ullrich, E.; Saulnier, P.; Yang, H.; Amigorena, S.; Ryffel, B.; Barrat, F. J.; Saftig, P.; Levi, F.; Lidereau, R.; Nogues, C.; Mira, J. P.; Chompret, A.; Joulin, V.; Clavel-Chapelon, F.; Bourhis, J.; Andre, F.; Delaloge, S.; Tursz, T.; Kroemer, G.; Zitvogel, L., Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **2007**, *13* (9), 1050-9.
67. Messmer, D.; Yang, H.; Telusma, G.; Knoll, F.; Li, J.; Messmer, B.; Tracey, K. J.; Chiorazzi, N., High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J. Immunol.* **2004**, *173* (1), 307-13.
68. Balkwill, F.; Charles, K. A.; Mantovani, A., Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* **2005**, *7* (3), 211-7.
69. Rovere-Querini, P.; Capobianco, A.; Scaffidi, P.; Valentini, B.; Catalanotti, F.; Giazson, M.; Dumitriu, I. E.; Muller, S.; Iannaccone, M.; Traversari, C.; Bianchi, M. E.; Manfredi, A. A., HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* **2004**, *5* (8), 825-30.
70. Tesniere, A.; Schlemmer, F.; Boige, V.; Kepp, O.; Martins, I.; Ghiringhelli, F.; Aymeric, L.; Michaud, M.; Apetoh, L.; Barault, L.; Mendiboure, J.; Pignon, J. P.; Jooste, V.; van Endert, P.; Ducreux, M.; Zitvogel, L.; Piard, F.; Kroemer, G., Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **2010**, *29* (4), 482-91.

71. Montes Zenteno, G. A. Liberación de la proteína **HMGB1** por efecto del cisplatino en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. , 2013.
72. Bao, G.; Qiao, Q.; Zhao, H.; He, X., Prognostic value of HMGB1 overexpression in resectable gastric adenocarcinomas. *World J. Surg. Oncol.* **2010**, *8*, 52.
73. Chung, H. W.; Lee, S. G.; Kim, H.; Hong, D. J.; Chung, J. B.; Stroncek, D.; Lim, J. B., Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer. *J. Transl. Med.* **2009**, *7*, 38.
74. Sheng, X.; Du, X.; Zhang, X.; Li, D.; Lu, C.; Li, Q.; Ma, Z.; Song, Q.; Wang, C., Clinical value of serum HMGB1 levels in early detection of recurrent squamous cell carcinoma of uterine cervix: comparison with serum SCCA, CYFRA21-1, and CEA levels. *Croat. Med. J.* **2009**, *50* (5), 455-464.
75. Cheng, B. Q.; Jia, C. Q.; Liu, C. T.; Lu, X. F.; Zhong, N.; Zhang, Z. L.; Fan, W.; Li, Y. Q., Serum high mobility group box chromosomal protein 1 is associated with clinicopathologic features in patients with hepatocellular carcinoma. *Digest Liver Dis.* **2008**, *40* (6), 446-52.
76. Shang, G. H.; Jia, C. Q.; Tian, H.; Xiao, W.; Li, Y.; Wang, A. H.; Dong, L.; Lin, D. J., Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer. *Respir. Med.* **2009**, *103* (12), 1949-53.
77. Naumnik, W.; Nilklinska, W.; Ossolinska, M.; Chyczewska, E., Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2009**, *47* (4), 703-9.
78. Shen, X.; Hong, L.; Sun, H.; Shi, M.; Song, Y., The expression of high-mobility group protein box 1 correlates with the progression of non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **2009**, *22* (3), 535-9.

79. Aguilar-Cazares, D., Meneses-Flores, M., Prado-García, H., Islas-Vazquez, L., Rojo-León, V., Romero-García, S., Rivera-Rosales, R. M., et al. Relationship of Dendritic Cell Density, HMGB1 expression, and tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung carcinomas. *Applied Immunohistochemistry* **2013**, 0(0), 1–9.
80. Tabata, C.; Shibata, E.; Tabata, R.; Kanemura, S.; Mikami, K.; Nogi, Y.; Masachika, E.; Nishizaki, T.; Nakano, T., Serum HMGB1 as a prognostic marker for malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer* **2013**, 13 (1), 205.
81. Rojo-León, V.; Aguilar-Cázares, D.; Prado-García, H.; Carlos-Reyes, A.; López-González, J. S., Participation of damage-associated molecular patterns in conventional treatment of cancer. *Rev. Invest. Clin.* **2012**, 64 (3), 284-293.