



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**Papel biológico de la proteína HMGB1
presente en el microambiente tumoral**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

VERÓNICA ROJO LEÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS : Dr. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ

COMITÉ TUTOR: Dr. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Dr. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2012

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de abril de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ROJO LEÓN VERONICA** con número de cuenta 301329239, con la tesis titulada **"PAPEL BIOLÓGICO DE LA PROTEÍNA HMGB1 PRESENTE EN EL AMBIENTE TUMORAL"**, realizada bajo la dirección del:

PRESIDENTE: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
VOCAL: DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ
SECRETARIO: DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN
ESPINOSA DE LOS MONTEROS
SUPLENTE: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
SUPLENTE: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de junio de 2012

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, que me abrió sus puertas para permitir mi desarrollo académico y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 239908 otorgada durante el desarrollo del proyecto. Así como el apoyo financiero SEP-2008-01-102106 otorgado para la realización del proyecto.

Al *Dr. José Sullivan López González*, mi tutor, quien me ha proporcionado las herramientas para mejorar mi desarrollo profesional y por permitirme permanecer en su grupo de trabajo, pese a las adversidades vividas. Gracias por su apoyo brindado hasta el último momento del desarrollo del proyecto y por darme la oportunidad de andar por el camino de la enseñanza.

Al *Dr. Enrique Ortega Soto*, miembro del comité tutorial, que siempre mostró disponibilidad de tiempo. Gracias por sus comentarios, aportaciones y por comprender las adversidades durante el desarrollo del proyecto.

Al *Dr. Constantino III Roberto López Macías*, miembro del comité tutorial. Gracias por sus sugerencias y sus consejos para continuar con el desarrollo del proyecto.

Agradecimientos a título personal

A mi familia...

Benita Rojo, Manuela León, Javier Rojo, Miguel Rojo, Fernanda Ortiz, por su apoyo incondicional.

Mis tías, Guillermina Rojo y Carmen Reséndiz quienes han formado parte importante de mi vida y han sido ejemplo de fuerza y perseverancia.

Mis primos, Aris Rojo, Maribel Rojo y sus pequeños hijos quienes me han enseñado lo divertido de la vida. La sencillez y felicidad que muestran se contagia y yo agradezco que la compartan conmigo.

Al Dr. Sullivan

Por que jamás encontraré la forma de agradecer su apoyo, comprensión y confianza.

A mis compañeros del laboratorio...

Ángeles Carlos, Dolores Aguilar, Fidel Maciel, Guillermo Montes, Heriberto Prado, Lorenzo Islas, Manuel Meneses, Patricia Rosas, Rubén Reyes y Susana Romero, por sus críticas y sugerencias en la realización de esta tesis. En especial a Dolores Aguilar por el apoyo en diversos aspectos para poder concluir este trabajo.

A mis amigos...

Bertha Zárate, David Vargas, Edder Romero, Edith Barbosa, Eréndira Pérez, Ileana Ávila, Jovani Valdovinos, Liliana Sánchez, Lorenzo Islas, Manuel Meneses, Narenthzy Díaz, Norma Sandoval, Rafael Figueroa, Ricardo Díaz, Rodolfo Servín, Sarahi Rodríguez y Víctor García, porque siempre han estado conmigo en los momentos difíciles y en aquellos en que las risas no pararon. A Rubén Reyes y Guillermo Montes, por compartir un poco de su tiempo y ser parte de esta experiencia.

En especial a Nare, Ile, Norma, Lili, Lorenzo y Manuel agradezco su apoyo, su tiempo y las palabras que me ayudaron a salir a delante.

Dedicatorias

A mi mamá Benita Rojo, quien siempre me ha brindado su apoyo en todos los aspectos de mi vida. Sin tú apoyo jamás hubiera podido concluir los estudios que hasta ahora he logrado. Sabes que cada uno de ellos es también uno de tus logros.

A mis hermanos, Javier, Miguel y Fernanda porque siempre me han dado ánimo para seguir adelante y se que siempre contaré con ustedes. Cada donativo que me han brindado lo he aprovechado al máximo.

A mi abuelita Manuela, quien siempre me ha cuidado y protegido a lo largo de toda mi vida. Los valores que me ha inculcado son los que me han formado y han hecho la persona que soy.

*“El amor por la fuerza nada vale, la fuerza sin amor es energía gastada en vano”
Albert Einstein*

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
CÁNCER	5
Cáncer de pulmón	6
PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS AL DAÑO (DAMPs) Y CÁNCER	10
PROTEÍNA DEL GRUPO DE ALTA MOVILIDAD CAJA 1 (HMGB1)	11
Estructura de HMGB1	12
Función biológica de HMGB1	14
Liberación de HMGB1	16
Receptores y señalización de HMGB1	19
ANTECEDENTES	22
HMGB1 EN LA BIOLOGÍA DEL TUMOR	22
Actividad anti-tumoral de HMGB1	22
Actividad pro-tumoral de HMGB1	23
HMGB1 y cáncer pulmonar	25
Localización de HMGB1 y sus modificaciones post-traduccionales (PTMs)	25
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
MATERIAL BIOLÓGICO	32
Cortes histológicos	32
Líneas celulares y cultivo celular	32
INMUNOHISTOQUÍMICA	33
INMUNOFUORESCENCIA	34
TRATAMIENTO DE MACRÓFAGOS DE LA LÍNEA U-937 CON VID3 Y LPS	34
PREPARACIÓN DE MUESTRAS	35
Obtención de lisado total	35
Obtención de fracciones subcelulares	36
INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)	36
ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (E-2D)	37
Tinción con nitrato de plata	38
Análisis de los geles de E-2D	39
ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	39

RESULTADOS	37
Distribución subcelular de HMGB1 en biopsias de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).....	37
Distribución subcelular de HMGB1 en líneas celulares de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).....	40
Detección de formas modificadas de la proteína HMGB1 en células tumorales de carcinoma pulmonar	42
Patrón bidimensional de la proteína HMGB1 en células de carcinoma pulmonar	43
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS	56

ABREVIATURAS

1.3.11	Línea celular adenocarcinoma pulmonar humano derivada de derrame pleural
1.3.15	Línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano
3B1A	Línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano
A-427	Línea celular epitelial de carcinoma pulmonar humano
A-549	Línea celular epitelial de carcinoma pulmonar humano
APC	Célula presentadora de antígeno profesional
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquiolos
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
Caco-2	Línea celular de adenocarcinoma colorectal humano
Calu-1	Línea celular de carcinoma epidermoide pulmonar humano derivada de derrame pleural
CDS-1	Línea celular adenocarcinoma pulmonar humano derivada de derrame pleural
Célula NK	Célula asesina natural
CRM1	Receptor denominado región cromosómica de mantenimiento
CTR	Calreticulina
CXCL12	Ligando 12 de la familia de quimiocinas con motivo CXC
CXCR4	Receptor de quimioquinas CXC tipo 4
DAB	Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
DAPI	4',6-diamidina-2-fenilindol
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácidos desoxirribonucleico
E-2D	Electroforesis en segunda dimensión
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplásmico
K-562	Línea celular de eritroleucemia humana
K-RAS	Homólogo celular del oncogén vk-ras en el virus del sarcoma de Kirsten
HATs	Acetilinasas de histonas
HCT 116	Línea celular de carcinoma colorectal humano
HMGB1	Proteína de alta movilidad caja 1
HSP	Proteína de choque térmico
c-IAP	Proteína de inhibición de apoptosis celular
ICAM	Molécula de adhesión intercelular 1
IEF	Isoelectroenfoque
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
IP	Inmunoprecipitación
c-KIT	Homólogo celular del oncogén retroviral v-kit en el virus de sarcoma felino 4 de Hardy-Zuckerman

KAP-1α	Karioferina-1 α
LPS	Lipopolisacarido
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz/analizador de tiempo de vuelo
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MIA	Actividad inhibitoria del melanoma
MHC I y II	Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I y II
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MVBs	Cuerpos multivesiculares
MYC	Homólogo celular del oncogén v-myc en el virus de mielocitomatosis aviar
NESs	Señales de exporte nuclear
NF-κB	Factor nuclear- κ B
NLSs	Señales de localización nuclear
NLRP	Inflamasoma miembro de los receptores que contienen repeticiones ricas en leucina de unión a nucleótidos
NNK	Nitrosaminocetona derivada de la nicotina
NSCLC	Carcinomas pulmonares de células no pequeñas
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pI	Punto isoeléctrico
c-PKC	Proteína cinasa C dependiente de calcio y diacilglicerol
PTMs	Modificaciones post-traduccionales
RAG1/2	Productos de genes activadores de recombinación 1 y 2
RAGE	Receptor para los productos finales de la glicosilación avanzada
RAW 264.7	Línea celular de macrófagos transformados por el virus de leucemia murina de Abelson
RB	Gen de ritinoblastoma
S100	Proteína de unión a calcio
SCLC	Carcinoma pulmonar de células pequeñas
SDS-PAGE	Dodesil sulfato de sodio-electroforesis en gel de poliacrilamida
SK-LU-1	Línea celular de adenocarcinoma pulmonar humana
SK-MES-1	Línea celular de carcinoma pulmonar de células escamosas humano derivada de derrame pleural
Tc	Linfocito T citotóxico (CD8+)
Th	Linfocito T cooperador (CD4+)
TLR2	Receptor tipo toll 2
TLR4	Receptor tipo toll 4
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TP53	Proteína supresora de tumores p53
TAMs	Macrófagos asociados al tumor
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
ViD3	1,25-dihidroxivitamina D3
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
U-937	Línea celular de linfoma histiocítico humano
WiDr	Línea celular de adenocarcinoma colorectal humano

RESUMEN

La proteína de alta movilidad caja 1 (HMGB1), de unión a DNA, se localiza en el núcleo y está involucrada en el ensamble de diversos factores de transcripción de genes. Además, HMGB1 es liberada por células en necrosis o secretada por macrófagos activados. En macrófagos activados, las modificaciones post-traduccionales (PTMs) de HMGB1 están relacionadas con su translocación al citoplasma y su posterior secreción. Con relación al cáncer, se ha observado la localización citoplasmática de HMGB1 en distintas células tumorales y esta se ha asociado a la sobreexpresión de la proteína. El objetivo del presente trabajo fue determinar en células de carcinoma pulmonar si las modificaciones post-traduccionales en la proteína HMGB1 se asocian con su distribución subcelular. Para ello, se determinó la distribución subcelular de HMGB1 en biopsias de pacientes con carcinomas pulmonares y líneas celulares empleando inmunohistoquímica e inmunofluorescencia indirecta, respectivamente. Para la detección de las PTMs de HMGB1, de las líneas celulares se obtuvo la fracción de proteínas nucleares y citoplasmáticas que se resolvieron mediante electroforesis bidimensional (E-2D). La detección de HMGB1 en estas fracciones se realizó por Western blot. Los resultados obtenidos muestran que la distribución de HMGB1 se observó en el núcleo y citoplasma o exclusivamente citoplasmática en células tumorales pulmonares. El patrón de puntos de HMGB1 nuclear detectado en el blot se identificó con un punto isoeléctrico (pI) en un rango de 6.5-7, mientras que la HMGB1 citoplasmática se observó como un patrón de puntos, con la misma masa molecular pero con distintos valores de pI (6-7) desplazados hacia la región ácida. Se ha descrito que las fosforilaciones heterogéneas de una proteína generalmente aparecen en los geles E-2D como "trenes de puntos", como se observó en los resultados de la línea 1.3.11, lo que sugiere que HMGB1 presenta distintas modificaciones. En conclusión, la distribución subcelular de HMGB1 en las líneas celulares es similar a la observada en los cortes histológicos de carcinoma pulmonar, lo que apoya el empleo de líneas celulares en el estudio de la actividad biológica de HMGB1 en carcinomas pulmonares. La distribución citoplasmática de HMGB1 se asoció con su modificación. En relación al desarrollo del cáncer pulmonar, es necesario estudiar la funcionalidad de HMGB1, con la finalidad de trazar estrategias que impacten en el control del crecimiento y progresión de este tipo de neoplasias.

ABSTRACT

The high mobility group box 1 (HMGB1) protein is located in the nucleus where it binds to DNA, promotes the assembly of several transcription factors, and is involved in gene transcription. In addition, HMGB1 is released by necrotic cells or secreted by macrophages activated. In activated macrophages, the post-translational modifications (PTMs) of HMGB1 are associated to nuclear-cytoplasmic shuttling and subsequent secretion. Respect to cancer, in different types of tumor cells, an association between overexpression of HMGB1 and cytoplasmic distribution has been found. This study was performed to determine in lung carcinoma cells whether post-translational modifications of HMGB1 are associated with its subcellular distribution.

Subcellular distributions of HMGB1 in biopsies of lung carcinomas and lung carcinoma cell lines were detected using immunohistochemistry and immunocytochemistry using fluorescence, respectively. For detection of PTMs of HMGB1, nuclear and cytoplasmic cell fraction from cell lines were obtained. Proteins from these fractions were separated by two-dimensional electrophoresis (2D-E). HMGB1 detection was performed by Western blot.

Our results show nuclear and cytoplasmic or only cytoplasmic distributions of HMGB1 in biopsies and cell lines. Using Western blot, nuclear HMGB1 were observed as some spots with an isoelectric point (pI) in a range of 6.5-7. In contrast, cytoplasmic HMGB1 showed a pattern of points moving to acidic region (pI 6-7) with the same molecular mass. The pattern of points observed as a "trains of points" and detected mainly in the 1.3.11 cell line suggest a heterogeneous phosphorylation of HMGB1. In conclusion, in lung carcinoma cell lines, the subcellular distributions were similar to that observed in biopsies of lung carcinoma, supporting the use of these cell lines to study the biological function of HMGB1 in lung carcinomas. The cytoplasmic distribution of HMGB1 maybe is associated with some type of post-translational modifications. However, it is necessary to determine the type of PTMs. More studies are necessary for analyzing HMGB1 participation in development and progression of lung cancer.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

La comunicación intercelular se realiza por medio de mecanismos complejos que: *i)* permiten a las células reconocer a las de su misma estirpe, *ii)* limitan su expansión hacia sitios colonizados por otras células e *iii)* indican cuándo dividirse o diferenciarse para llevar a cabo funciones especializadas.¹ Estos mecanismos están altamente regulados y se ha demostrado que la pérdida del control se asocia con el desarrollo del cáncer.¹

El cáncer es una enfermedad, compleja y progresiva que resulta de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la transformación de células normales en células malignas.^{2,3} El cáncer se caracteriza por la pérdida de la capacidad de regulación de los procesos de proliferación, diferenciación, adhesión, migración, angiogénesis y apoptosis.⁴ Esta desregulación, que permite a las células cancerosas sobrevivir, proliferar y propagarse, se adquiere a través de distintos mecanismos y en diferentes momentos durante el proceso de transformación neoplásica.⁴

El proceso de transformación neoplásica, llamado carcinogénesis, es gradual y de múltiples pasos, y para su estudio se ha dividido en tres etapas llamadas: iniciación, promoción y progresión.⁵ Las dos primeras etapas son la base de la transformación celular, donde las alteraciones o mutaciones que se producen pueden ser heredadas o provocadas por la acción cancerígena de agentes físicos (exposición a radiación ionizante), químicos (carcinógenos del tabaco, arsénico u otros) o biológicos (virus y bacterias).⁵

En la etapa de iniciación, el agente carcinógeno o sus metabolitos activos (derivados del proceso de biotransformación metabólica) interactúan con el material genético provocando alteraciones epigenéticas (como metilación del DNA o acetilación de histonas), o bien, actúan directa o indirectamente en el DNA cromosómico provocando alteraciones genéticas (deleciones, inserciones, translocaciones de genes) relacionadas

con los procesos de reparación del DNA o en puntos de control del ciclo celular.^{3,4} Lo anterior induce mutaciones en protooncogenes, genes supresores de tumores y en genes que mantienen la integridad genómica (inestabilidad genética).²⁻⁴ Las mutaciones en estos genes provoca que la célula transformada no inicie el proceso de apoptosis, lo que favorece la proliferación celular incontrolada asociada al cáncer. Las alteraciones producidas en esta etapa son irreversibles, persistentes y transmisibles a las células hijas.

La promoción es una etapa reversible que es modulada continuamente por factores del medio externo y es caracterizada por la multiplicación selectiva de las células iniciadas. Durante esta etapa, la presencia continua del mismo u otro agente carcinógeno (agente promotor), promueve que las células iniciadas adquieran nuevas alteraciones genéticas que finalmente darán origen a la transformación neoplásica.⁵

Finalmente, en la etapa de progresión, se pueden generar clonas celulares que acumulan una serie de alteraciones en el genoma que confieren, a ciertos genotipos mutantes, una ventaja selectiva que les permite su extensión y el dominio eventual en un entorno local en el tejido.^{4,5} Estas alteraciones conducen a que en el tumor exista heterogeneidad clonal, expresión alterada de genes, pérdida de las características celulares del tejido de origen, y capacidad invasiva y metastásica.^{4,5}

Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón ha sido uno de los más frecuentes en el mundo durante varias décadas. En el año 2008 se estimó que hubo 1.61 millones de nuevos casos, lo que representó un 12.7 % del total y fue la causa más frecuente de muerte por cáncer con 1,38 millones de muertes (18,2% del total), de los cuales, el 55% de los casos se producen actualmente en los países desarrollados.⁶ Con respecto al género, el cáncer pulmonar es más frecuente (16.5% del total) en hombres, mientras que en mujeres representa el cuarto tipo de cáncer (8.5% de todos los cánceres) y la segunda causa más común de muerte (12.8% del total).⁶

En México, durante el año 2008, el cáncer pulmonar, considerando ambos sexos, ocupó el cuarto lugar en mortalidad e incidencia por tumores malignos.⁶ El estudio realizado por Ruíz y cols.⁷ durante el periodo de 1998-2004 mostró que de 397 400 muertes registradas por tumores malignos, el 11.5 % fue por cáncer pulmonar, lo que representó la primera causa de muerte por tumores malignos.

Factores de riesgo

Los estudios epidemiológicos han identificado diversos factores que de forma aislada, aditiva o sinérgica lesionan el epitelio respiratorio. Dentro de los factores ambientales asociados al desarrollo del cáncer pulmonar se incluye: el tabaquismo (activo o pasivo), la exposición al radón, al humo de leña o carbón, asbestos y metales pesados.^{8,9} Además de los factores ambientales, los factores genéticos también contribuyen a la susceptibilidad al cáncer pulmonar, por lo que existen interacciones genético-ambientales implicadas en la carcinogénesis del cáncer de pulmón.^{9,10}

De los factores antes mencionados, el principal factor de riesgo implicado en el desarrollo del cáncer pulmonar es el humo del tabaco. Esto se debe a que el humo del cigarro contiene alrededor de 60 compuestos considerados carcinogénicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (del inglés, PAHs), N-nitrosaminas y aminas aromáticas.⁸⁻¹⁰ De ellos, los carcinógenos que se han relacionado directamente al cáncer pulmonar son: el benzo[a]pireno y la nitrosamina-4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona también conocida como nitrosaminocetona derivada de la nicotina (NNK).^{8,11} Varios carcinógenos del cigarro pueden reaccionar directamente con el DNA o pueden ser activados metabólicamente (por las enzimas del citocromo P450) y convertirse en metabolitos o intermediarios altamente reactivos que reaccionan con el DNA para forman productos enlazados de manera covalente, llamados aductos.¹¹

Las células poseen sistemas de reparación del DNA para remover aductos. Si la reparación del DNA no ocurre, la célula detiene su progresión a través del ciclo celular hasta que se corrija esta condición. En cambio, si el daño en el DNA no se puede reparar, la célula inicia el proceso de muerte celular llamado apoptosis.¹²

Sin embargo, si estos aductos persisten y escapan a los sistemas de reparación, inducen mutaciones que conducen a errores de codificación (las más frecuentes son la conversión de bases G-C y A-T) en genes como MYC, K-RAS, TP53 y retinoblastoma (RB) que pueden inducir inestabilidad genética, incrementar el número de mutaciones y eventualmente conducir al desarrollo del cáncer.^{10,11,13}

Tipos histológicos del cáncer pulmonar

La mayoría de los cánceres de pulmón son carcinomas, neoplasias malignas que derivan de células epiteliales. La clasificación de los carcinomas pulmonares propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se basa en la morfología histológica de los tumores observada principalmente por microscopía de luz.¹⁴ Los carcinomas pulmonares se han clasificado en dos grupos: carcinomas pulmonares de células pequeñas (del inglés, small cell lung cancer, SCLC) y carcinomas pulmonares de células no pequeñas (del inglés, non-small-cell lung cancer, NSCLC).¹⁴ Esta clasificación es de importancia clínica para el pronóstico de la enfermedad.

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

Adenocarcinoma pulmonar

El adenocarcinoma es la forma más común de carcinoma pulmonar en el mundo y representa el 40% de todos los casos de carcinomas de pulmón. De acuerdo a la clasificación de la OMS, los adenocarcinomas pueden ser clasificados en cinco subtipos: acinar, papilar, bronquioloalveolar (BAC), adenocarcinoma sólido con formación de mucina y adenocarcinoma mixto. Los adenocarcinomas suelen ser muy heterogéneos, presentando dos o más subtipos histológicos en un mismo caso, pero la formación de glándulas y producción de mucina (intra o extracelular) son características que distinguen histológicamente al adenocarcinoma de otros tipos de carcinomas. Su localización es en zonas periféricas del pulmón, sitios centrales o endobronquiales, es decir, en bronquios pequeños y bronquiolos.^{14,15}

Carcinoma de células escamosas

El carcinoma de células escamosas, también llamado carcinoma epidermoide, es el segundo tipo histológico más frecuente del cáncer pulmonar y representa el 30% de todos los casos. Histológicamente se caracteriza por presentar queratinización de células tumorales con formación de perlas de queratina y puentes intercelulares, estas características son observadas cuando el carcinoma es bien diferenciado, pero son difíciles de observar en los tumores pobremente diferenciados. Sin embargo, las células escamosas no están presentes normalmente en el epitelio respiratorio. La mayoría de los casos de carcinoma epidermoide (alrededor del 70%) se presentan como tumores centrales y frecuentemente se localizan en los bronquios principales o en ramas mayores.^{14,15}

Carcinoma pulmonar de células grandes

El carcinoma de células grandes es un carcinoma dediferenciado y es diagnosticado por exclusión debido a que no presenta las características histológicas del carcinoma epidermoide, adenocarcinoma o SCLC. Representa alrededor del 9% de todos los cánceres pulmonares y su morfología es caracterizada por células tumorales grandes con abundante citoplasma, núcleos alargados y nucléolos prominentes. Generalmente los tumores son de localización periférica e invaden la víscera pleural, cavidad torácica o estructuras adyacentes.^{14,15}

Carcinoma pulmonar de células pequeñas

El carcinoma de células pequeñas ocurre con una frecuencia del 15% entre todos los carcinomas de pulmón, son de localización peribronquial y se caracterizan por tener células epiteliales pequeñas con cromatina finamente granular, un tamaño aproximado de 24 μm y en ellas la mitosis ocurre frecuentemente. Por ello, estas células crecen más rápido e invaden extensamente la pared bronquial y el parénquima adyacente. Por su capacidad metastásica temprana, los tumores de las células pequeñas son los de peor pronóstico entre los carcinomas pulmonares.^{14,15}

PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS AL DAÑO (DAMPS) Y CÁNCER

El organismo ha desarrollado una variedad de mecanismos de defensa que en muchos casos son efectivos para prevenir el desarrollo de enfermedades. Dentro de estos mecanismos de defensa se encuentra la respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa.¹⁶

La respuesta inmune innata se considera la primera línea de defensa del organismo, debido a que las células que la integran están preparadas para actuar con rapidez ante una infección y sus principales componentes son: barreras anatómicas (piel y mucosas), barreras mecánicas (células ciliadas del tracto respiratorio) y barreras bioquímicas (lágrimas o saliva que contienen componentes antimicrobianos como la lisozima)^{16,17}, factores solubles como proteínas del complemento y células como granulocitos, macrófagos, células dendríticas (DCs) y células asesinas naturales (NK).^{15,16} Por otro lado, la función de la inmunidad adaptativa es aumentar en magnitud y capacidad la respuesta inmune del organismo y lo realiza a través de los linfocitos B y T. Los linfocitos T, a su vez, se dividen en linfocitos T cooperadores (Th) y T citotóxicos (Tc). Estos dos sistemas son activados durante la infección y funcionan cooperativamente para eliminar a agentes patógenos.^{16,17}

Sin embargo, los microorganismos no son el único inductor de los mecanismos de defensa en el organismo.¹⁸ En 1994, Polly Matzinger¹⁹ postuló que el sistema inmunológico responde a las “señales de peligro” intracelulares que surgen de la muerte celular no fisiológica, el daño o el estrés celular. Con relación al cáncer, esta teoría considera que el crecimiento tumoral provoca la remodelación del estroma, lo que induce estrés celular, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y “señales de peligro” que alertan y reclutan células del sistema inmune.¹⁹⁻²¹

Las “señales de peligro” o patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) comprenden una gran diversidad de moléculas de origen endógeno y exógeno que activan al sistema inmunológico en respuesta a un daño causado por infección y/o lesión.²²

Dentro de las señales exógenas se encuentran los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), mientras que para algunas moléculas de origen endógeno, que provienen del tejido o células dañadas, se ha empleado el término de “alarminas”.^{22,23}

Las alarminas son moléculas (en su mayoría proteínas) que se caracterizan por *i)* ser liberadas rápidamente después de la muerte por necrosis, pero no por apoptosis; *ii)* reclutar células presentadoras de antígeno profesionales (APC) e inducir en ellas la expresión de moléculas de coestimulación para estimular su maduración y promover la respuesta inmunológica adaptativa; *iii)* ser secretadas por células del sistema inmunológico como macrófagos y DCs (sin que ésto implique su muerte) y *iv)* participar en el establecimiento de la homeostasis promoviendo la reparación del tejido destruido por los efectos de la inflamación.

En los últimos años se han estudiado varias moléculas consideradas como DAMPs endógenos y entre estas se encuentran las proteínas de choque térmico (HSP), algunos miembros de la familia de proteínas S100, el ATP, los metabolitos derivados de las purinas como el ácido úrico y la proteína de alta movilidad caja 1 (HMGB1).^{18,22}

Con relación al cáncer, se ha propuesto que algunos DAMPs pueden funcionar como moléculas adyuvantes capaces de iniciar una respuesta inmune anti-tumoral cuando son liberados por células tumorales que mueren en respuesta a un daño, como la muerte celular inducida por tratamientos con quimioterapia y radioterapia.²⁴⁻²⁶ Por otro lado, los DAMPs liberados también pueden inducir una respuesta inflamatoria crónica que puede contribuir a la progresión del tumor.^{18,27}

PROTEÍNA DEL GRUPO DE ALTA MOVILIDAD CAJA 1 (HMGB1)

La proteína HMGB1, también llamada HMG-1 o anfoterina, es un miembro de la superfamilia de proteínas del grupo de alta movilidad (HMG, por sus siglas en inglés), que después de las histonas, son las proteínas cromosómicas más abundantes.^{28,29}

La familia de proteínas HMG se subdividen en tres familias: HMGA, HMGB y HMGN. Aunque todas se unen a la cromatina y comparten ciertas características físicas, las

tres familias son estructuralmente distintas y cada una realiza funciones exclusivas. Cada familia HMG tiene una secuencia motivo funcional característica (la secuencia funcional es el principal sitio de interacción entre la proteína HMG y el DNA) que las hace únicas, y por lo tanto, las distingue de otras proteínas cromosómicas.

Las familia de proteínas HMGA (HMGA1a, HMGA1b y HMGA2) tienen tres dominios AT hooks, los cuales unen a regiones ricas en AT en la forma B del DNA. Las proteínas HMGA, se expresan en las células embrionarias y ejercen una función importante en el desarrollo, ya que participan en procesos biológicos normales, como el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y muerte.²⁹⁻³¹

La familia de proteínas HMGB (HMGB1, HMGB2 y HMGB3) poseen dos cajas (1 y 2) y un extremo C-terminal ácido. Por su estructura, las proteínas HMGB se unen al surco menor de la forma B del DNA sin ninguna especificidad de secuencia. Además, estas proteínas se unen con alta afinidad a la estructura de DNA distorsionado, como las cruces de cuatro vías y DNA modificado por la formación de aductos de cisplatino.²⁹⁻³¹

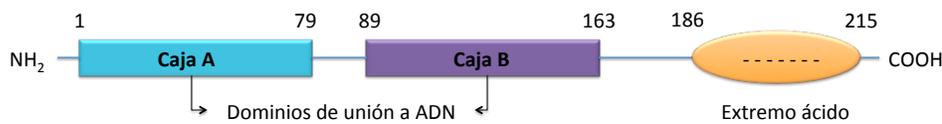
La familia de proteínas HMGN (HMGN1 y HMGN2) se caracterizan por tener un dominio de unión a nucleosoma (llamado NBD) cargado positivamente y una región C-terminal cargada negativamente (llamada CHUD). La unión de las HMGNs a nucleosomas disminuye el nivel de compactación de la fibra de la cromatina, favoreciendo la transcripción y replicación génica. Además, estas proteínas reprimen la remodelación de la cromatina al restringir la movilidad del nucleosoma en el núcleo.²⁹⁻³¹

Estructura de HMGB1

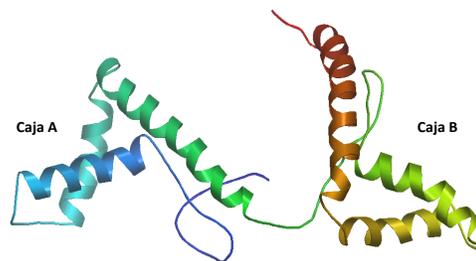
La HMGB1 es una proteína de 25 kDa y 215 aminoácidos. Como miembro de la familia de proteínas HMGB, estructuralmente está organizada en tres dominios: dos dominios (caja A y B) de carga positiva de unión a DNA y un extremo C-terminal formado por residuos de ácido glutámico y aspártico que le confieren una carga negativa. Cada dominio, caja A y B, está formado por estructuras helicoidales compuestas por tres hélices- α que forman una estructura tridimensional en forma de L.^{28,29} (figura 1).

Con relación a su función extracelular, el análisis estructura-función ha mostrado que la actividad de citocina de HMGB1 reside dentro de la caja B, mientras que la caja A actúa como un antagonista específico de la actividad de citocina de la misma HMGB1 secretada por el macrófago.³² Por otro lado, los aminoácidos 150-183 de la región C-terminal son de unión al receptor para los productos finales de la glicosilación avanzada (RAGE), mientras que la cisteína 106 ubicada en la caja B es fundamental para la interacción con el receptor tipo Toll 4 (TLR4).^{23,33} Además, la proteína HMGB1 posee dos señales de localización nuclear (NLSs) que regulan su entrada y salida del núcleo.^{34,35}

A) Organización estructural



B) Estructura



C) Relación estructura-actividad

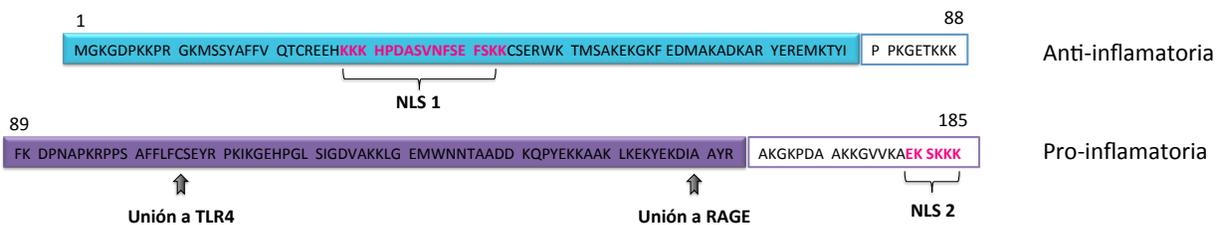


Figura 1: Características estructurales de la proteína del grupo de alta movilidad caja 1 (HMGB1). **A)** Organización estructural de HMGB1: la secuencias de aminoácidos (aa) 1-79 y 89-163 corresponden a los dominios A y B, respectivamente, y 186-215 al extremo C-terminal ácido. **B)** Esquema de la organización tridimensional de los dominios A y B formados por tres hélices alfa. **C)** Secuencia primaria de aminoácidos con actividad anti-inflamatoria (aa 1-88) y actividad pro-inflamatoria (aa 89-185). Los aminoácidos correspondientes a las dos señales de localización nuclear (NLS): NLS1 aa 28-44 y NLS2 aa 179-185. En flechas se indica el dominio de unión al receptor tipo Toll 4 (TLR4) y al receptor para los productos finales de la glicosilación avanzada (RAGE).^{33,36,37}

Función biológica de HMGB1

Originalmente se consideró que la proteína HMGB1 únicamente afecta la función celular mediante la remodelación de la estructura de la cromatina y, por lo tanto, la modulación de la expresión génica. Sin embargo, ahora se conoce que HMGB1 desempeña funciones importantes no sólo en el núcleo, sino también en el medio extracelular, por lo que HMGB1 es considerada una proteína pleiotrópica y multifuncional que está involucrada en diversos procesos biológicos y patológicos.^{22,35,38}

En el núcleo, HMGB1 se une al DNA e induce una curvatura en la doble hélice.²⁸ Esta característica le permite a la proteína HMGB1 unirse y promover la interacción física del DNA con varios factores de transcripción (incluyendo p53 y NF- κ B), algunos receptores de hormonas esteroides, algunas proteínas virales y las proteínas RAG1/2 que realizan la recombinación V(D)J. Su importancia funcional intracelular como regulador de la transcripción se ha demostrado en ratones knockout para HMGB1, ya que éstos mueren poco después del nacimiento.^{30,31,39}

Por otro lado, HMGB1 tiene importantes funciones biológicas fuera de la célula y su actividad implica la estimulación de la respuesta inmune.^{22,38} Esta función de HMGB1 se basa en su liberación al espacio extracelular durante la activación celular y la muerte celular. La secreción activa de HMGB1 la realizan células del sistema inmune como los monocitos y macrófagos tras la estimulación con citocinas pro-inflamatorias; mientras que la liberación pasiva ocurre durante la muerte celular por necrosis de cualquier célula nucleada.^{34,40,41} Ambas formas de liberación se describen más adelante.

En cuanto a su localización extracelular, se ha reportado que HMGB1 induce la maduración fenotípica de células dendríticas (DCs) al regular positivamente moléculas de co-estimulación (CD40, CD54, CD58, CD80, CD83 y CD86), moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y la secreción de citocinas pro-inflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1 α e IL-12, que en conjunto potencian la actividad de los linfocitos T, polarizando a estos últimos hacia un fenotipo Th1.^{38,42}

También, HMGB1 induce la migración de DCs inmaduras. En otras células, como neutrófilos y monocitos, HMGB1 induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6) y quimiocinas (como IL-8, MIP-1 α y MIP-1 β), así como su migración hacia el sitio de inflamación. Además de sus efectos en estas células, HMGB1 tiene otros blancos celulares, como linfocitos T, células endoteliales y epiteliales, entre otras.⁴³ En la tabla 1 se resume la actividad biológica de HMGB1 en diferentes células.

Tabla 1. Actividad biológica de HMGB1 extracelular.^{44,45}

Célula blanco	Respuesta celular
Macrófagos/monocitos	Inducción de secreción de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, síntesis de metaloproteasas, migración transendotelial de monocitos.
Células dendríticas	Maduración y su migración a nódulos linfáticos, incremento en la inmunogenicidad de antígenos, secreción de citocinas.
Neutrófilos	Activación y quimiotaxis.
Linfocitos T	Proliferación de linfocitos T naïve, polarización al fenotipo Th1.
Células endoteliales	Incrementa la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina), factor pro-angiogénico.
Células epiteliales	Incrementa la permeabilidad, causando la disfunción de la barrera en el tracto respiratorio y gastrointestinal.

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1, VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular

HMGB1 e inflamación

HMGB1 se ha identificado como una citocina que puede activar una respuesta inflamatoria causada por infección o daño celular (llamada inflamación estéril), así como en diferentes procesos patológicos como: sepsis, neumonía, inflamación gastrointestinal y endotoxemia.^{44,45}

En pacientes con sepsis, los niveles séricos de HMGB1 aumentan significativamente y son mayores en pacientes con mal pronóstico.⁴⁶ En modelos murinos de sepsis, la liberación tardía de HMGB1, junto con otros mediadores pro-inflamatorios, induce una respuesta inflamatoria letal, la cual es inhibida al administrar anticuerpos bloqueantes de la proteína HMGB1.⁴⁷

Por otro lado, en ausencia de patógenos, en pacientes con traumatismos mecánicos, accidentes cerebrovasculares, infarto agudo al miocardio e insuficiencia respiratoria aguda se ha observado que los niveles de HMGB1 son elevados e inducen una reacción inflamatoria sistémica con manifestaciones clínicas similares al síndrome de sepsis.⁴⁵ En condiciones inflamatorias crónicas, HMGB1 tiene un papel importante en la patogénesis. En modelos experimentales de artritis y en artritis reumatoide humana se ha identificado un incremento en los niveles y el número de células secretoras de HMGB1. Su liberación promueve la secreción de TNF- α , IL 1 β , e IL-6, entre otros factores pro-inflamatorios, por parte de los macrófagos que finalmente promueven una respuesta inflamatoria persistente.⁴⁸

Con relación con la biología del tumor, se ha demostrado que HMGB1 contribuye al crecimiento y progresión de las células tumorales. Sin embargo, también se ha demostrado que es un mediador de la respuesta anti-tumoral después del tratamiento convencional contra el cáncer, por lo que HMGB1 podría tener una función dual.⁴⁹ (ver sección de antecedentes)

Liberación de HMGB1

En 1999, Wang y cols.⁵⁰ mostraron que HMGB1 era liberada de células estimuladas con citocinas y desempeñaba una función importante en la sepsis experimental. Posteriormente, Scaffidi y cols.⁵¹ mostraron que HMGB1 se libera de las células que mueren por necrosis, pero no de las células apoptóticas, ya que en esta condición HMGB1 se une fuertemente a la cromatina. Con base en estas observaciones, se han descrito dos vías de liberación de HMGB1: una liberación de forma pasiva y otra de forma activa.

Liberación pasiva

La liberación pasiva de HMGB1 es iniciada por daño y pérdida de la integridad celular. En esta condición, la translocación de HMGB1 al medio extracelular ocurre rápida y espontáneamente.⁴⁵

La necrosis es una forma de muerte celular caracterizada por la posterior inducción de una respuesta inflamatoria, ya que las células necróticas, a diferencia de las células apoptóticas, pierden la integridad de su membrana celular y subsecuentemente ocurre la liberación del contenido intracelular, incluyendo HMGB1.⁵² Por ello, la liberación de HMGB1 se ha considerado una característica de la muerte celular por necrosis y no de la apoptosis.⁵¹ En co-cultivos de células necróticas con macrófagos, se ha demostrado la importancia de la liberación de HMGB1 como la señal pro-inflamatoria por la célula necrótica, ya que las células muertas que no liberan la HMGB1 (HMGB1^{-/-}) se observa una disminución de la inflamación inducida por necrosis.⁴¹ (figura 2A)

Liberación activa

La secreción activa de HMGB1 es iniciada por una señal de transducción celular a través de la interacción con sus receptores de membrana. La liberación de HMGB1 en esta condición ocurre más lentamente que la liberación pasiva.⁴⁵

La proteína HMGB1 no posee un péptido señal que la dirija hacia el retículo endoplasmático (ER) y, posteriormente, hacia la superficie celular para ser secretada al espacio extracelular.^{34,40} Esta vía de secreción de proteínas se conoce como la vía clásica o vía secretora dependiente de ER/aparato de Golgi.⁵³ En ausencia de este mecanismo de secreción, HMGB1 es secretada empleando una vía alterna a través del transporte de vesículas especializadas del compartimiento endolisosomal.^{34,40} Esta vía de secreción activa de HMGB1 se ha estudiado en monocitos/macrófagos, aunque también se ha reportado que las células dendríticas, células NK y células endoteliales, cuando son expuestas a PAMPs o mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 e IFN- γ , liberan la proteína.⁴⁵

En monocitos/macrófagos no activados, la proteína HMGB1 aparece de forma predominante o exclusivamente nuclear; sin embargo, después de la unión de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF- α), LPS o la misma HMGB1 a sus respectivos receptores presentes en la superficie de monocitos/macrófagos, se activan diversas vías de señalización como las del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y las proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK).³⁴

Las MAPKs fosforiladas, migran al núcleo donde directamente o a través de proteínas adaptadoras activan acetilasas de histonas o inhiben las deacetilasas, lo que promueve la acetilación de HMGB1. La modificación por acetilación de HMGB1, en residuos de lisina ubicados en las dos NLSs, provoca la pérdida de la carga positiva, por lo que HMGB1 no puede ser retenida en el núcleo, y es exportada a través de sus NESs y la exportina CRM1 hacia el citoplasma. Una vez que HMGB1 es citosólica, es capturada por vesículas transportadoras llamadas lisosomas secretores.^{34,40} Estos organelos específicos (abundantes en las células hematopoyéticas y los melanocitos, pero no en otros tipos de células) llevan en su interior la HMGB1 y al fusionarse con la membrana plasmática, secretan su contenido hacia el medio extracelular por exocitosis.^{34,40} De esta manera, la proteína HMGB1 es secretada por los macrófagos para llevar a cabo su efecto biológico. (figura 2B)

A) Liberación pasiva: células en necrosis

B) Liberación activa: células activadas

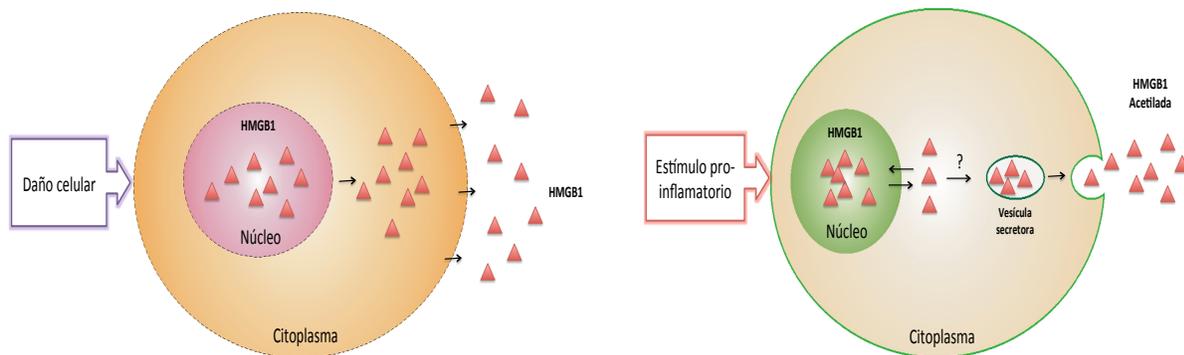


Figura 2. Liberación pasiva y activa de HMGB1. **A)** HMGB1 puede ser liberada pasivamente de células necróticas o dañadas, ya que durante la muerte celular se pierde la integridad de la membrana plasmática y se libera el contenido intracelular lo que conduce a una respuesta inflamatoria. **B)** la liberación activa de HMGB1 implica: **1)** el transporte del núcleo hacia el citoplasma; tras la activación de las vías del NF- κ B y las MAPKs, que a su vez, activan enzimas acetilasas de histonas (HATs) o inhiben a las desacetilasas, favoreciendo la hiperacetilación de HMGB1 en residuos de lisina específicos. **2)** el traslado de HMGB1 en vesículas secretoras (lisosomas secretores) citoplasmáticas; HMGB1 acumulada en el citoplasma es transportada en lisosomas secretores. **3)** Exocitosis de HMGB1: los lisosomas se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido.^{34,40}

Receptores y señalización de HMGB1

Una vez liberada HMGB1 al medio extracelular, la proteína puede unirse a distintos receptores de superficie celular como el receptor para los productos finales de la glicosilación avanzada (RAGE) y dos miembros de los receptores tipo Toll (TLRs): TLR2 y TLR4.^{45,54} La interacción de HMGB1 con estos receptores inicia la transducción de señales intracelulares y media distintas respuestas celulares, incluida la quimiotaxis, estimulación del crecimiento y producción de citocinas pro-inflamatorias.

El primer receptor identificado para HMGB1 fue RAGE, una proteína transmembranal miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas expresado en neuronas, endotelio, fibroblastos, macrófagos/monocitos y DCs inmaduras.⁵⁴ Aunque la señalización inducida por la interacción de HMGB1 con RAGE no ha sido estudiada en detalle, experimentos demuestran que su interacción conduce a la activación de dos vías de señalización: *i*) a través de la familia de pequeñas GTPasas Cdc42/Rac que conduce a cambios en la organización del citoesqueleto (migración), crecimiento, desarrollo y expresión de moléculas de adhesión; y *ii*) a través de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) p38, que conduce a la activación del Factor Nuclear- κ B (NF- κ B).^{54,55}

Por otro lado, los TLRs son proteínas altamente conservadas y son miembros de la familia de receptores conocidos como receptores de reconocimiento a patrones (PRRs) que activan células de la respuesta inmune innata frente a una variedad de estímulos endógenos y exógenos.⁵⁶ A pesar que se ha demostrado que HMGB1 interactúa con el TLR2 y TLR4. Este último se ha propuesto como el principal receptor de HMGB1 extracelular para mediar la liberación de citocinas de macrófagos activados, ya que en macrófagos deficientes de TLR4, se reducen significativamente la liberación del TNF- α después del estímulo con HMGB1, a diferencia de los macrófagos deficientes del TLR2. De este y otros reportes se ha concluido que la interacción de HMGB1 con el TLR4 es requerida para la liberación de citocinas por parte de macrófagos.^{57,58}

La señalización inducida por HMGB1 a través del TLR2 y TLR4 es dependiente de la activación de distintas cinasas y proteínas adaptadoras que participan en la vía de señalización de los TLRs. Después de la interacción de HMGB1 con el receptor, las proteínas adaptadoras citoplasmáticas MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88) y TIRAP (proteína adaptadora que contiene el dominio TIR) se asocian al dominio citoplasmático TIR (receptor Toll/IL-1) presente en los TLRs.^{58,59} MyD88 recluta miembros de la familia IRAK (cinasa asociada al receptor de IL-1) como IRAK-1 e IRAK-4. IRAK-4 fosforila a IRAK-1 y esta última fosforila y activa a la cinasa TRAF6 (factor 6 asociado al receptor TNF), lo que resulta en la formación de un complejo donde participa TAK1 (cinasa 1 activada por TGF- β) y TAB2 (proteína de unión a TAK).^{57,59} En este complejo multiproteico, TAK1 conduce a la activación del complejo I κ B cinasa (IKK) formado por dos subunidades catalíticas, IKK- α e IKK- β , y una subunidad reguladora IKK- γ (conocido como modulador esencial del NF- κ B o NEMO).⁵⁹ La activación del IKK causa la fosforilación del inhibidor del NF- κ B (I κ B) llevándolo a su poliubiquitinación y su degradación mediada por el proteasoma, seguido por la liberación y la translocación del NF- κ B al núcleo donde se inicia la expresión de genes para citocinas pro-inflamatorias^{57,59} (figura 3).

Por otro lado, además del efecto pro-inflamatorio que produce por sí misma la HMGB1 extracelular a través de sus receptores, HMGB1 también puede unirse con avidez a otras moléculas inmunoestimulantes como LPS, DNA o a la interleucina (IL)-1 β y promover, de forma sinérgica, la respuesta inflamatoria.^{54,60} Con respecto a ello, se ha observado que HMGB1 unida al DNA interacciona con otro miembro de la familia de los TLRs, el TLR9.⁵⁴

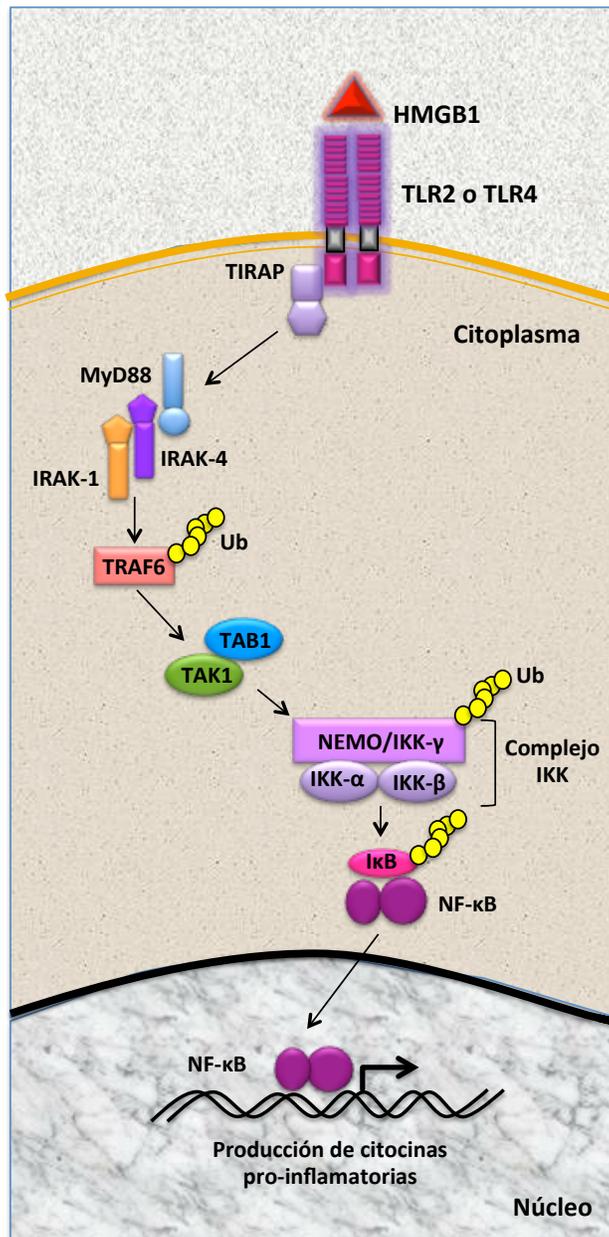


Figura 3. Vía de señalización de HMGB1 a través del TLR-2 y TLR-4. La vía de activación a través del TLR-2 y TLR-4 involucra la proteína adaptadora MyD88 y la activación del complejo IKK, conduciendo a la fosforilación de IκB para la liberación del NF-κB y su posterior traslado al núcleo. En el núcleo, NF-κB favorece la transcripción de genes cuyos productos son moléculas pro-inflamatorias.

ANTECEDENTES

HMGB1 EN LA BIOLOGÍA DEL TUMOR

La proteína HMGB1 es una molécula que tiene doble funcionalidad en relación como la biología del tumor. Las células tumorales que mueren por necrosis liberan la HMGB1 al medio extracelular, y una vez liberada, HMGB1 contribuye al crecimiento, formación y metástasis del tumor.⁶¹ Por otro lado, en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* se ha descrito que, después del tratamiento convencional contra el cáncer, HMGB1 funciona como un mediador de la respuesta inmune antitumoral.⁴⁹

Actividad anti-tumoral de HMGB1

Los estudios de Zitvogel, Kroemer y cols.^{24,62-64} han demostrado que ciertas modalidades de la muerte celular inducida por quimioterapia o radioterapia, que se administran convencionalmente como tratamiento contra el cáncer, pueden ser inmunogénicas. De acuerdo con los autores, el tratamiento con antraciclinas, oxaliplatino y rayos X promueven una respuesta de estrés que induce la exposición en la membrana plasmática y la liberación al medio extracelular de DAMPs endógenos que estimulan la actividad de las células del sistema inmune en contra de las células tumorales dañadas por el tratamiento, es decir, inducen la muerte inmunogénica de las células tumorales.^{18,24,65}

Dentro de los mecanismos moleculares asociados a una muerte celular inmunogénica se encuentra la exposición de calreticulina (CRT) y las proteínas de choque térmico (HSP70 y 90) en la membrana celular; así como la liberación de moléculas como la proteína HMGB1 de las células tumorales.^{24,62,63} La CRT y HMGB1 funcionan como señales de "cómeme" y de "peligro", respectivamente, lo que facilita la fagocitosis, el procesamiento de cuerpos apoptóticos y la presentación de antígenos tumorales por parte de las DCs.^{24,64} También se ha demostrado que durante el proceso de muerte, las células tumorales liberan ATP al medio extracelular, lo que conduce a la activación del inflamasoma NLRP3, que a su vez, conduce a la liberación de IL-1 β que induce la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos Tc específicos del tumor, requeridos para el reconocimiento y eliminación del tumor.^{66,67}

En relación con la liberación de HMGB1, se ha descrito que esta proteína favorece el reclutamiento de DCs,^{38,42} la fagocitosis de células tumorales muertas, y el procesamiento y presentación de antígenos tumorales.^{38,42} Además, HMGB1 conduce a la activación de los linfocitos Th para su posterior diferenciación hacia el fenotipo Th1 y, posteriormente, estimular la capacidad citotóxica de los linfocitos Tc en contra de las células tumorales.^{42,63} Esto se debe a que la señal inducida por HMGB1 a través del TLR4 facilita la presentación cruzada de antígenos tumorales por DCs a los linfocitos Tc, además de crear el microambiente de citocinas necesarias para la activación de células efectoras del sistema inmune que participan en la eliminación del tumor.³⁸ Por lo anterior, HMGB1 se ha propuesto como una molécula que puede activar el sistema inmune en contra de las células tumorales para mejorar los efectos de la terapia convencional.

Actividad pro-tumoral de HMGB1

En relación a la función pro-tumoral de HMGB1, se ha demostrado que la forma intracelular (nuclear) y extracelular de HMGB1 están asociadas con favorecer la supervivencia, angiogénesis, invasión y metástasis tumoral.⁶¹ En diversas neoplasias humanas como el cáncer de mama, colorectal, piel, nasofaríngeo, gastrointestinal, cervix y próstata se ha descrito que la expresión de HMGB1 es elevada comparado con el tejido normal. Esta sobreexpresión de HMGB1 se ha asociado con una mayor cantidad de la proteína que puede ser liberada al microambiente tumoral.⁶¹

Con respecto a la angiogénesis, se ha descrito que la hipoxia y la muerte posterior de las células tumorales son una señal potente para iniciar la neoangiogénesis en tumores sólidos.^{68,69} En este sentido, el crecimiento exponencial de las células tumorales, que supera la capacidad funcional de los vasos sanguíneos preexistentes, provoca la hipoxia de las células y la generación de áreas de necrosis en el tumor.⁶⁸ Lo anterior es acompañado por la liberación del contenido intracelular, incluyendo HMGB1 y se ha reportado que HMGB1, proveniente de las células que mueren por hipoxia, atrae a las células endoteliales hacia el tejido dañado, activa la proliferación celular, la migración, la quimiotaxis y la germinación de células endoteliales.^{51,70,71}

Asociado a lo anterior, los macrófagos infiltrantes del tumor (TAMs) presentes en este microambiente, también son activados por la propia HMGB1 liberada de las células muertas, los cuales secretan factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que, de forma sinérgica con HMGB1, promueve la angiogénesis del tumor.^{72,73}

Por otra parte, la forma intracelular de HMGB1 también se ha asociado con promover la actividad de distintas proteínas que favorecen la progresión de algunos tipos de cáncer.

Tabla 2

Tabla 2. HMGB1 y su asociación con la progresión del cáncer

Tipo de cáncer	Participación de HMGB1	Ref.
Colon	El nivel de expresión de HMGB1 fue superior en el 90 % de los carcinomas comparado con el tejido normal y su sobreexpresión se asoció con la invasión del tumor, metastasis al nódulo linfático y metástasis distante. HMGB1 inhibe la apoptosis de las células tumorales al inducir la expresión de la proteína anti-apoptótica c-IAP2.	74,75
Piel	HMGB1 regula la expresión de la proteína MIA (actividad inhibitoria del melanoma) relacionada con la progresión del melanoma.	76
Nasofaríngeo	La sobreexpresión de HMGB1 se asocia con el mal pronóstico en pacientes con estadios avanzados.	77
Gastrointestinal	La ganancia en función del proto-oncogen KIT (un evento genético común en estos tumores) está relacionada con la sobreexpresión de HMGB1.	78
Mama	La sobreexpresión de HMGB1 promueve el crecimiento del tumor debido a sus propiedades anti-apoptóticas. La variabilidad en la respuesta al tratamiento del cáncer de mama estrógeno positivo podría depender de HMGB1 como un modulador asociado a la respuesta al estrógeno.	79,80
Cérvix	La sobreexpresión de HMGB1 en el 71.2 % de los casos se asocia con metástasis distante y al nódulo linfático. Además, los niveles de HMGB1 en suero fueron superiores en pacientes con cáncer recurrente.	81
Próstata	La expresión de HMGB1 se asocia positivamente con la supervivencia de las células de cáncer de próstata. La co-expresión de HMGB1 y RAGE se incrementa en la mayoría de los casos metastásicos.	82,83

HMGB1 y cáncer pulmonar

El estudio realizado por Liu y cols.⁸⁴ en biopsias de pacientes con NSCLCs mostró que la sobreexpresión de HMGB1 se asocia, en el 66.7% de los casos analizados, con los estadios avanzados III y IV de la enfermedad (de acuerdo al sistema de clasificación TNM: tamaño, nódulo, metástasis). Asimismo, se estudió la expresión de la metaloproteasa 9 (MMP-9) y ésta correlacionó con la sobreexpresión HMGB1, lo que sugirió la asociación de HMGB1 con la invasión del tumor.

En otro estudio realizado por Naumnik y cols.⁸⁵ en pacientes con NSCLCs se encontró que la concentración sérica de HMGB1 es elevada con respecto a sujetos sanos. Además, el incremento en la concentración de HMGB1 se asoció con altos niveles de VEGF en suero, que a su vez se asoció con favorecer la angiogénesis tumoral. De igual manera, Shang y cols.⁸⁶ encontraron altos niveles de HMGB1 en el suero, y en este caso, se correlacionó positivamente con el tamaño del tumor. De acuerdo a los resultados se ha sugerido que HMGB1 sérica puede ser un marcador clínico para la evaluación de la progresión de los NSCLCs.

Localización de HMGB1 y sus modificaciones post-traduccionales (PTMs)

Las PTMs son modificaciones químicas que incrementan la diversidad funcional del proteoma y pueden clasificarse en dos categorías: la primera, mediante la escisión covalente de secuencias peptídicas por acción de proteasas o escisión autocatalítica y la segunda, por adición covalente de grupos (como fosforil, acetil y glicosil) a uno o más aminoácidos. Las modificaciones tienen diferentes propósitos en diversos procesos celulares como la regulación de una enzima, la transducción de señales, la localización de la proteína, la estabilidad y las interacciones con otras proteínas, ácidos nucleicos y lípidos.^{87,88}

La localización subcelular de HMGB1, es decir, su distribución núcleo-citoplasma depende del tipo de célula y su estado de activación.⁹⁰ En distintos tipos de células, se ha descrito que HMGB1 puede atravesar la membrana nuclear en ambas direcciones en forma activa y pasiva; sin embargo, en condiciones normales su localización es principalmente nuclear.⁹⁰ En el caso particular de los macrófagos, cuando reciben un estímulo pro-inflamatorio, HMGB1 puede transportarse del núcleo hacia el citoplasma y posteriormente al medio extracelular a través de un mecanismo altamente controlado.^{34,40} En este sentido, se ha observado que las PTMs como la fosforilación y acetilación regulan su localización subcelular y su secreción.^{34,91}

Como ya se mencionó, después del estímulo con LPS, HMGB1 es hiperacetilada en residuos de lisina ubicados en las dos señales de localización nuclear (NLSs). Las NLSs son secuencias de aminoácidos que se caracterizan por presentar repeticiones ricas en lisina de carga positiva y dirigen el transporte de proteínas desde el citoplasma, pasando selectivamente a través de los poros nucleares, hasta llegar al núcleo.³⁴ En HMGB1 (así como en otras proteínas nucleares), las NLSs son requeridas para su interacción con la Karioferina-1 α (KAP-1 α), una importina que facilita su transporte hacia el núcleo.⁹¹ De acuerdo con Bonaldi³⁴, la pérdida de las cargas positivas debido a la modificación por acetilación en las lisinas ubicadas en las NLSs provoca: *i*) la pérdida de afinidad de HMGB1 con ADN que favorece la unión con la exportina CRM1 y su migración hacia el citoplasma; *ii*) que HMGB1 acetilada no pueda reentrar al núcleo, ya que la modificación impide su unión con la importina, y como consecuencia HMGB1 se acumula en el citoplasma para posteriormente ser secretada por lisosomas secretores.

Por otro lado, además de la modificación por acetilación, se ha reportado que HMGB1 puede ser modificada por fosforilación. El estudio realizado por Youn y cols.,⁹¹ mostró que el estímulo con LPS o TNF- α y ácido okadaico (un inhibidor de fosfatasa de serina/treonina) en macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 y monocitos humanos obtenidos de sangre periférica, inducen la fosforilación de HMGB1 en residuos de serina y treonina (ubicados en las NLSs), el transporte de la proteína al citoplasma y su subsecuente secreción al medio extracelular.^{91,92} Además, empleando un ensayo de cinasa *in vitro*, se demostró que la proteína cinasa C (cPKC) dependiente

de calcio y diacilglicerol se une directamente y fosforila a la proteína HMGB1 en residuos de serina. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual la cPKC fosforila la HMGB1 en el núcleo, ya que la PKC no posee NLSs, en este mismo estudio se observó que la cPKC puede migrar hacia el núcleo y unirse a la proteína HMGB1 después que las células RAW 264.7 son estimuladas con LPS.⁹²

En neutrófilos se ha observado que HMGB1 se localiza en ambos compartimentos subcelulares, núcleo y citoplasma. A diferencia de la proteína que se localiza en el núcleo, HMGB1 citoplasmática se encontró modificada post-traduccionalmente por metilación en la lisina 42. De acuerdo con los autores, esta modificación por metilación afecta la conformación del dominio llamado caja A en HMGB1, lo que provoca su distribución citoplasmática y su liberación al medio extracelular.⁹³

Por lo anterior, se ha concluido que las modificaciones, como la fosforilación y acetilación, participan en la regulación del proceso de secreción de HMGB1, al favorecer el traslado de la proteína del núcleo hacia el citoplasma y prevenir la importación nuclear de HMGB1 de nueva síntesis, lo cual ocurre después de que el macrófago recibe un estímulo pro-inflamatorio. Sin embargo, a diferencia de la fosforilación y acetilación, la metilación de HMGB1 que ocurre en neutrófilos no requiere un estímulo y probablemente sea un evento particular que ocurre en este tipo de células.

De acuerdo a lo anterior y dada la importancia de las PTMs en HMGB1, se han identificado los sitios de acetilación en macrófagos activados (empleando espectrometría de masas MALDI-TOF).³⁴ Con respecto a los sitios de fosforilación, aún se desconocen con precisión los aminoácidos que son modificados, por lo que se ha empleado el servidor NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) para predecir los sitios de fosforilación en la secuencia de aminoácidos de HMGB1 (figura 4).

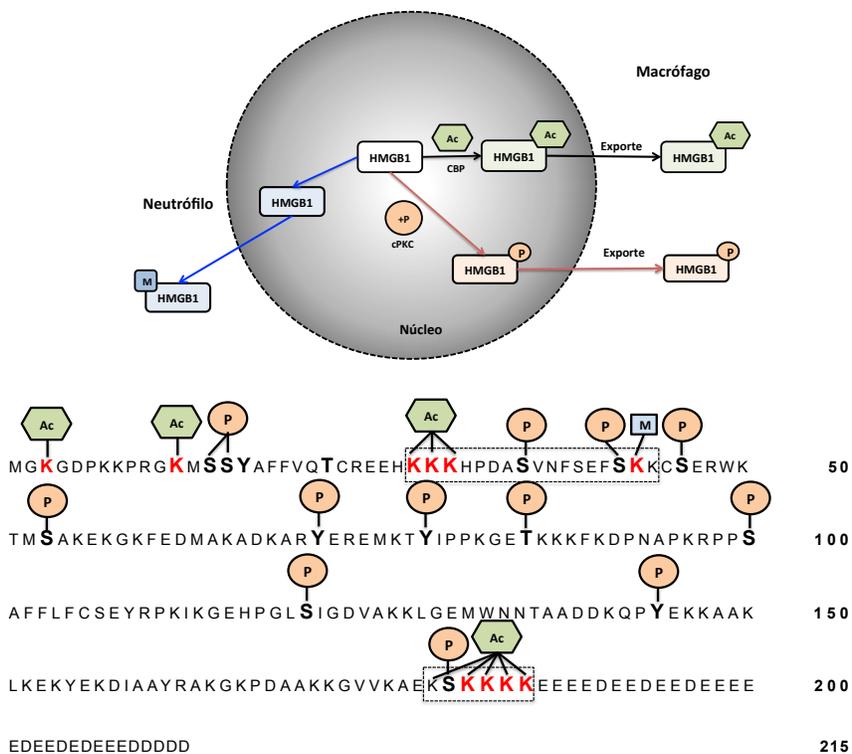


Figura 4. Modificaciones post-traduccionales (PTMs) de HMGB1 y su distribución subcelular. Los residuos modificados de HMGB1 identificados en macrófagos y neutrófilos humanos se marcan en rojo. Los residuos modificados por fosforilación marcados en negritas fueron establecidos empleando el servidor NetPhosK. Las dos NLSs presentes en HMGB1 están marcados en línea punteada. La fosforilación, metilación y acetilación se indican con la letra “P”, “M” y “AC”, respectivamente. CMP: cPKC Modificado de Zhang³⁰

Hasta ahora se ha descrito que las PTMs regulan la secreción activa de HMGB1 en monocitos/macrófagos activados y su localización es predominante en el citoplasma después de un estímulo pro-inflamatorio. Sin embargo, además de los monocitos/macrófagos, otras células como las neuronas pueden secretar la HMGB1 activamente, pero el mecanismo por el cual lo realizan se desconoce.

En relación al estudio de las células tumorales, en cortes histológicos de distintos tipos de cáncer como el de mesotelioma,⁹⁴ colon,⁷⁴ gastrointestinal,⁷⁸ y nasofaríngeo⁷⁷ se ha reportado la distribución subcelular de HMGB1 en las células tumorales y en ellos se ha observado una localización nuclear y/o citoplasmática, a diferencia del tejido normal, donde la localización es preferentemente nuclear.

En las líneas celulares de cáncer de colon humano HCT 116, Caco-2 y WiDr se ha observado que estas células secretan la HMGB1 al medio extracelular.^{95,96} En el caso de las líneas WiDr y Caco-2, las células pueden secretar, espontáneamente, pequeñas cantidades de HMGB1 y la cantidad de proteína secretada aumenta después de que las células se estimulan con una mezcla de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ). En el caso particular de la línea Caco-2, las células presentan un patrón de tinción en el citoplasma (empleando inmunofluorescencia) en forma de puntilleo y en ellas se observó, mediante microscopía electrónica, que HMGB1 se encuentra en el interior de cuerpos multivesiculares (MVBs).⁹⁵ Lo anterior sugirió que, además de los macrófagos, HMGB1 podría ser secretada por células tumorales en un mecanismo que puede implicar el transporte de vesículas especializadas del compartimiento endolisosomal.

Considerando lo anterior, nuestro grupo de trabajo determinó si células tumorales pulmonares secretan la HMGB1. Para ello, se midió la concentración de HMGB1 en los sobrenadantes de diferentes líneas celulares empleando un ensayo inmunoenzimático. Los resultados mostraron que la HMGB1 es liberada activamente de las células tumorales pulmonares, sin que éstas reciban un estímulo pro-inflamatorio previo que induzca su liberación. Sin embargo, se requieren estudios para determinar si las células tumorales pulmonares emplean un mecanismo de secreción de HMGB1 similar al reportado en los macrófagos.

JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer pulmonar es la cuarta causa de muerte debida a tumores malignos, considerando ambos sexos. La tasa de mortalidad estimada en el año 2008 es del 11.3 %.⁶ La patogénesis del cáncer pulmonar es muy compleja y en ella participan diversos factores biológicos liberados por las propias células tumorales, así como por las células del estroma que contribuyen al desarrollo del tumor. Entre estos factores se encuentra HMGB1, una proteína que puede ser liberada al medio extracelular, de forma pasiva o activa.³⁵ Con relación al cáncer, recientemente se ha reportado que la sobreexpresión y la liberación de HMGB1 al microambiente tumoral está asociada con favorecer el fenotipo maligno (supervivencia celular, capacidad angiogénica, migración e invasión de las células tumorales) en una gran variedad de tumores humanos, incluyendo el cáncer pulmonar.⁶¹ De manera contraria, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el tratamiento con quimioterapia o radioterapia provoca la muerte de las células tumorales y la liberación de DAMPs, entre ellas la alarmina HMGB1, que en conjunto favorecen la activación del sistema inmune en contra del tumor.⁶³ Por lo anterior, se ha deducido que HMGB1 tiene un efecto dual en relación al cáncer.

En macrófagos activados con estímulos pro-inflamatorios, la HMGB1 se re-distribuye del núcleo al citoplasma y determina su posterior secreción. Se ha descrito que re-distribución celular es regulada por modificaciones post-traduccionales (PTMs) como acetilación o fosforilación.^{34,91} Asimismo, en varios tipos de cáncer se ha observado una distribución citoplasmática de la HMGB1 y en particular, en células de cáncer de colon esta localización se ha asociado con su secreción, pero se desconoce si su secreción es mediada por algún tipo de PTM.⁹⁵ De modo similar, las células de carcinomas pulmonares secretan al medio extracelular la proteína HMGB1; sin embargo, no existen estudios en células tumorales pulmonares que asocien las posibles PTMs que presenta HMGB1 con su distribución subcelular y posterior secreción, como ocurre en el macrófago. Conocer los mecanismos que regulan la secreción de HMGB1 en carcinomas pulmonares permitiría regular su liberación con la finalidad de bloquear su participación promoviendo el crecimiento del tumor.

HIPÓTESIS

La distribución citoplasmática de la proteína HMGB1 en células tumorales de pulmón se asocia con algún tipo de modificación post-traducciona1 de la proteína.

OBJETIVO

Determinar en células de carcinoma pulmonar si las modificaciones post-traduccionales en la proteína HMGB1 se asocian con su distribución subcelular.

Objetivos particulares:

- Determinar la distribución subcelular de HMGB1 en biopsias de pacientes con carcinoma pulmonar y en líneas celulares.
- Determinar si en las líneas de células tumorales, la proteína HMGB1 citoplasmática presenta modificaciones post-traduccionales

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Cortes histológicos

En el estudio se incluyó tejido pulmonar obtenido de patologías no malignas considerado como tejido normal libre de neoplasia, así como 21 cortes histológicos de tumores tipo adenocarcinoma pulmonar y 10 de carcinoma epidermoide provenientes de biopsias de pacientes con esta patología. La clasificación histológica de los tumores pulmonares se basó en los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Las biopsias obtenidas del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), fueron fijadas en formol y embebidas en parafina.

Líneas celulares y cultivo celular

Se incluyeron un total de 7 líneas celulares tipo adenocarcinoma pulmonar y 2 tipo carcinoma epidermoide. Las líneas celulares A-549, SK-LU-1, A-427, SK-MES-1 y Calu-1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) y las líneas 1.3.15, 1.3.11, CDS-1 y 3B1A se establecieron a partir del derrame pleural de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar sin tratamiento previo. Todas presentaron crecimiento por adherencia. Además, se incluyeron las líneas U-937 de leucemia monocítica humana, como control para la detección de HMGB1 modificada, y la línea K-562 de eritroleucemia humana, como control para la detección de proteínas fosforiladas, dado que expresa constitutivamente diferentes cinasas activas. Ambas líneas se obtuvieron de la ATCC y su crecimiento es en suspensión.

Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino (HyClone, Utah, USA) al 10 % y una mezcla de antibióticos al 1% (estreptomina y bencilpenicilina). Los cultivos celulares se incubaron en un ambiente humidificado a 37°C con 5% de CO₂.

Las células de crecimiento en suspensión se sub-cultivaron cada tercer día; mientras que las células adherentes, después de formar una monocapa, se trataron con una mezcla de Tripsina-Verseno (In Vitro, DF, México) al 0.05% y agitación mecánica para facilitar su desprendimiento. De la suspensión celular obtenida se determinó su viabilidad (mayor al 95%) y se procedió a cultivar en: I) portaobjetos con cámara de 8 pozos (Falcon Becton Dickinson, Bedford, USA), o II) botellas de 80 cm² (Thermo Fisher Scientific, Roskilde Denmark), según su posterior aplicación.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Las secciones histológicas se desparafinaron y rehidrataron. Se bloqueó la peroxidasa endógena incubando los cortes histológicos con H₂O₂ al 3 % (v/v) en metanol a temperatura ambiente (TA) durante 20 min. Se realizó la recuperación de antígeno empleando una solución amortiguadora de citratos (0.01M, pH 6) a ebullición constante durante 20 min. Posteriormente los cortes histológicos se incubaron a TA durante 30 min con solución que contiene amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4, suero de cerdo al 2% (v/v) y Tritón X-100 al 0.5% (v/v) para bloquear las uniones inespecíficas. Las secciones se incubaron a 4°C toda la noche en cámara húmeda con el anticuerpo policlonal de conejo anti-HMGB1 humana que reconoce la región C-terminal (Abcam, Cambridge, UK), la dilución empleada fue 1:300 que se estableció previamente como óptima. Después de lavar con PBS, las laminillas se incubaron con el anticuerpo anti-conejo marcado con biotina (Dako Glostrup, Denmark) a 32°C por 1h; la dilución empleada fue 1:100 establecida previamente como óptima. Después de lavar, los cortes histológicos se incubaron a 32°C en cámara húmeda con el Complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (ABCComplex/HRP) (Dako Glostrup) a la dilución 1:150 durante 30 min. La marca se reveló con H₂O₂ como sustrato y como cromógeno se empleó tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 1.5 min. Posteriormente, las secciones histológicas se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y se montaron con una resina sintética (Merck Darmstadt, German).

Las secciones histológicas se observaron en un microscopio óptico marca Leica modelo CME obtenido de Leica Geosystems (St. Gallen, Switzerland). Las imágenes se obtuvieron con el software LAS V 3.6 de Leica Microsystems.

INMUNOFLUORESCENCIA

Después de permitir que las células crecieran hasta formar la monocapa, en portaobjetos, las células se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 estéril y se fijaron con etanol absoluto. Las células se permeabilizaron con una solución de PBS pH 7.4 y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% (w/v) a TA durante 5 min. Al término de la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4 y se incubaron con la solución bloqueadora (PBS pH 7.4 y suero de la misma especie del anticuerpo primario al 2% (v/v)) a TA durante 30 min. Después, se adicionó el anticuerpo policlonal anti-HMGB1 (Abcam, Cambridge, UK) a una dilución 1:100, establecida previamente como óptima, y se incubó a 4°C en cámara húmeda toda la noche. En cada ensayo se empleó un control negativo que consistió en omitir el anticuerpo primario. Después de lavar, las células se incubaron con el anticuerpo anti-conejo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, CA, USA) a 32°C por 1.5 h; la dilución empleada fue 1:250 establecida previamente como óptima. Las células se lavaron y los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidina-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) a una dilución de 1:150 a TA durante 15 min. Finalmente, las células se lavaron y los portaobjetos se montaron con Vectashield (Vector Laboratories, CA, USA) para ser observadas en un microscopio de epifluorescencia marca Leica modelo CME Leica Microsystems (Wetzlar, Germany). Las imágenes se analizaron con el software LAS V 3.6 de Leica Microsystems.

TRATAMIENTO DE MACRÓFAGOS DE LA LÍNEA U-937 CON VID3 Y LPS

Como control positivo de la determinación de las modificaciones, se empleó la línea celular de monocitos U-937, en la cual se ha reportado que el estímulo con 1,25-dihidroxitamina D3 (ViD3) y posteriormente con LPS, provoca la distribución citoplasmática y posterior liberación de HMGB1 en su forma acetilada. Por ello, se realizó un ensayo siguiendo las condiciones referidas por Bonaldi y cols.³⁴

Las células U-937 se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado y se trataron con 0.1 μ M de ViD3 (Roche, Basel, Suiza) durante 3 días, reemplazando el medio cada 24 h. Después, las células se lavaron y resuspendieron en medio fresco conteniendo 100 ng/mL de LPS (Sigma, St. Louis MO, USA). Los cultivos se mantuvieron con el estímulo por un periodo de 4, 6 y 18 h para determinar, en nuestras condiciones experimentales, la re-localización en el citoplasma de HMGB1. Como controles de este experimento, se incluyeron 3 condiciones más: células tratadas únicamente con ViD3 o LPS y células en medio de cultivo. Al término del cultivo, las células se recuperaron, se lavaron con PBS estéril y se fijaron con etanol absoluto para realizar una inmunofluorescencia indirecta como se indicó anteriormente. Asimismo, de las células sin tratamiento se obtuvieron las proteínas totales a partir de su lisado; mientras que a partir de las células tratadas con ViD3 y posterior estímulo con LPS por 18 h, además del lisado total, se obtuvo la fracción de proteínas citoplasmáticas como se indica más adelante.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El análisis de las PTMs de HMGB1 por Western blot se realizó en las líneas celulares A-549 y 1.3.11. De cada línea celular se obtuvieron las proteínas totales, así como las fracciones de nucleares y citoplasmáticas. Como control para la detección de proteínas fosforiladas se utilizó el lisado total de la línea K-562.

Obtención de lisado total

Las células se cultivaron en las condiciones antes mencionadas. Las células se lavaron 2 veces con PBS pH 7.4 a 4°C. Por cada 10^7 células se adicionó 1 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl pH 7.5, NaCl 137 mM, glicerol al 10% (v/v), Triton X-100 al 1% (v/v) y EDTA 2mM) adicionado de una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche, Basel, Suiza) y fosfatasa (NaF 10 mM y Na_3VO_4 1mM). La suspensión celular se incubó a 4°C durante 30 min y posterior al tiempo de incubación, el lisado celular se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. El sobrenadante obtenido se almacenó a -70°C hasta su uso.

Obtención de fracciones subcelulares

La fracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares se obtuvo empleando el kit de extracción de proteínas de Fermentas (Ontario, Canadá). Brevemente, a partir de las células de crecimiento adherente o en suspensión se obtuvo una suspensión celular, la cual se centrifugó a 1500 rpm a 4°C durante 10 min. El botón obtenido se lavó 2 veces con PBS a 4°C y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron e incubaron por 10 min en la solución de lisis conteniendo los inhibidores antes mencionados. La suspensión se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 14 500 rpm a 4°C durante 30 min para eliminar restos celulares. El sobrenadante, que corresponde a la fracción citoplasmática, se almacenó en congelación a -70°C hasta su uso.

El botón obtenido después de la incubación con la solución de lisis, que corresponde a la fracción nuclear, se lavó cuatro veces y se resuspendió en amortiguador de almacenamiento para su congelación a -70°C hasta su uso.

Del lisado total o las fracciones subcelulares se determinó la cantidad de proteínas totales empleando el método de microBCA (Pierce, Rockford, IL, USA) y siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

INMUNOPRECIPITACIÓN (IP)

Para el estudio de las PTMs de la proteína HMGB1 se inmunoprecipitó la proteína a partir del lisado total o de las fracciones subcelulares obtenidas de las líneas celulares de carcinoma pulmonar. Para ello, la IP se estandarizó a partir del lisado total proveniente de la línea A-549 como se indica a continuación.

Para eliminar el pegado inespecífico, a cada 250 µg de proteína total se adicionaron 25 µL de proteína A-sefarosa al 50% (v/v) (GE Healthcare, UK) y se incubó a 4°C durante 1 h. La suspensión anterior se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 min, se recuperó el sobrenadante y se incubó con 1, 2, 5 o 10 µg de anticuerpo policlonal que reconoce la región N-terminal de la proteína HMGB1 (Sigma, St. Louis MO, USA) a 4°C durante 4 h en agitación constante. Lo anterior se realizó para determinar la concentración óptima del anticuerpo para la IP de HMGB1. Como control negativo de esta determinación se empleó un anticuerpo del subtipo IgG hecho en conejo (Sigma, St. Louis MO, USA) que no reconoce la proteína HMGB1. Posteriormente, a cada muestra se adicionaron 60 µL de proteína A-sefarosa al 50% (v/v) y se incubó a 4°C durante toda la noche en agitación constante. La suspensión anterior se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 min y los inmunocomplejos (fracción IP) se lavaron 3 veces con amortiguador de lisis. Después de lavar, a los inmunocomplejos se adicionó amortiguador de carga Laemmli 2x, se llevó a ebullición durante 5 min y después de centrifugar, el sobrenadante se empleó para el análisis por SDS-PAGE y Western blot.

Los ensayos de IP posteriores se realizaron empleando 5 µg del anticuerpo anti-HMGB1 obtenido de Sigma, que se estableció como la concentración óptima y siguiendo las condiciones indicadas anteriormente.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (E-2D)

Para eliminar sales, detergentes y ácidos nucleicos, a partir de 100 µg de proteína proveniente del lisado o fracciones celulares, se realizó la precipitación de proteínas siguiendo las indicaciones sugeridas por el fabricante del kit 2D Clean-Up, (Amersham, Piscataway, USA). Posteriormente, las proteínas se solubilizaron en amortiguador de rehidratación para E-2D (urea 8 M, CHAPS 0.8 %, DTT 20 mM, trazas de azul de bromofenol y 0.8 % de anfolitos de carga (amortiguador IPG) en un rango de pH de 3-10 no lineal (NL), (GE Healthcare, UK).

Para la separación de las proteínas de acuerdo a su carga eléctrica se emplearon 100 µg de proteína proveniente del lisado total o 50 µg de proteína de las fracciones celulares. Las fracciones proteicas se colocaron en una copa de carga sobre tiras de 7 cm con un rango de pH inmovilizado de 3-10 NL (GE Healthcare, UK). Las tiras previamente se rehidrataron con 125 µL de amortiguador de rehidratación para E-2D durante 18 h. El IEF se realizó en el sistema Ettan IPGphor III (GE Healthcare, UK) siguiendo el protocolo estándar indicado para la longitud y rango de pH de las tiras.

Para separar las proteínas de acuerdo a su masa molecular, las tiras se incubaron durante 15 min con el amortiguador de equilibrio (Tris-HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, 30 % de glicerol y 2% SDS) conteniendo 70 mM de DTT y después se incubaron durante 15 min con el mismo amortiguador de equilibrio conteniendo 140 mM de Iodoacetamida. Posteriormente, las tiras se colocaron en un gel de acrilamida/bis-acrilamida al 12% para la separación en la segunda dimensión. La electroforesis se realizó a 100 V durante 2 h aproximadamente. Al termino, los geles se tiñeron con nitrato de plata para observar las proteínas totales o se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, USA) para continuar con el análisis por Western blot.

Tinción con nitrato de plata

Los geles se trataron con solución fijadora (etanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v)) en agitación suave durante 30 min. Después, los geles se mantuvieron en agitación durante 30 min con la solución sensibilizadora que contiene: etanol al 30 % (v/v), acetato de sodio anhidro al 6.8 % (w/v), tiosulfato de sodio pentahidratado al 2 % (w/v) y glutaraldehído al 0.125 % (v/v). Se realizaron tres lavados con agua desionizada de 5 min cada uno. Los geles se incubaron en agitación con la solución de nitrato de plata al 0.25% (w/v) y formaldehído al 0.05% (v/v) durante 30 min.

Después de lavar con agua desionizada, para el revelado se empleó la solución que contiene: carbonato de sodio al 2.5 % (w/v) y 0.0074% (v/v) de formadehído. La reacción se detuvo con una solución de EDTA al 1.5 % (w/v) hasta observar los puntos correspondientes a las proteínas (<10 min). Finalmente se realizaron 2 lavados con agua desionizada de 5 min cada uno. Las imágenes de cada gel se adquirieron utilizando un densitómetro ChemiDoc XRS (Bio-Rad, USA).

Análisis de los geles de E-2D

Las imágenes de los geles teñidos con plata se analizaron con el programa PDQuest 2-D versión 8.0 (Bio-Rad, USA). Asimismo, a partir de la imagen adquirida de cada blot, se obtuvo la representación gaussiana de cada uno de los puntos que aparecen en la región correspondiente a la masa molecular esperada para HMGB1, lo que permitió obtener una representación tridimensional de los puntos y observar la intensidad de la señal.

ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

El análisis por Western blot de las proteínas se realizó a partir de geles de SDS-PAGE en una dimensión, o bien, a partir de geles de E-2D.

Para el análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE de una dimensión, en cada carril se cargaron 30 µg de proteínas totales provenientes del lisado, fracciones celulares o los inmunocomplejos completos obtenidos después de la inmunoprecipitación. Las proteínas previamente se desnaturalizaron a 94°C durante 5 min en amortiguador de carga Laemmli 2x. La separación de las proteínas se realizó en un gel de acrilamida/bis acrilamida al 12% aplicando una corriente eléctrica de 100 volts durante 2 h aproximadamente. Posteriormente, los geles de SDS-PAGE y los de E-2D se transfirieron a una membrana de PVDF empleando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA) aplicando una corriente eléctrica de 25 volts durante 10 min. La membrana de PVDF se trató con albúmina sérica bovina (BSA) al 3 % (Sigma, St. Louis MO, USA) para bloquear el pegado inespecífico incubándola a TA por 1 h.

Después de lavar, la membrana se incubó con el anticuerpo primario. Para la detección de HMGB1 se empleó el anticuerpo monoclonal o policlonal que reconoce la proteína HMGB1 humana (Abcam, Cambridge, UK). Los anticuerpos anti-Lámina B1 (Invitrogen, CA, EUA) y anti- β -Actina (Sigma, St. Louis MO, USA) se emplearon para identificar proteínas nucleares y citoplasmáticas, respectivamente. Asimismo, se emplearon los anticuerpos anti-fosfoserina (-pS), anti-fosfotreonina (-pT) y anti-fosfotirosina (-pY) (Invitrogen, California, EUA) para la detección de proteínas fosforiladas en dichos residuos. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C durante toda la noche y las diluciones empleadas, establecidas previamente como óptimas se indican en la Tabla 3. Después de lavar, se incubó a TA durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-especie específico marcado con biotina (Dako, Glostrup). La dilución establecida como óptima para los anticuerpos secundarios fue 1:1000.

Al finalizar se lavó y se incubó con el ABCComplej/HRP (Vector Laboratories, California, USA) a dilución de 1:2000 a TA por 30 min. Después de lavar, la reacción se reveló por quimioluminiscencia empleando el kit ECL Advance (Amersham Biosciences, NJ, USA) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y la detección de las bandas o puntos se registró mediante un densitómetro ChemiDoc XRS (Bio-Rad, California, USA).

Tabla 3. Diluciones estandarizadas de los anticuerpos primarios empleados en Western blot

Anticuerpo policlonal	Dilución	
Anti-HMGB1 (C-terminal)	1:1200	
Anti-pS	1:250	
Anti-pT	1:250	
Anticuerpo monoclonal	Clona	Dilución
Anti-HMGB1 (C-terminal)		1:200
Anti- β Actina	AC-15	1:5000
Anti-Lámina B1	L-5	1:500
Anti-pY	PY-7E1 y PY20	1:100

RESULTADOS

Distribución subcelular de HMGB1 en biopsias de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).

Se determinó la distribución subcelular de la proteína HMGB1 en tejido proveniente de biopsias de pacientes con los subtipos histológicos: adenocarcinoma pulmonar y carcinoma epidermoide de NSCLC. Además, para comparar la distribución subcelular de HMGB1 con los carcinomas se incluyó el análisis del tejido pulmonar normal libre de neoplasia.

Ya que los carcinomas pulmonares surgen del epitelio respiratorio, constituido por la región bronquial (bronquios y bronquiolos) y alveolar (alvéolos), se determinó la distribución subcelular de HMGB1 en ambas regiones libres de neoplasia. En la región bronquial, cubierta por epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con células caliciformes (productoras de mucina) así como con células basales, la localización de HMGB1 fue nuclear. En la región alveolar, constituida por los neumocitos tipo I y II, la distribución celular de la proteína fue nuclear. En la región bronquial se observaron linfocitos T, pertenecientes al tejido linfoide asociado a bronquiolos (BALT) y en la región alveolar, se observaron macrófagos, en estas células la localización de HMGB1 fue nuclear con una marca intensa (figura 5a-5d).

En los adenocarcinomas pulmonares, la distribución subcelular de HMGB1 en la mayoría de los casos (67%), se observó en el citoplasma, o bien en el núcleo y citoplasma de las células tumorales (figura 5e-5g). En las células de carcinoma epidermoide, en el 50% de los casos analizados la localización de HMGB1 fue predominantemente nuclear y sólo en el 30% restante se observó una localización en ambos compartimentos; en contraste con los adenocarcinomas, la tinción de HMGB1 en el citoplasma de las células de carcinoma epidermoide fue débil (figura 5h-5i).

Además, en ambos subtipos histológicos estudiados, algunos casos no expresaron la proteína HMGB1 (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución subcelular de HMGB1 en carcinomas pulmonares

Distribución subcelular	Tipo histológico	
	AD (%)	CE (%)
Núcleo y citoplasma o citoplasma	67	30
Núcleo	9	50
Sin expresión	24	20
n =	21	10

% de casos positivos en el compartimento subcelular; AD: adenocarcinoma; CE: carcinoma epidermoide.

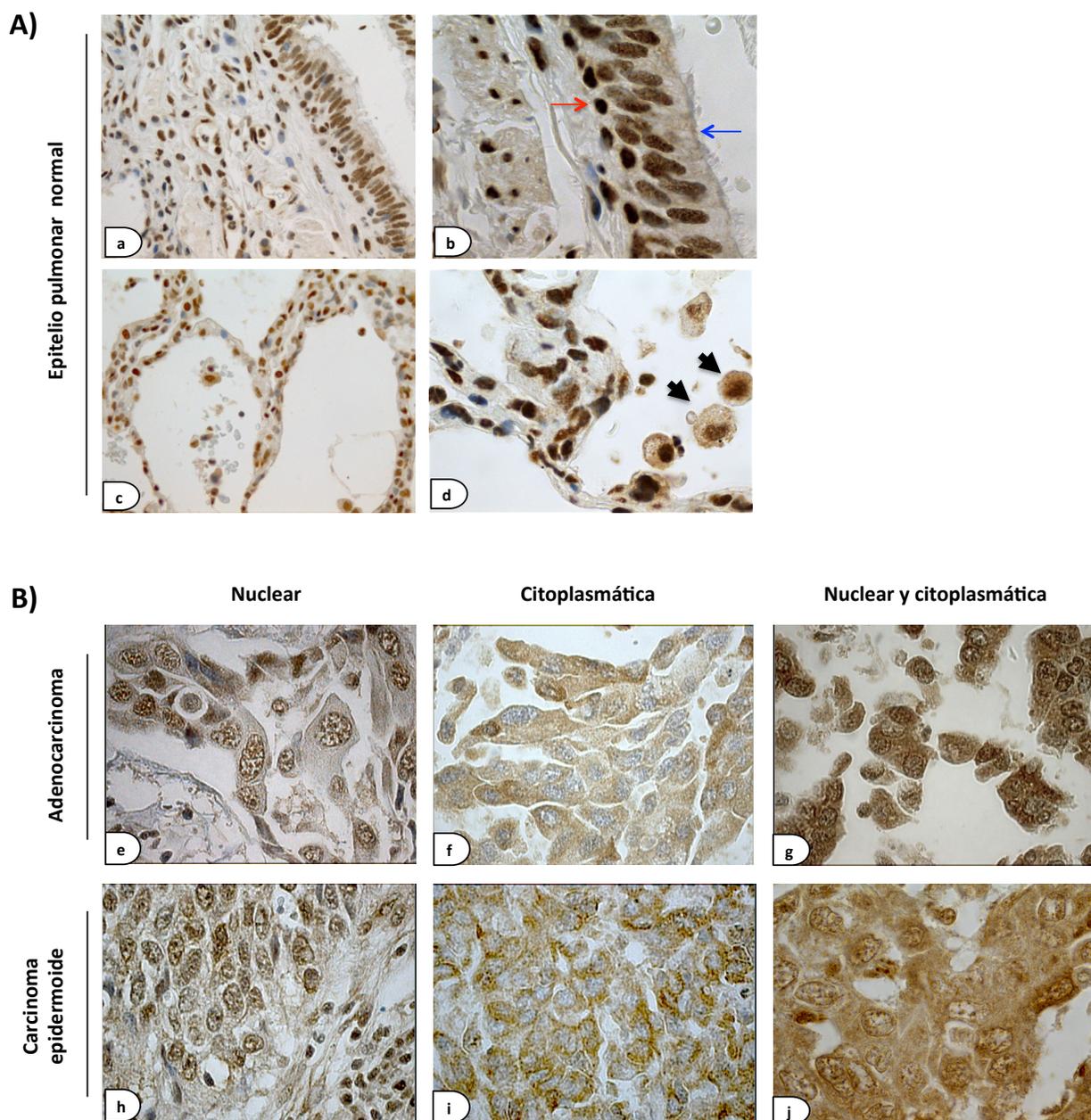


Figura 5. Distribución subcelular de HMGB1 en carcinomas pulmonares empleando inmunohistoquímica. **Panel A.** Localización nuclear de la proteína HMGB1 en el epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado (a y b) y región alveolar normal libre de neoplasia (c y d). Se indica la localización nuclear de HMGB1 en macrófagos alveolares (punta de flecha), células basales (flecha roja) y epiteliales (flecha azul). **Panel B.** Distribución nuclear, citoplasmática o en ambos compartimentos celulares de HMGB1 en células tumorales de adenocarcinoma pulmonar (e-g) y carcinoma epidermoide (h-j). Aumento total 40x (a y c) y 100x (b,d, e-j).

Distribución subcelular de HMGB1 en líneas celulares de carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC).

La distribución de HMGB1 en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar fue similar a la observada en las biopsias. En las líneas celulares A-549, A-427 y Calu-1, la localización de HMGB1 se observó principalmente nuclear, con ligera tinción en el citoplasma. Bartlin y cols.⁹⁷ reportaron previamente en la línea A-549 una tinción nuclear similar a la observada en este estudio. Las líneas celulares SK-MES-1, 1.3.15 y CDS-1 mostraron localización nuclear de la proteína HMGB1; mientras que las líneas celulares SK-LU-1, 1.3.11 y 3B1A, mostraron una localización principalmente citoplasmática.

El patrón de tinción de HMGB1 observado, fue en forma de puntillero grueso en el núcleo y puntillero fino en el citoplasma. En la figura 6 se muestra la distribución subcelular y el patrón de tinción para HMGB1 en las líneas celulares empleadas.

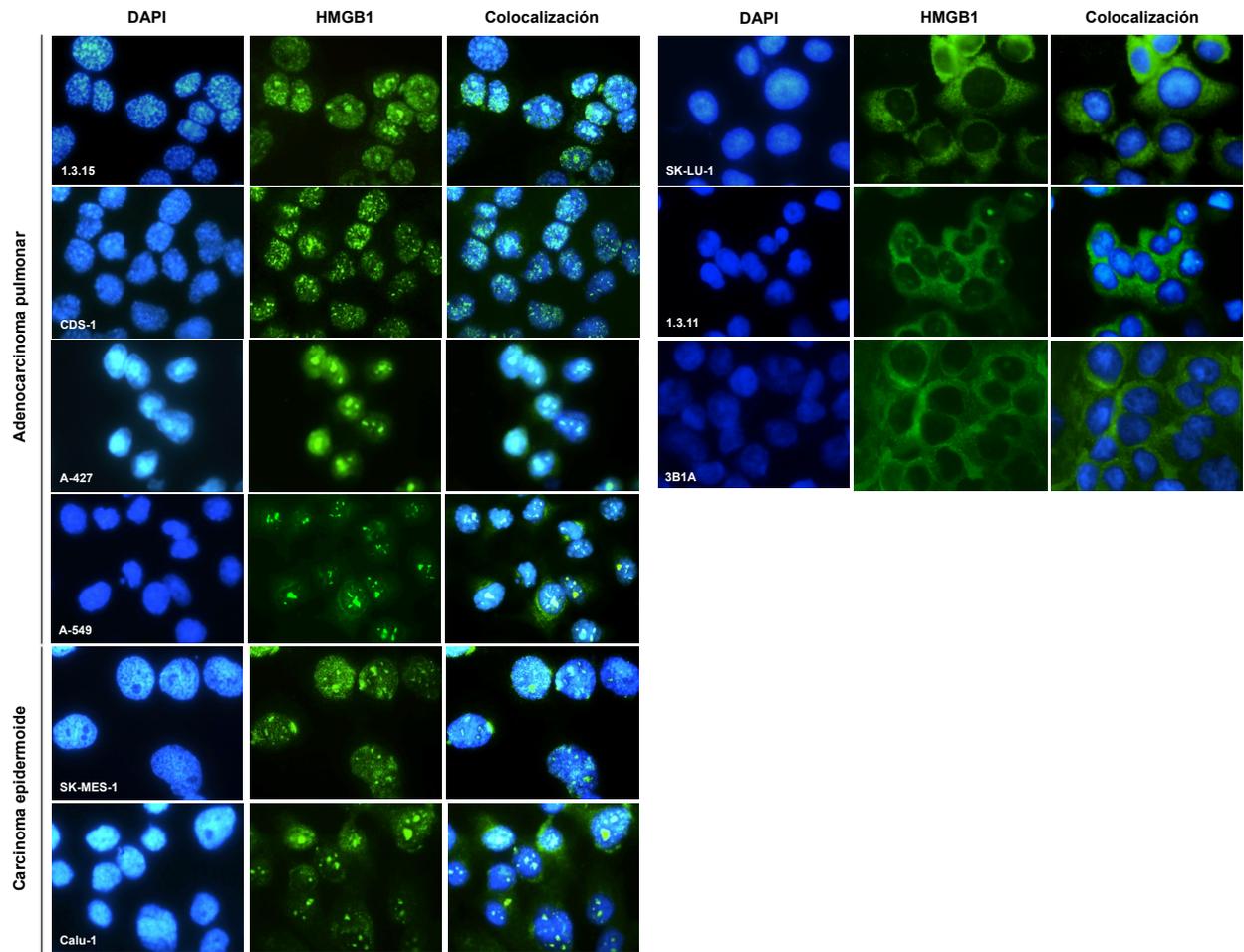


Figura 6. Distribución subcelular de la proteína HMGB1 en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar y carcinoma epidermoide empleando inmunofluorescencia indirecta. Se muestra la localización nuclear y/o citoplasmática de HMGB1 (verde) y tinción nuclear con DAPI (azul). Aumento 100x.

Detección de formas modificadas de la proteína HMGB1 en células tumorales de carcinoma pulmonar

Los monocitos diferenciados a macrófagos, a diferencia de los monocitos no diferenciados, expresan la proteína HMGB1 en el citoplasma de la célula y esta distribución está relacionada con la modificación por fosforilación o acetilación de la proteína.^{34,91,92}

Para determinar si la distribución citoplasmática de HMGB1 en las líneas tumorales de cáncer pulmonar presentan modificación por fosforilación, similar a la reportada por Youn y cols.⁹² en monocitos diferenciados a macrófagos, se empleó la línea 1.3.11 para iniciar esta determinación. Después de inmunoprecipitar la HMGB1 de la fracción citoplasmática de la línea 1.3.11 y realizar el Western blot con los anticuerpos que reconocen los residuos de serina, treonina o tirosina fosforilados, fue difícil determinar si la proteína HMGB1 está fosforilada en residuos de serina o treonina, debido a que el anticuerpo empleado para la inmunoprecipitación y el anticuerpo empleado en la detección de los residuos fosforilados están hechos en la misma especie y la banda correspondiente a las cadenas ligeras (masa molecular 25 kDa) no permitió detectar con certeza la banda de HMGB1 correspondiente a las modificaciones en serina o treonina.

Este problema metodológico no se observó en el estudio de la modificación por fosforilación en residuos de tirosina, ya que el anticuerpo empleado para esta determinación está hecho en una especie (ratón) diferente a la del anticuerpo empleado para la inmunoprecipitación (conejo). Con base a lo anterior, podemos concluir que la proteína HMGB1 de la línea 1.3.11 no presenta modificaciones por fosforilación en residuos de tirosina.

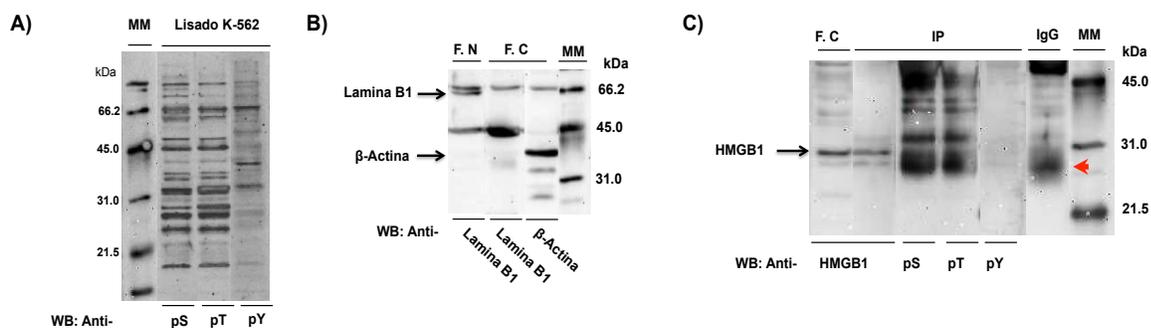


Figura 7. A) Western blot con los anticuerpos anti-pS, anti-pT y anti-pY en la línea celular K-562 empleada como control de la reactividad de los anticuerpos. **B)** Western blot de la fracción citoplásmica (F.C) y nuclear (F.N) de la línea 1.3.11. Se muestran las bandas correspondientes a lámina B1 y β -Actina, como marcadores de proteínas nucleares y citoplasmáticas, respectivamente. **C)** inmunoprecipitación (IP) de HMGB1, se observa la banda que corresponde al peso molecular (alrededor de 30 kDa) de la proteína HMGB1 en la fracción citoplásmica, así como en la inmunoprecipitada. Western blot (WB) de la HMGB1 inmunoprecipitada con anticuerpos anti-fosfoserina (pS), -fosfotreonina (pT) y -fosfotirosina (pY). Se empleó un anticuerpo de la clase IgG como control negativo y muestra la banda que corresponde a la cadena ligera del anticuerpo (punta de flecha roja)

Patrón bidimensional de la proteína HMGB1 en células de carcinoma pulmonar

Se estandarizó la metodología de E-2D y Western blot, empleando diferentes fracciones celulares de la línea de monocitos humanos U-937. Para detectar si la proteína HMGB1 nuclear y citoplásmica muestra un punto isoeléctrico distinto, la línea celular U-937 se cultivo en ausencia y presencia de ViD3 y LPS, como se indica en materiales y métodos.

Primero, se empleó inmunofluorescencia indirecta para determinar la distribución de HMGB1 en la línea U-937 estimulada y no estimulada. Las células no estimuladas presentaron HMGB1 en el núcleo y esta señal colocalizó con DAPI. Mientras que las células estimuladas trasladaron HMGB1 al citoplasma. Esta re-distribución citoplásmica se observó preponderantemente a las 18 h después del estímulo con LPS (figura 8). Estos resultados fueron similares a los ya reportados por Bonaldi y cols.³⁴

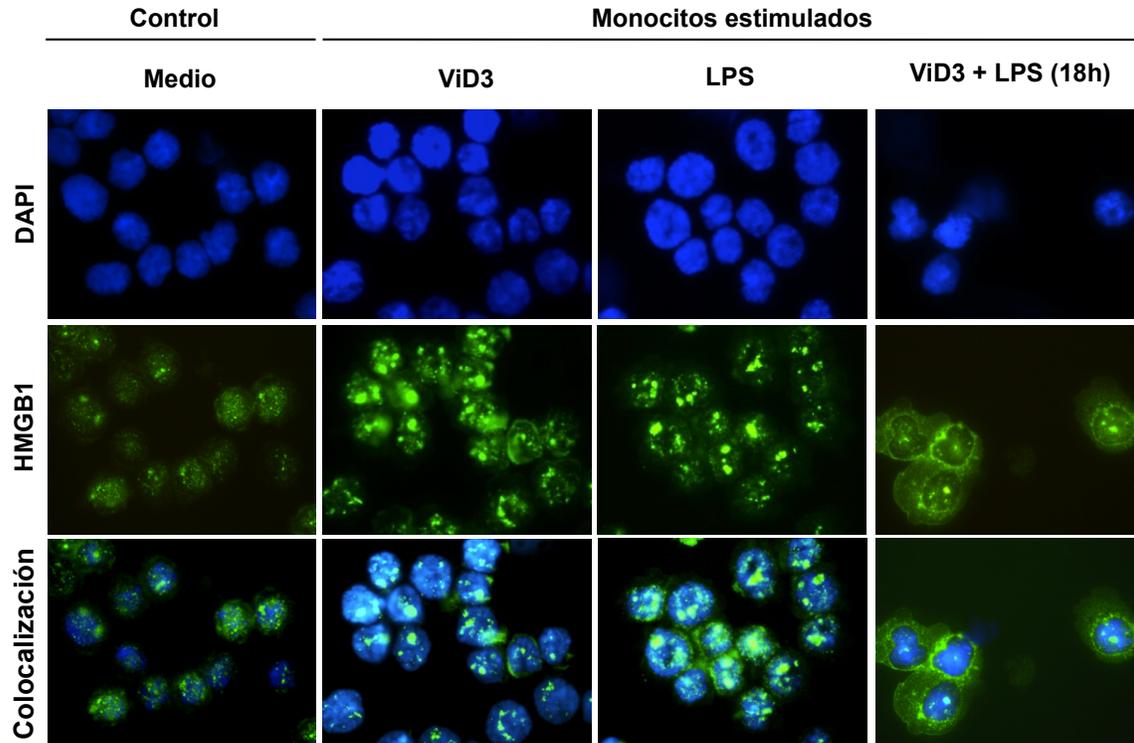


Figura 8. Distribución subcelular de la proteína HMGB1 en monocitos de la línea celular U-937. Empleando inmunofluorescencia indirecta se muestra la localización nuclear de HMGB1 (verde) en las células mantenidas en medio (control), estimuladas únicamente con ViD3 o LPS. En las células estimuladas con ViD3 y LPS (18h) se muestra la localización citoplasmática de HMGB1. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). Aumento total 100x.

Las condiciones de cultivo antes indicadas se emplearon en la obtención de fracciones celulares para el posterior análisis de las modificaciones de HMGB1.

Geles bidimensionales y análisis de HMGB1 por Western blot

Posterior a la separación de las proteínas en E-2D, se identificó a la proteína HMGB1 empleando Western blot. La proteína identificada corresponde al peso molecular y al punto isoeléctrico reportado (25-30 kDa / pI 5-7).

Ya que en el lisado total y en la fracción citoplasmática, tanto de la línea U-937, como de las líneas celulares de carcinoma pulmonar 1.3.11 y A-549 se identificaron puntos, debidos a la reactividad del anticuerpo secundario, que no modificaron su punto isoeléctrico, se decidió emplearlos como referencia para detectar posibles cambios en el punto isoeléctrico de la proteína HMGB1 en las diferentes fracciones subcelulares. Con base a estos puntos, se definió la región de interés donde aparece HMGB1 dividiendo en cada gel la región de interés en dos columnas (1 y 2).

El análisis de HMGB1 en la línea celular U-937 no estimulada se realizó empleando las proteínas totales. Los resultados obtenidos muestran dos puntos que aparecen con la misma masa molecular (alrededor de 30 kDa) y un punto isoeléctrico alrededor de 6.5-7 (puntos ubicados en la columna 1). En cambio, en el lisado total de la línea U-937 estimulada, la señal debida a HMGB1 fue de mayor intensidad y se desplazó hacia la región más ácida del gradiente de pH, con respecto al control (puntos ubicados en columna 2). Asimismo, esta señal se observó al analizar únicamente la fracción citoplasmática de la línea U-937 estimulada, demostrando claramente que el punto desplazado en hacia la región ácida corresponde a la forma modificada de HMGB1 presente en el citoplasma (figura 9). Resultados similares a los obtenidos en esta tesis fueron reportados previamente por Bonaldi y cols.³⁴, empleando el lisado total de la línea U-937.

Se ha reportado que cuando una misma proteína presenta PTMs se observa una serie de puntos que varían en la masa molecular y punto isoeléctrico^{87,98}, por lo que la HMGB1 presente en el citoplasma de la línea U-937 estimulada contiene modificaciones. Se ha reportado que bajo las condiciones experimentales empleadas, la HMGB1 de la línea U-937 estimulada presenta modificaciones por acetilación en residuos de lisina³⁴, será necesario corroborar en este estudio si se presenta o no esta modificación.

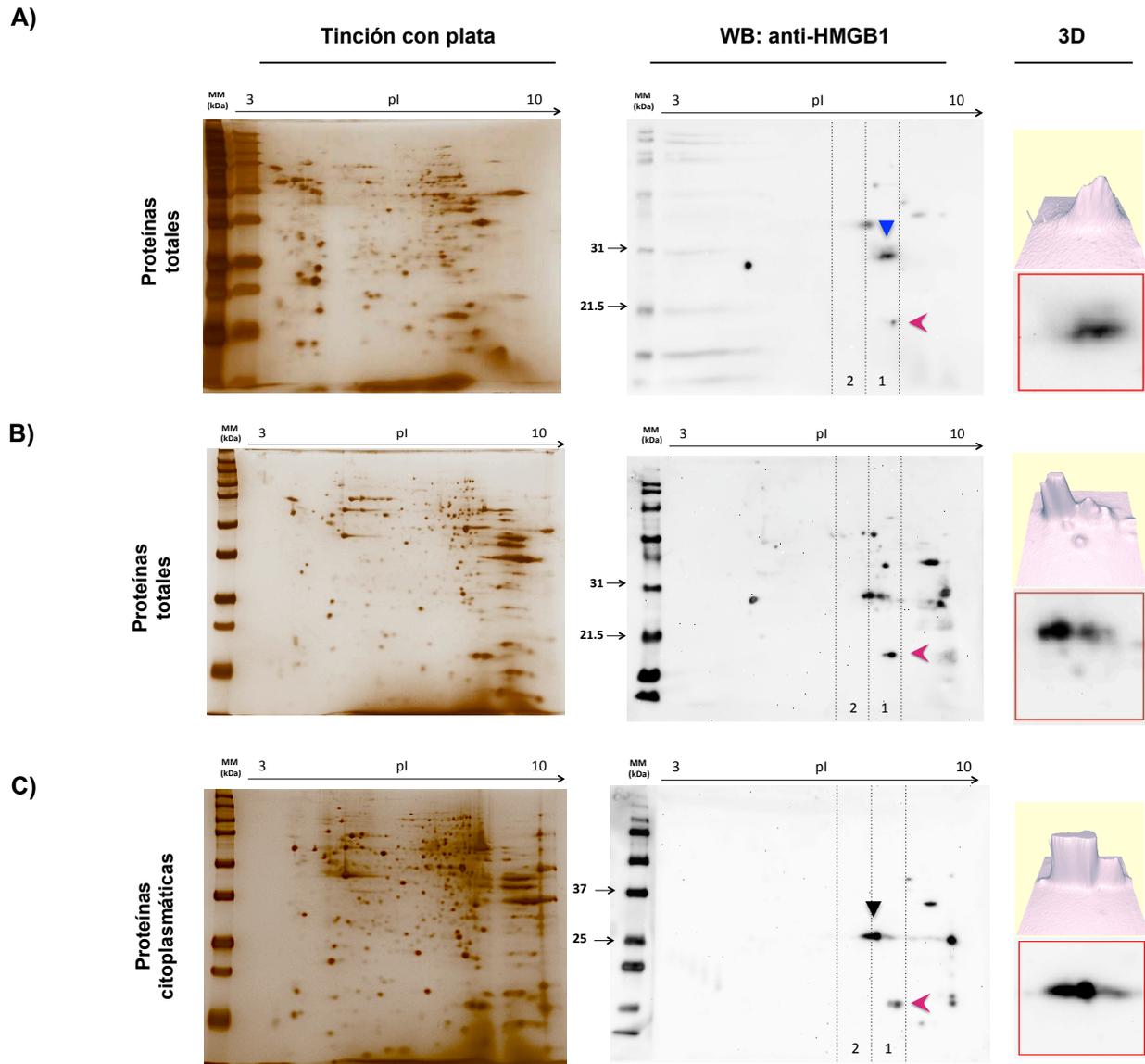


Figura 9. Análisis mediante E-2D y Western blot (WB) de las proteínas totales obtenidas de la línea celular U-937 sin estímulo (panel A) y estimuladas con ViD3 y LPS (18h) (panel B y C). Se observa el patrón de puntos que corresponde a la HMGB1, localizada principalmente en el núcleo, en células no estimuladas (punta de flecha azul) y HMGB1 citoplasmática de células estimuladas (punta de flecha negra). Se muestra el total de proteínas teñidas con plata correspondientes a cada condición y la representación tridimensional de los puntos que muestra la intensidad de la señal.

Patrón de puntos de HMGB1 en líneas de carcinoma pulmonar

En la línea A-549, HMGB1 se distribuye en núcleo (principalmente) y citoplasma. El lisado total (100 µg) mostró una distribución de HMGB1 que se identificó en un rango de pH de 7-6 y que abarcó la columna 1 y 2, respectivamente. En la fracción nuclear (50 µg) se observó una señal localizada con un punto isoeléctrico alrededor de 6.5-7 (ubicados en la columna 1); mientras que la HMGB1 presente en la fracción citoplasmática (50 µg) mostró una serie de puntos con mayor intensidad y se localizaron con un punto isoeléctrico de 6-6.5 (entre el límite de la columna 1 y en la columna 2) (figura 10).

Con respecto a la línea 1.3.11, donde HMGB1 se localizó principalmente en el citoplasma, el análisis del lisado total (100 µg) mostró un mayor número de puntos correspondientes a HMGB1 en un rango de pH más amplio que el mostrado por la línea A-549. En la fracción nuclear conteniendo 50 µg de proteína, no se detectó la HMGB1 (datos no mostrados). Sin embargo, al incrementar la concentración a 100 µg de proteína, HMGB1 se observó con un patrón de puntos distribuidos a lo largo de la columna 1. Esta distribución abarcó un rango mayor del gradiente de pH que el observado en la fracción nuclear de la línea A-549 y del lisado total de la línea U-937 no estimulada. En la fracción citoplasmática de la línea 1.3.11, HMGB1 mostró un patrón de puntos que aparecen en una fila horizontal y desplazados aún más hacia la región ácida (pI 6-6.5, columna 2) (figura 11). De acuerdo con este patrón de puntos observado, se ha descrito que las fosforilaciones heterogéneas de una proteína generalmente aparecen en los geles E-2D como "trenes de puntos"⁸⁷, lo que sugiere que en el citoplasma de la línea 1.3.11, la HMGB1 presenta distintos grados de algún tipo de modificación y probablemente esta pueda ser por fosforilación.

Con los resultados hasta ahora obtenidos, será necesario determinar el tipo de modificaciones que presenta la proteína, a fin de conocer si los monocitos estimulados y las células de origen epitelial presentan la misma modificación o ésta es dependiente del tipo celular.

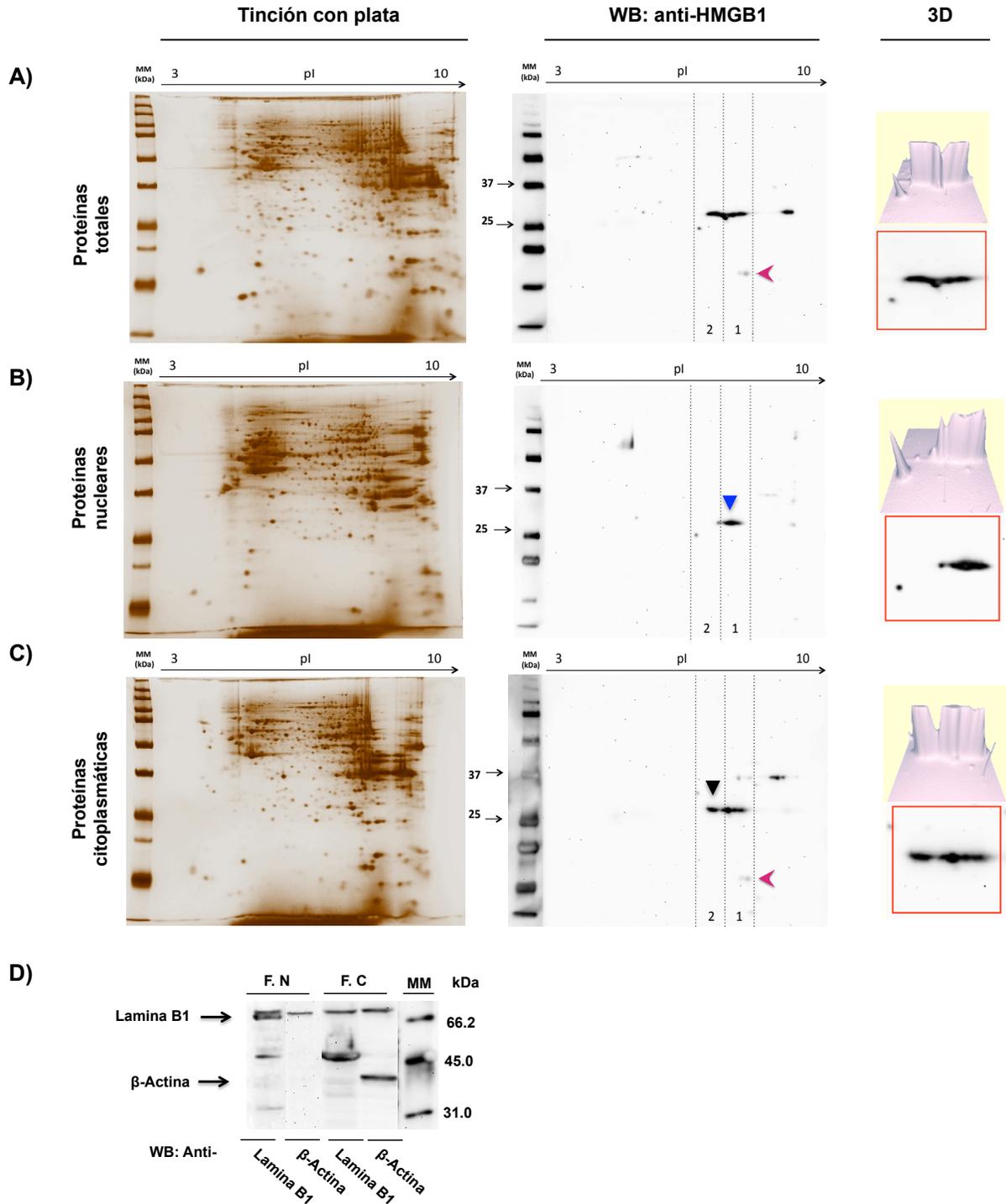


Figura 10. A-C): Análisis mediante E-2D y Western blot (WB) de las proteínas nucleares, citoplasmáticas y totales obtenidas de la línea celular A-549. Se muestra patrón de proteínas totales teñidas con plata, el patrón de puntos identificados para la proteína HMGB1 nuclear (flecha azul) y la citoplasmática (flecha negra), así como la representación tridimensional de los puntos. **D)** Western blot de geles de una dimensión de proteínas de la fracción citoplásmica (F.C) y nuclear (F.N) de la línea A-549. Se muestran las bandas correspondientes a lámina B1 y β -Actina, como marcadores de proteínas nucleares y citoplasmáticas, respectivamente.

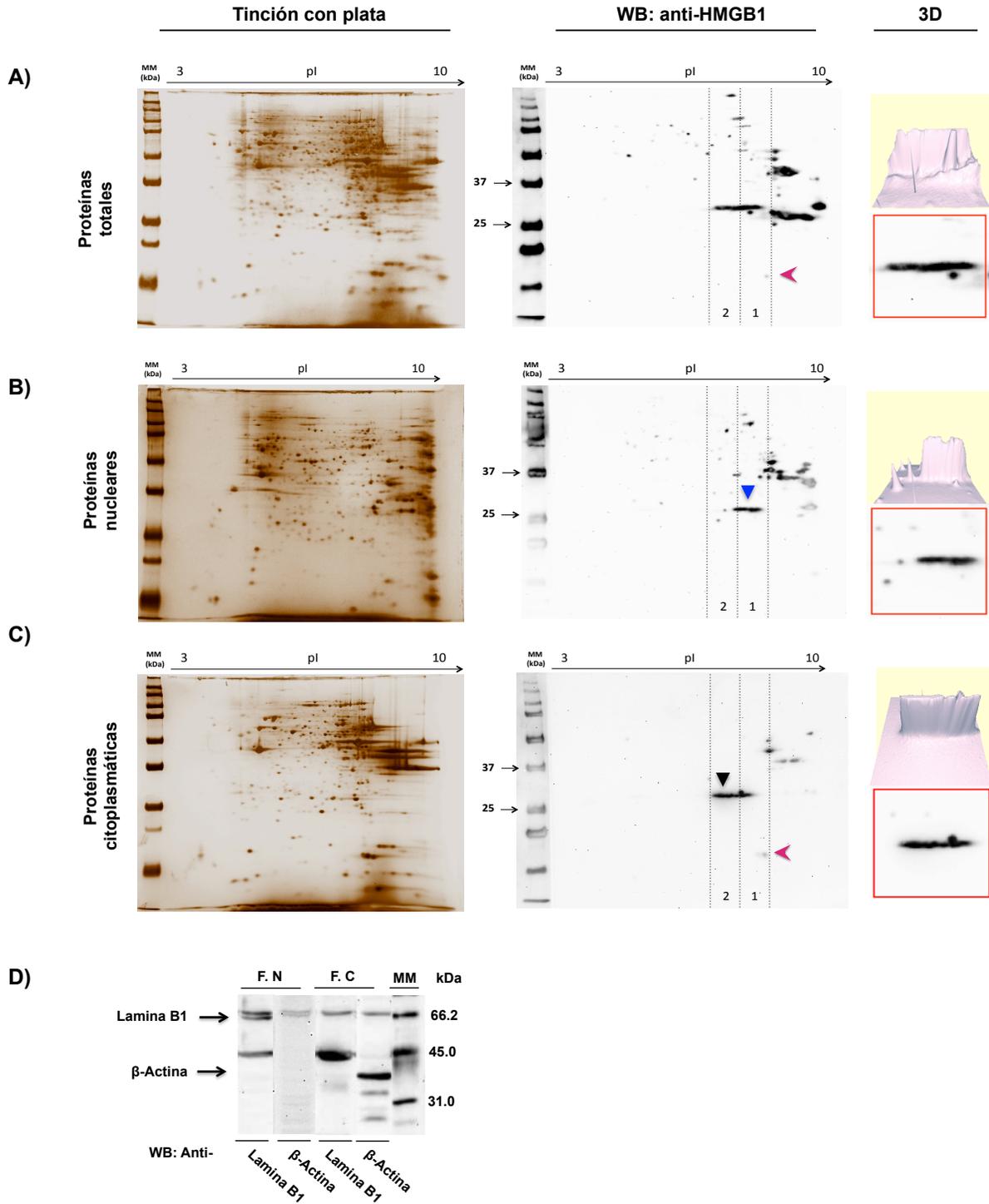


Figura 11. A-C) Análisis mediante E-2D y Western blot (WB) de las proteínas nucleares, citoplasmáticas y totales obtenidas de la línea celular 1.3.11. Se muestra patrón de proteínas totales teñidas con plata, el patrón de puntos identificados para la proteína HMGB1 nuclear (flecha azul) y la citoplasmática (flecha negra), así como la representación tridimensional de los puntos. **D)** Western blot de geles de una dimensión de proteínas de la fracción citoplásmica (F.C) y nuclear (F.N) de la línea 1.3.11. Se muestran las bandas correspondientes a lámina B1 y β-Actina, como marcadores de proteínas nucleares y citoplasmáticas, respectivamente.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó la distribución subcelular de HMGB1 en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar y carcinoma epidermoide, dos de los tipos histológicos más frecuentes de los carcinomas pulmonares, así como en células tumorales provenientes de biopsias de pacientes, con estos mismos tipos histológicos, y tejido normal libre de neoplasia.

Como un componente de la cromatina, la principal función de la proteína HMGB1 es promover la interacción física del DNA con varios factores de transcripción para regular la transcripción de ciertos genes, por lo que en tejido normal, la distribución nuclear de HMGB1 refleja su principal función. En cambio, en los adenocarcinomas pulmonares, la distribución subcelular de HMGB1 se observó en núcleo y citoplasma o únicamente en citoplasma. Mientras que en los carcinomas epidermoides la distribución de HMGB1 se observó principalmente nuclear. En estos últimos, la tinción de HMGB1 fue intensa a nivel nuclear y débil en el citoplasma. Resultados similares fueron reportados por Liu y cols.⁸⁴, sugiriendo que en los NSCLCs existe una sobreexpresión del gen para HMGB1. Con relación a este punto, varios grupos de investigación han demostrado que en células tumorales y líneas celulares provenientes de distintos tipos de cáncer, la HMGB1 se encuentra sobreexpresada y se ha sugerido que HMGB1 está relacionada con la invasión, el estadio de la enfermedad y metástasis a ganglios linfáticos u órganos distantes.⁶¹ En consecuencia, se ha propuesto que HMGB1 puede directamente o indirectamente contribuir al proceso de la tumorigénesis.⁶¹

Por otro lado, se ha observado en monocitos y en líneas celulares tipo monocito que la distribución subcelular de HMGB1 depende del estado de activación de la célula. En este sentido, los monocitos no activados mantienen la HMGB1 en el núcleo; mientras que, los monocitos activados re-distribuyen la proteína al citoplasma para su posterior liberación activa.³⁴ Se ha observado que el proceso de re-localización de HMGB1 es altamente regulado por modificaciones post-traduccionales (PTMs) como la acetilación y fosforilación.^{34,92,99}

Ya que en el presente estudio se observó que los carcinomas pulmonares y las líneas celulares expresan la HMGB1 en diferentes compartimentos celulares, se consideró inicialmente la posibilidad de que los carcinomas pulmonares presentaran un mecanismo de secreción activa similar al que ocurre en macrófagos. En este sentido, en el tumor la liberación de HMGB1 pudiera actuar como un factor autócrino o parácrino que conlleve a la progresión del mismo, como se ha reportado. Con relación al primer aspecto, se ha descrito que HMGB1 extracelular interactúa con TLR-4 o RAGE para favorecer la migración celular.^{33,55} De manera parácrina, HMGB1 interacciona con la quimiocina CXCL12 e induce su cambio conformacional lo que incrementa la afinidad de unión con su receptor CXCR4. Ya que CXCR4 esta presente en células inflamatorias, estas células migran hacia el tejido dañado y favorecen la respuesta inflamatoria que se ha asociado con la progresión tumoral.¹⁰⁰

Para detectar si HMGB1 localizada en el citoplasma de las células de carcinomas pulmonares presenta cambios en su peso molecular o punto isoelectrico, que evidencien la presencia de algún tipo de PTM, se realizó la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional (E-2D) y se detectó la proteína por Western blot. La HMGB1 nuclear, tanto de la línea celular A-549, que expresa HMGB1 en el núcleo y citoplasma, así como la línea 1.3.11 que expresa principalmente HMGB1 en el citoplasma, mostraron señales con un punto isoelectrico entre 6.5-7. En particular, la línea 1.3.11 mostró un ligero corrimiento de los puntos hacia la región ácida. Esta observación pudiera deberse a: *i)* aspectos relacionados al procedimiento metodológico o *ii)* que una fracción de la HMGB1 nuclear sea modificada para ser exportada del núcleo al citoplasma. Young y cols.⁹¹ demostraron, en monocitos estimulados, que previo a la distribución de HMGB1 en el citoplasma, HMGB1 nuclear es fosforilada por la cPKC.

Con respecto a la línea U-937 estimulada, la proteína HMGB1 desplazó su punto isoelectrico hacia la región ácida, comparado con la línea U-937 no estimulada. Esta señal fue similar a la reportada previamente por Bonaldi y cols.³⁴ La serie de puntos observados se ha asociado a modificaciones post-traduccionales que presentan las

proteínas y de manera particular a modificaciones en HMGB1 por fosforilación o acetilación.⁹⁹ En relación con esto, la modificación por fosforilación o acetilación de HMGB1 cambia el punto isoeléctrico de la proteína al adquirir grupos funcionales cargados negativamente. Esta ganancia de grupos fosfato o acetilo en la molécula de HMGB1 provoca la disminución de afinidad de unión al DNA, hasta 10 veces, lo que promueve su traslado hacia el citoplasma.^{34,91}

Con respecto a las células de carcinomas pulmonares, la HMGB1 citoplasmática mostró un patrón de varios puntos en un rango de pH más amplio, algunos de estos puntos se observaron también a lo largo del gradiente de pH observado en la fracción nuclear. En particular, en la línea A-549 se observó un punto desplazado hacia la región ácida que se separó del resto, mientras que en la línea 1.3.11 el patrón de puntos observados formó una fila horizontal continua. Por lo anterior, es probable que, HMGB1 de las líneas tumorales estudiadas presente distintas modificaciones post-traduccionales, o bien, que presente una misma modificación en uno o más aminoácidos, susceptibles de ser modificados y situados dentro la cadena polipeptídica. Lo anterior podría asociarse a que cada línea celular exprese distintas enzimas que participen en las diferentes PTMs, o bien, que la concentración o actividad de la enzima que induce la modificación sea particular de cada línea celular. Será necesario complementar el análisis proteómico de la proteína HMGB1 con otras metodologías, como la espectrometría de masas, que permita determinar la naturaleza de las modificaciones.

Los resultados obtenidos indican que la distribución de HMGB1 en distintos compartimentos celulares en los carcinomas pulmonares, no se debe exclusivamente a la sobreexpresión del gen para HMGB1 si no que, otros factores podrían estar contribuyendo. Entre los factores que podrían promover la distribución citoplasmática de HMGB1 se encuentran: *i*) factores solubles (citocinas, factores de crecimiento, etc.) liberados por las propias células tumorales o por las células del estroma. Bartlin y cols.⁹⁷ reportaron que el bFGF liberado por una línea celular de fibroblastos induce la re-localización citoplasmática de HMGB1 en la línea de células epiteliales pulmonares

H358. *ii)* distintas proteínas residentes del citoplasma interaccionen con HMGB1 citoplasmática manteniéndola en este compartimento subcelular. Es probable que la modificación post-traducciona de HMGB1 permita que esta molécula actúe como una proteína de andamiaje o adaptadora para distintas proteínas citoplasmáticas asociadas a vías de señalización mediadas por HMGB1. Será necesario iniciar estudios para definir si en los tumores pulmonares, HMGB1 participa en alguna cascada de señalización. *iii)* que la modificación post-traducciona favorezca la exportación de HMGB1 al citoplasma para su interacción con proteínas involucradas en el transporte intracelular y su proceso de secreción activo, como fue sugerido por un análisis proteómico realizado en células de cáncer de colon.¹⁰¹

Finalmente, resultados obtenidos hasta el momento sugieren que en los carcinomas pulmonares la distribución núcleo-citoplasma de HMGB1 es regulada por algún tipo de modificación post-traducciona. Por lo tanto, si la modificación provoca la distribución citoplasmática de HMGB1, posiblemente podría estar asociada con su posterior liberación por las células tumorales pulmonares. Además, puesto que HMGB1 sérica está asociada con la progresión de la enfermedad, HMGB1 citoplasmática podría ser empleada como biomarcador. Por lo anterior, es necesario conocer los mecanismos que conducen a la secreción de HMGB1 y definir la participación de la proteína en relación al desarrollo del cáncer pulmonar con la finalidad de trazar estrategias que impacten en el control del crecimiento y progresión del carcinoma pulmonar.

CONCLUSIONES

Las líneas celulares de carcinoma pulmonar muestran una distribución subcelular de HMGB1 similar a la observada en los carcinomas pulmonares. Lo anterior permite que las líneas celulares puedan ser empleadas para iniciar estudios que definan la participación de HMGB1 en los carcinomas pulmonares. En relación a su distribución citoplasmática y posiblemente a la cantidad de HMGB1, ésta presenta distintos patrones de puntos desplazados hacia la región ácida. Lo anterior pudiera estar asociado a heterogeneidad en las modificaciones de la HMGB1. Es necesario estudiar la funcionalidad de HMGB1 en relación al desarrollo del cáncer pulmonar, con la finalidad de trazar estrategias que impacten en el control del crecimiento y progresión de este tipo de neoplasias.

PERSPECTIVAS

- ❖ Analizar un mayor número de líneas celulares tumorales, donde previamente se determinó la distribución subcelular de HMGB1, a fin de definir si los distintos patrones de puntos y los cambios en el punto isoeléctrico de la proteína observados es un evento particular que se presenta en las líneas celulares empleadas en el estudio o es un evento en general en las células tumorales
- ❖ Definir el tipo de modificación post-traducciona que presenta la proteína para asociarlo con su posterior secreción o interacción con otras proteínas
- ❖ Determinar si en los carcinomas pulmonares, la HMGB1 se encuentra sobreexpresada como se ha reportado en otros tipos de cáncer
- ❖ Estudiar si la secreción de HMGB1 por las células tumorales pulmonares es mediante microvesículas, dado que esta proteína no posee un péptido señal
- ❖ Conocer la función biológica de HMGB1 en las células tumorales pulmonares y en su microambiente

REFERENCIAS

1. LI H. Biología de la célula tumoral. in *Oncología molecular y celular* (ed. OGS, R.D.B.) 41-55 (Buenos Aires: Durken;, 2002).
2. Vogelstein B & Kinzler K. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789-888 (2004).
3. Ponder B. Cancer genetics. *Nature* **411**, 336-377 (2001).
4. Hanahan D & Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
5. Anisimov VN. Carcinogenesis and aging 20 years after: escaping horizon. *Mech Ageing Dev* **130**, 105-121 (2009).
6. Ferlay J SH, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Globocan 2008 v1.2, cancer incidence and mortality worldwide: larc cancerbase no. 10 [internet]. Lyon, france: International agency for research on cancer; 2010. Disponible de: <Http://globocan.larc.fr>. Fecha de acceso 4/10/2011.
7. Ruiz-Godoy L, Rizo Rios P, Sanchez Cervantes F, Osornio-Vargas A *et al*. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* **58**, 184-274 (2007).
8. Stephen SH. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* **3**(2003).
9. Lee YJ, Kim JH, Kim SK, Ha SJ *et al*. Lung cancer in never smokers: change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer* **72**, 9-15 (2011).
10. Minna JD, Roth JA & Gazdar AF. Focus on lung cancer. *Cancer Cell* **1**, 49-52 (2002).
11. Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* **3**, 461-469 (2002).
12. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 733-744 (2003).
13. Herbst RS, Heymach JV & Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* **359**, 1367-1380 (2008).
14. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B & Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *Eur Respir J* **18**, 1059-1068 (2001).
15. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* **23**, 65-81, viii (2002).
16. Chaplin D. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* **117**, 5 (2006).

17. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B & Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Leukoc Biol* **261**, 511-528 (2007).
18. Kono H & Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* **8**, 279-289 (2008).
19. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305 (2002).
20. Smyth M, Godfrey D & Trapani J. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* **2**, 293-302 (2001).
21. Dunn G, Old L & Schreiber R. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137-185 (2004).
22. Bianchi M. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**, 1-6 (2007).
23. Yang D, Tewary P, de la Rosa G, Wei F & Oppenheim JJ. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 157-163 (2010).
24. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L *et al.* Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* **15**, 3-12 (2008).
25. Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, Kroemer G & Zitvogel L. Molecular interactions between dying tumor cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Res* **68**, 4026-4030 (2008).
26. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L & Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* **9**, 353-363 (2009).
27. Srikrishna G & Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* **11**, 615-628 (2009).
28. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 5237-5246 (1999).
29. Hock R, Furusawa T, Ueda T & Bustin M. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* **17**, 72-79 (2007).
30. Zhang Q & Wang Y. HMG modifications and nuclear function. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 28-36 (2010).
31. Reeves R. Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 3-14 (2010).
32. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R *et al.* Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med* **9**, 37-45 (2003).
33. Rauvala H & Rouhiainen A. Physiological and pathophysiological outcomes of the interactions of HMGB1 with cell surface receptors. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 164-234 (2007).

34. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D *et al.* Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *Embo J* **22**, 5551-5611 (2003).
35. Lotze MT & Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* **5**, 331-342 (2005).
36. U H. UniProt Consortium. De protein sequences to 3D-structures and beyond: the example of the UniProt knowledgebase. Disponible de: [Http://www.Uniprot.Org/uniprot/p09429](http://www.Uniprot.Org/uniprot/p09429). Fecha de acceso 29/04/2011.
37. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H *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* **107**, 11942-11947 (2010).
38. Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME & Rovere-Querini P. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol* **26**, 381-387 (2005).
39. Stros M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 101-113 (2010).
40. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti L *et al.* The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* **3**, 995-1996 (2002).
41. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, Valentini B *et al.* HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* **5**, 825-830 (2004).
42. Dumitriu IE, Bianchi ME, Bacci M, Manfredi AA & Rovere-Querini P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J Leukoc Biol* **81**, 84-91 (2007).
43. Andersson U & Rauvala H. Introduction: HMGB1 in inflammation and innate immunity. *J Intern Med* **270**, 296-596 (2011).
44. Yang H, Wang H, Czura CJ & Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* **78**, 1-8 (2005).
45. Andersson U & Tracey K. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* **29**, 139-201 (2011).
46. Huang LF, Yao YM, Dong N, Yu Y *et al.* Association of high mobility group box-1 protein levels with sepsis and outcome of severely burned patients. *Cytokine* **53**, 29-34 (2011).
47. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X *et al.* Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 296-301 (2004).
48. Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H & Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res Ther* **10**, 209 (2008).

49. Lara C, Lidia B & Patrizia R-Q. HMGB1: a two-headed signal regulating tumor progression and immunity. *Curr Opin Immunol* **20**(2008).
50. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* **285**, 248-251 (1999).
51. Scaffidi P, Misteli T & Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191-195 (2002).
52. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3-11 (2009).
53. Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* **270**, 2109-2119 (2003).
54. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R & Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* **28**, 367-388 (2010).
55. Rauvala H & Rouhiainen A. RAGE as a receptor of HMGB1 (Amphoterin): roles in health and disease. *Curr Mol Med* **7**, 725-734 (2007).
56. Akira S, Uematsu S & Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-1584 (2006).
57. Park J, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D *et al.* High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, 24 (2006).
58. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT *et al.* HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* **26**, 174-179 (2006).
59. Akira S & Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**, 499-511 (2004).
60. Pisetsky D. Cell death in the pathogenesis of immune-mediated diseases: the role of HMGB1 and DAMP-PAMP complexes. *Swiss Med Wkly* **141**(2011).
61. Tang D, Kang R, Zeh H & Lotze M. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 131-171 (2010).
62. Haynes NM, van der Most RG, Lake RA & Smyth MJ. Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr Opin Immunol* **20**, 545-557 (2008).
63. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, Schlemmer F *et al.* Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* **30**, 61-69 (2011).
64. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A *et al.* Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *Embo J* **28**, 578-590 (2009).
65. Zitvogel L, Kepp O & Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* **140**, 798-804 (2010).

66. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* **15**, 1170-1178 (2009).
67. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M *et al.* Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* **8**, 3723-3728 (2009).
68. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**, 38-47 (2002).
69. Salcedo X, Medina J, Sanz-Cameno P, Garcia-Buey L *et al.* Review article: angiogenesis soluble factors as liver disease markers. *Aliment Pharmacol Ther* **22**, 23-30 (2005).
70. Mitola S, Belleri M, Urbinati C, Coltrini D *et al.* Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol* **176**, 12-15 (2006).
71. Schlueter C, Weber H, Meyer B, Rogalla P *et al.* Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am J Pathol* **166**, 1259-1263 (2005).
72. Lewis CE & Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* **66**, 605-612 (2006).
73. Mantovani A & Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol* **22**, 231-237 (2010).
74. Volp K, Brezniceanu ML, Bosser S, Brabletz T *et al.* Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut* **55**, 234-242 (2006).
75. Yao X, Zhao G, Yang H, Hong X *et al.* Overexpression of high-mobility group box 1 correlates with tumor progression and poor prognosis in human colorectal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **136**, 677-684 (2010).
76. Poser I, Golob M, Buettner R & Bosserhoff AK. Upregulation of HMG1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype. *Mol Cell Biol* **23**, 2991-2998 (2003).
77. Wu D, Ding Y, Wang S, Zhang Q & Liu L. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* **216**, 167-175 (2008).
78. Choi YR, Kim H, Kang HJ, Kim NG *et al.* Overexpression of high mobility group box 1 in gastrointestinal stromal tumors with KIT mutation. *Cancer Res* **63**, 2188-2193 (2003).
79. He Q, Liang CH & Lippard SJ. Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5768-5772 (2000).

80. Brezniceanu ML, Volp K, Bosser S, Solbach C *et al.* HMGB1 inhibits cell death in yeast and mammalian cells and is abundantly expressed in human breast carcinoma. *FASEB journal* **17**, 1295-1297 (2003).
81. Sheng X, Du X, Zhang X, Li D *et al.* 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* **50**, 455-464 (2009).
82. Gnanasekar M, Thirugnanam S & Ramaswamy K. Short hairpin RNA (shRNA) constructs targeting high mobility group box-1 (HMGB1) expression leads to inhibition of prostate cancer cell survival and apoptosis. *Int J Oncol* **34**, 425-431 (2009).
83. Ishiguro H, Nakaigawa N, Miyoshi Y, Fujinami K *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development. *Prostate* **64**, 92-100 (2005).
84. Liu PL, Tsai JR, Hwang JJ, Chou SH *et al.* High-mobility group box 1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in non-small cell lung cancer contributes to tumor cell invasiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* **43**, 530-538 (2010).
85. 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* **47**, 703-709 (2009).
86. Shang GH, Jia CQ, Tian H, Xiao W *et al.* Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer. *Respir Med* **103**, 1949-1953 (2009).
87. Mann M & Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* **21**, 255-261 (2003).
88. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S & Gatto GJ, Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 7342-7372 (2005).
89. Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ, Woodworth T *et al.* Novel combinations of Post-Translational Modification (PTM) neo-epitopes provide tissue-specific biochemical markers--are they the cause or the consequence of the disease? *Clin Biochem* **43**, 793-804 (2010).
90. Muller S, Ronfani L & Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Leukoc Biol* **255**, 332-343 (2004).
91. Youn JH & Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* **177**, 7889-7897 (2006).
92. Oh YJ, Youn JH, Ji Y, Lee SE *et al.* HMGB1 Is Phosphorylated by Classical Protein Kinase C and Is Secreted by a Calcium-Dependent Mechanism. *J Immunol* **182**(2009).
93. Ito I, Fukazawa J & Yoshida M. Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem* **282**, 16336-16344 (2007).

94. Jube S, Rivera Z, Bianchi ME, Powers A *et al.* Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma. *Cancer research* (2012).
95. Liu S, Stolz DB, Sappington PL, Macias CA *et al.* HMGB1 is secreted by immunostimulated enterocytes and contributes to cytomix-induced hyperpermeability of Caco-2 monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C990-999 (2006).
96. Wahamaa H, Vallerskog T, Qin S, Lunderius C *et al.* HMGB1-secreting capacity of multiple cell lineages revealed by a novel HMGB1 ELISPOT assay. *J Leukoc Biol* **81**, 129-136 (2007).
97. Bartling B, Fuchs C, Silber RE & Simm A. Fibroblasts mediate induction of high mobility group box protein 1 in lung epithelial cancer cells by diffusible factors. *Int J Mol Med* **20**, 217-224 (2007).
98. Seo J & Lee K. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Mol Cell Biol* (2004).
99. Pelovsky P, Pashev I & Pasheva E. Interplay between in vitro acetylation and phosphorylation of tailless HMGB1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 138-180 (2009).
100. Schiraldi M, Raucci A, Munoz LM, Livoti E *et al.* HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med* **209**, 551-563 (2012).
101. Lee H, Shin N, Song M, Kang UB *et al.* Analysis of nuclear high mobility group box 1 (HMGB1)-binding proteins in colon cancer cells: clustering with proteins involved in secretion and extranuclear function. *J Proteome Res* **9**, 4661-4670 (2010).