



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ESTUDIO DE LA ALARMINA HMGB1 EN CARCINOMAS PULMONARES**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**AGUILAR CÁZARES DOLORES**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**MÉXICO, D.F. ENERO, 2016.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de febrero de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **AGUILAR CÁZARES DOLORES** con número de cuenta **86212036** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA ALARMINA HMGB1 EN CARCINOMAS PULMONARES"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ**:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
Secretario: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO  
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ  
Suplente: DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de julio de 2015

*M. del Coro Arriaga*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),  
por la formación doctoral que me brindó.

A mi tutor:

Dr. José Sullivan López Gonzáles

Y a los integrantes del comité tutorial:

Dr. Emilio Rojas del Castillo

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Proyecto 102106.

# ***ÍNDICE***

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
CÁNCER	3
DESARROLLO DE UNA NEOPLASIA	4
CARCINOMAS PULMONARES	5
<i>CIRUGÍA</i>	7
<i>RADIOTERAPIA</i>	7
<i>QUIMIOTERAPIA</i>	8
CISPLATINO	10
<i>MECANISMO DE ACCIÓN</i>	10
<i>VÍAS DE RESISTENCIA</i>	11
MUERTE CELULAR	12
<i>APOPTOSIS</i>	13
<i>VIA INTRÍNSECA</i>	14
MUERTE CELULAR POR TRATAMIENTO CITOTÓXICO Y RESPUESTA INMUNE	15
LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)	16
<i>Funciones nucleares de HMGB1</i>	18
<i>Funciones extracelulares de la molécula HMGB1</i>	20
LA HMGB1 Y SU PARTICIPACIÓN EN EL CÁNCER	22
<i>Funciones protumorales de HMGB1</i>	22
<i>La HMGB1 y la respuesta inmune antitumoral</i>	23
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>25</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>29</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
ESTUDIOS IN VITRO	31
<i>Determinación de la localización celular de HMGB1 en líneas celulares de carcinoma pulmonar.</i>	31

<i>CITOTOXICIDAD EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR TRATADAS CON CISPLATINO</i>	32
<i>Determinación de la CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (CI<sub>50</sub>) del cisplatino por tinción con cristal violeta</i>	32
<i>DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR POR TUNEL</i>	33
<i>LOCALIZACIÓN DE LA HMGB1 POR INMUNOFLUORESCENCIA</i>	34
<i>CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE Los GENes para HMGB1, rage y tlr-4 POR PCR EN TIEMPO REAL</i>	35
<i>CUANTIFICACIÓN DE LA HMGB1 POR ELISA</i>	36
<b>ESTUDIOS EX VIVO</b>	36
<i>Determinación de la localización subcelular de HMGB1 en biopsias de pacientes con carcinoma pulmonar.</i>	36
<i>CUANTIFICACIÓN DE HMGB1 EN EL PLASMA DE LOS PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR</i>	38
<i>Pacientes con adenocarcinoma pulmonar</i>	38
<i>COLECCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA</i>	39
<i>CUANTIFICACIÓN DE HMGB1 EN LAS MUESTRAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR.</i>	39
<i>EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR</i>	40
<i>RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE HMGB1, LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y LA SOBREVIDA TOTAL</i>	41
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	41
<b>RESULTADOS</b>	<b>42</b>
<b>ESTUDIOS IN VITRO</b>	42
<i>DISTRIBUCIÓN DE LA HMGB1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR</i>	42
<i>EXPRESIÓN RELATIVA DEL RNA mensajero de HMGB1, RAGE Y TLR-4</i>	43
<i>CITOTOXICIDAD EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR TRATADAS CON CISPLATINO</i>	44
<i>CONCENTRACIÓN DE HMGB1 EN EL SOBRENADANTE DE LAS LÍNEAS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR</i>	45
<i>CAMBIOS EN LA DISTRIBUCIÓN DE HMGB1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR TRATADAS CON CISPLATINO</i>	47
<b>RESULTADOS EX VIVO</b>	47
<i>DISTRIBUCIÓN CELULAR DE HMGB1 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR</i>	47
<i>CONCENTRACIÓN DE HMGB1 EN EL PLASMA DE LA COHORTE DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR</i>	49

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<i>DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LA HMGB1 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR</i>	56
<i>LIBERACIÓN DE HMGB1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR POR EFECTO DEL CISPLATINO</i>	58
<i>RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR Y SU RELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN DE HMGB1 Y LA SOBREVIDA TOTAL</i>	59
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>62</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO: ARTÍCULO REQUISITO</b>	<b>70</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	<b>F</b>	NHBE	<b>Z</b>
AIF	FGR1	NK	ZEBRA
ALK	<b>G</b>	NSCLC	
APAF1	GST	<b>O</b>	
APCs	<b>H</b>	OMS	$\Delta$ Np63 $\alpha$
ATPasas	HER2	<b>P</b>	
<b>C</b>	HMGB1	P73	
CCL21	HMGB2	PDGFRA	
CCL9	HMGB3	PD-L2	
CCR7	HOXD9	PTPCP	
CD80	HSPs	<b>R</b>	
CD83	HTR2	RB	
CD86	HTRA2	RECIST	
CI50	<b>I</b>	RNA <sub>m</sub>	
c-JUN	IARC	ROS	
CTR1	IL-1 $\alpha$	ROS1	
CYTC	IL-1 $\beta$	<b>S</b>	
<b>D</b>	IL-8	SCLC	
DAMPs	<b>M</b>	<b>T</b>	
dATP	MAPK1	T <sub>c</sub>	
DCs	MHC	TGF- $\beta$	
DIABLO	MIP-1 $\alpha$	Th	
DNA	MIP-1 $\beta$	TLR-4	
DYRK1B	MMP-9	TNF- $\alpha$	
<b>E</b>	MOMP	TP53	
EGFR	MyD88		
ENDOG	<b>N</b>		
	NER		



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de carcinógenos de acuerdo a la IARC	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación y características de algunos de los compuestos citotóxicos usados comúnmente en contra de neoplasias	9
<b>Fig. 1.</b> Estructura de la proteína HMGB1	18
<b>Fig. 2</b> Funciones nucleares y extracelulares de HMGB1	20
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación de las biopsias	37
<b>Fig. 3.</b> Distribución de HMGB1 en las líneas celulares de adenocarcinoma	43
<b>Fig. 4. (A)</b> Expresión relativa del mRNA para HMGB1, RAGE y TLR-4 en las líneas de adenocarcinoma pulmonar <b>(B)</b> Efecto del tratamiento de cisplatino en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar <b>(C)</b> Morfología tipo apoptosis en las células susceptibles a cisplatino <b>(D)</b> Relocalización citoplasma-núcleo de la HMGB1 en las líneas resistentes al cisplatino	46
<b>Fig. 5.</b> Localización de HMGB1 en carcinomas pulmonares	49
<b>Tabla 3.</b> Características de los pacientes con adenocarcinoma	50
<b>Fig. 7.</b> Concentración de HMGB1 durante el tratamiento	51
<b>Tabla 4.</b> Características de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar	52
<b>Tabla 5.</b> Tabla de contingencia para comportamiento de HMGB1 y RECIST	53
<b>Fig. 8.</b> Gráfica de Kaplan-Meier, sobrevida total en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar	54
<b>Tabla 6.</b> Modelo de regresión de Cox	55

## RESUMEN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo, y el adenocarcinoma de pulmonar es el tipo histológico más frecuente de los carcinomas pulmonares de células no pequeñas. El diagnóstico del cáncer de pulmón se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad por lo que la terapia es solo paliativa. La quimioterapia basada en cisplatino es el actual tratamiento estándar. Durante la muerte de células tumorales inducida por varios fármacos citotóxicos, algunas moléculas intracelulares son relocalizadas o secretadas. Estas moléculas se denominan patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), y uno de los DAMPS es la proteína High Mobility Group Box 1 (HMGB1). Varios DAMPs están siendo identificados como biomarcadores potenciales asociados con la respuesta al tratamiento. En este trabajo se estudió la distribución HMGB1 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón y en pacientes con adenocarcinoma de pulmonar tratados con cisplatino la concentración sérica de HMGB1 pudiera ser un biomarcador asociado con la sobrevida total. Nuestros resultados indican que las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón tienen una localización citoplasmática o distribución núcleo/citoplasma de la molécula HMGB1. El cisplatino indujo la muerte celular en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, lo que lleva a la liberación de HMGB1. Los pacientes con adenocarcinoma pulmonar tratados con cisplatino que mostraron durante el tratamiento, un aumento de la HMGB1 en sangre presentaron una mayor sobrevida. Nuestros resultados sugieren que la HMGB1 puede ser un marcador asociado a la repuesta del tratamiento con cisplatino en pacientes con adenocarcinoma pulmonar.

## **ABSTRACT**

The more prevalent histological subtype of non-small cell lung carcinoma is the adenocarcinoma. Treatment for this histological subtype with no EGFR mutations remains in platinum-based chemotherapy. High mobility group box 1 (HMGB1) is an essential activator of cellular response to genotoxicity induced by cisplatin. HMGB1 plays a dual role, some reports indicates that HMGB1 binds to cisplatin-DNA-adduct favoring DNA repair and chemoresistance. In contrast, other reports show that cell death induced by platinum-based compounds releases HMGB1 for stimulating the anti-tumor immune response. In the cohort of lung adenocarcinoma patients, plasma HMGB1 concentrations previous and during treatment were quantified and fluctuations were associated with overall survival. HMGB1 in plasma of 100 lung adenocarcinoma patients was quantified by ELISA and was associated with overall survival. In cisplatin-treated patients, according to HMGB1 plasma concentrations, four distinct behavioral profiles were detected. The patient group that initially increase but after decrease HMGB1 was associated with poor overall survival (os) (median os=10 months) compare to other groups. According to overall survival, a significance difference between the group with poor overall survival and the group that always increase HMGB1 during cisplatin treatment (median os=15 months) were found (logrank test p-value=0.006). The data suggest that, during conventional lung cancer treatment, level of HMGB1 associate to overall survival. These findings suggest that in addition to clinical and radiological evaluations in lung adenocarcinoma patients, HMGB1 quantification might be translated into clinical practice as a biomarker associated with overall survival.

# INTRODUCCIÓN

## *CÁNCER*

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una división celular descontrolada, además de que las células adquieren la capacidad de invadir otros tejidos y de diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y linfático. Hay más de 200 diferentes enfermedades circunscritas en el cáncer. En general, los principales tipos de cáncer se pueden agrupar en [1]:

- **Carcinomas:** Este cáncer que se origina en los epitelios, que son tejidos que revisten o cubren los órganos internos. Hay varios subtipos de carcinoma, entre ellos, el adenocarcinoma, el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células de transición.
- **Sarcoma:** Su origen son las células que constituyen el tejido conectivo como el hueso, el cartílago, la grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.
- **Leucemias:** Son tumores que se originan de las células que constituyen la médula ósea y se producen grandes cantidades de células sanguíneas anormales.
- **Linfomas y mielomas:** Son tumores cuyo origen son las células del sistema inmunitario.
- **Cánceres del sistema nervioso central:** Tumores que se originan en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

## ***DESARROLLO DE UNA NEOPLASIA***

Una neoplasia es el resultado de un proceso de múltiples fases que se desarrolla a lo largo de varios años. Este proceso llamado carcinogénesis se divide en las siguientes etapas: iniciación, promoción y progresión. En modelos animales experimentales, los procesos de carcinogénesis controlada han permitido conocer y analizar las diferentes etapas, e inclusive distinguir entre los compuestos que tienen la capacidad de iniciar un tumor de aquellos que pueden promover el desarrollo de una neoplasia. En estos estudios se ha comprobado que los carcinógenos iniciadores son mutagénicos y los agentes promotores actúan facilitando la expansión de las células que previamente alteraron su DNA. En los humanos ha sido difícil dilucidar el espectro de acción de los carcinógenos debido a la variabilidad genética que existe en la población, por lo que los carcinógenos potencialmente peligrosos para los humanos se han identificado a través de datos epidemiológicos. Los carcinógenos que producen tumores en humanos son clasificados en varios grupos de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) y se enlistan en la Tabla 1 [2].

Tabla 1. Clasificación de carcinógenos de acuerdo a la IARC.

Grupo	Definición	Ejemplos
1	El agente es carcinógeno en humanos.	Arsénico, cadmio, benceno, radiación ionizante, virus del papiloma humano (variantes 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), <i>Helicobacter pylori</i> , virus de hepatitis B y C, Humo del cigarro (tabaquismo activo y pasivo), etc.
2A	El agente es probablemente carcinógeno en humanos.	Acrilamida, esteroides anabólicos, humo de leña, cloranfenicol, cisplatino, cobalto, emisiones producidas por freír aceite a altas temperaturas, papiloma virus tipo 68
2B	El agente es posiblemente carcinógeno en humanos.	Aflatoxina M1, aramita (insecticida), carbazol, carbón, cloroformo, colorantes (rojo ácido 114, rojo básico 9, azul directo 15, solventes para lavado en seco, etc.
3	El agente es no clasificable como carcinógeno en humanos.	Solventes derivados del petróleo, prednisona, pulpa y manufactura del papel, implantes quirúrgicos: materiales de polímeros orgánicos, implantes ortopédicos, marcapasos, implantes mamarios de silicona, etc.

## ***CARCINOMAS PULMONARES***

En el tracto respiratorio pueden desarrollarse una gran variedad de tumores, siendo los más importantes por su alta frecuencia los carcinomas pulmonares [3]. El cáncer de pulmón es un importante problema de salud pública a nivel mundial. En México ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad. El cáncer de pulmón se divide en dos tipos principales: el carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) de origen neuroendócrino y el carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés) que es el tipo de mayor frecuencia [4, 5]. Este último grupo se divide a su vez en 3 tipos histológicos de carcinomas: carcinoma epidermoide, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma.

Desafortunadamente, los síntomas generados por el carcinoma pulmonar son inespecíficos y se presentan frecuentemente en estadios avanzados de la enfermedad lo que retrasa su diagnóstico temprano [6] [7]

Para los pacientes con NSCLC, el factor pronóstico más importante es el *estadio* del tumor (I, II, III y IV) que está definido por una serie de variables clínicas y que determina el tipo de tratamiento. Para los carcinomas pulmonares, el sistema usado de estadificación es el TNM que se basa en el tamaño o la extensión (alcance) del tumor primario (T); si las células cancerosas se han diseminado a los ganglios linfáticos (N) cercanos (regionales); y si ha ocurrido metástasis (M), o diseminación del cáncer a otras partes del cuerpo. Los pacientes en estadios IA y IB tienen aproximadamente 65% de sobrevida a cinco años. Los pacientes con estadios IIA y IIB tienen una sobrevida del 41% a 5 años. Los pacientes con estadios IIIA tienen una sobrevida del 19% a 5 años; mientras que los pacientes con estadios IIIB y IV, su sobrevida a 5 años es menor del 5%. La mayoría de los pacientes con carcinoma pulmonar son diagnosticados en estos últimos estadios avanzados y el tratamiento es la quimioterapia paliativa [8]. El tratamiento estándar en los pacientes con carcinoma pulmonar de primera línea consiste en la combinación de cisplatino con algún otro compuesto como son los taxanos o el etopósido [3, 9].

Actualmente además del diagnóstico histopatológico de los carcinomas pulmonares, se realiza el diagnóstico molecular principalmente en el gen para EGFR (epidermal growth factor receptor) [4]. La presencia de mutaciones de sensibilidad o resistencia en este gen determina el emplear como tratamiento inhibidores de la cinasa de tirosina como son el Gefitinib, Erlotinib y Afatinib. Aproximadamente el 40% de los adenocarcinomas pulmonares presentan estas mutaciones [5].

Durante las dos últimas décadas, el tratamiento contra el cáncer pulmonar ha mejorado sustancialmente y dependen del estadio que presente el tumor. Las opciones terapéuticas en el cáncer de pulmón incluyen:

### *CIRUGÍA*

La resección del tumor por cirugía es aún la opción más consistente y exitosa para la curación de pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar en etapas tempranas. Sin embargo, para que esta opción sea posible, el tumor debe ser completamente extirpable y el paciente debe tolerar la intervención quirúrgica. A pesar del avance tecnológico en procedimientos de menor invasividad, muchos de los pacientes son diagnosticados en etapas tardías y son mayores de edad. Estas características limitan la aplicación de este tipo de terapia [3].

### *RADIOTERAPIA*

La radiación ionizante se utiliza para eliminar células tumorales, reduciendo así el tamaño del tumor. Las innovaciones en la radioterapia permiten liberar altas dosis de radiación exclusivamente en el área del tumor, lo que lleva a una menor toxicidad. Sin embargo, la radioterapia se administra en pacientes diagnosticados en etapas tempranas lo que reduce su aplicación. Existe la posibilidad de emplear la radioterapia posterior a la resección del tumor o bien, en estados avanzados del tumor se emplea en combinación con la quimioterapia como terapia paliativa [10].



## *QUIMIOTERAPIA*

La quimioterapia se refiere al uso de compuestos químicos, solos o en combinación con otros, para eliminar a las células tumorales. Los fármacos antineoplásicos se utilizan en casos donde el tumor se encuentra diseminado por el organismo, lo cual representa aproximadamente el 70% de los pacientes diagnosticados con NSCLC. También está indicada su administración después de procesos de resección quirúrgica o en tumores con un mayor grado de malignidad como es el caso del SCLC.

Los fármacos antitumorales ejercen su función de acuerdo con su naturaleza, concentración, mecanismo de acción, así como del fenotipo y genotipo de la célula neoplásica. Dependiendo de lo anterior, la quimioterapia desencadena distintos tipos de muerte celular como son apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica, entre otros. Sin embargo, dentro del tumor se puede dar una selección de aquellas células que, a través de mutaciones, adquieren resistencia frente al fármaco antitumoral. Esto lleva a una resistencia generalizada al tratamiento quimioterapéutico. En la Tabla 2, se muestra una clasificación de los principales compuestos citotóxicos que son empleados en el tratamiento de enfermedades malignas [11].

Tabla 2. Clasificación y características de algunos de los compuestos citotóxicos usados comúnmente en contra de neoplasias *Adaptado de Zitvogel et al 2008 [12]*.

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

A pesar de la variedad de fármacos antineoplásicos existentes y los múltiples esquemas terapéuticos que se han desarrollado, su empleo en particular en el cáncer de pulmón no se ha presentado con el éxito esperado, cuando se compara con otros tipos de neoplasias. Como ya se mencionó, recientemente se han identificado genes que se encuentran mutados en una proporción significativa de pacientes con cáncer pulmonar. Gracias a esto, se han desarrollado moléculas inhibitorias o anticuerpos monoclonales que bloquean la acción de proteínas mutadas con funciones protumorales. Muchas de las terapias que se desarrollan actualmente tienen como blanco receptores con dominios de unión a cinasas de tirosina (por ejemplo: ALK, ROS1, EGFR, HER2, FGFR1 y

PDGFRA) o a proteínas involucradas en sus vías de señalización como: RAS-RAF-MAPK y PI3K-AKT.

Sin embargo, aun con este tipo de terapia, no se ha observado un incremento en la supervivencia de los pacientes con cáncer pulmonar, por lo que se abre la posibilidad para otras opciones en el tratamiento antitumoral. Mientras esto ocurre, la opción real de tratamiento para el cáncer pulmonar continúa siendo el cisplatino en combinación con otros compuestos, según el esquema terapéutico elegido por el médico tratante [13].

### ***CISPLATINO***

Cuando los pacientes presentan un genotipo silvestre al gen de EGFR, resistencia a los inhibidores de cinasa de tirosina o no respuesta, la quimioterapia de elección es en base de *cis*-diamin-dicloro-platino ó cisplatino. El cisplatino pertenece al grupo de los compuestos platinados. Este fármaco fue descubierto accidentalmente hace más de 40 años y continúa siendo de los más utilizados, no solo en contra del cáncer pulmonar, sino en cáncer de ovario, testículo, colorectal y de cabeza y cuello.

### ***MECANISMO DE ACCIÓN***

Se ha descrito que el cisplatino se incorpora a la célula a través de la proteína transportadora del cobre 1 (CTR1). Una vez en el citoplasma, el cisplatino sufre una hidrólisis debido a la baja concentración de iones cloruro en comparación con el medio extracelular. Esta modificación vuelve al cisplatino altamente reactivo, por lo que se une a varias especies nucleofílicas tanto en el

citoplasma como en el núcleo celular. Es en este último, donde se une a bases purínicas del DNA en su sitio N7, formando intra e intercruzamientos conocidos como aductos. Estos aductos pueden repararse vía la maquinaria de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER). Si la cantidad de aductos es masiva, éstos activarán una serie de proteínas pro-apoptóticas (principalmente la proteína supresora de tumor p53) las cuales provocarán la muerte celular. Es importante señalar que el tipo de muerte por el que la célula tumoral sucumbe depende de: i) la concentración de cisplatino a la que es expuesta, iii) la fase del ciclo celular en que se encuentre, así como iii) la estirpe celular del tumor [14, 15].

Por otro lado, se ha reportado que el cisplatino puede tener un efecto benéfico para el sistema inmunológico. Se ha descrito que este fármaco disminuye la expresión del ligando de muerte programada 2 (PD-L2) en linfocitos T, lo que evita la muerte de estas células. En células tumorales, que no mueren por cisplatino, el tratamiento aumenta la expresión de moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), así como la permeabilidad a la granzima B contenida en los gránulos de las células NK y Tc. Esto permite que la célula tumoral sea reconocida y destruida por el sistema inmunológico [16].

### *VÍAS DE RESISTENCIA*

Generalmente, el cisplatino induce una recuperación terapéutica inicial asociada con la estabilización de la enfermedad. Sin embargo, parte de los pacientes con cáncer de pulmón son intrínsecamente resistentes a la terapia con cisplatino, e incluso, los pacientes originalmente sensibles eventualmente desarrollan quimioresistencia [16].

Los factores que se relacionan con la resistencia del tumor al cisplatino se clasifican en cuatro categorías [16]:

- **Resistencia antes del blanco.-** Incluye una disminución en la expresión de la proteína transportadora del cobre (CTR1) involucrada en la entrada del cisplatino a la célula, el incremento de algunas ATPasas que aumentan el flujo de salida del fármaco y la sobreexpresión de proteínas como el glutatión, la GST y las metalotioneinas, involucradas en la inactivación del cisplatino [17].
- **Resistencia en el blanco.-** Involucra el aumento en la capacidad de la vía de reparación NER, el aumento en la eficiencia del complejo de recombinación homóloga y una disminución en la expresión de proteínas de unión al cisplatino [17].
- **Resistencia después del blanco.-** Mutaciones en genes involucrados en la vía de señalización celular pro-apoptótica como TP53,  $\Delta Np63\alpha$ , MAPK1, c-JUN, entre otros [17].
- **Resistencia independiente del blanco.-** Alteraciones en proteínas cuyas funciones afecten indirectamente la citotoxicidad del cisplatino dentro de la célula como HER2, DYRK1B y el fenómeno de la autofagia [17].

Como se mencionó, el cisplatino induce la muerte de las células tumorales por lo que es importante revisar a continuación estos mecanismos.

## ***MUERTE CELULAR***

El proceso de muerte celular tiene una función central en la morfogénesis, el desarrollo, la homeostasis y en los mecanismos de defensa de organismos pluricelulares. La muerte celular se ha

estudiado durante décadas en base a sus características morfológicas. Recientemente, se ha tratado de asociar los cambios morfológicos con los eventos bioquímicos que se presentan en la célula destinada a morir [18].

### *APOPTOSIS*

La apoptosis es el proceso fisiológico, altamente regulado, en el que la célula desensambla gradualmente su estructura y degrada su DNA con el objetivo de inducir su propia muerte sin perder la integridad de la membrana. Este evento está evolutivamente conservado ya que es básico para el mantenimiento de la homeostasis en cualquier organismo multicelular. Además, la apoptosis tiene un papel defensivo debido a que favorece la eliminación y remoción de células infectadas, mutadas o dañadas [19].

El proceso de apoptosis se puede dividir en tres etapas: la primera fase es la iniciación, donde la célula recibe un estímulo inductor de muerte; la segunda etapa, llamada de ejecución, es donde ocurren la mayor parte de los cambios bioquímicos y morfológicos característicos del proceso; en la tercera fase, o de eliminación, los cuerpos apoptóticos resultantes del proceso son retirados por células fagocíticas [19].

La apoptosis presenta ciertas características morfológicas y bioquímicas que la diferencian de otros tipos de muerte celular, como son: la retracción del citoplasma, la pérdida de contacto con la matriz extracelular, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos, en cuanto a morfología se refiere. Respecto a los cambios bioquímicos, los principales son: activación de caspasas, activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, pérdida

del potencial de membrana mitocondrial y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [20].

Según el Nomenclature Committee on Cell Death 2012, se han descrito y caracterizado al menos dos vías de señalización para la ejecución de la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca [17]. Se ha propuesto que el cisplatino activa la vía intrínseca de la apoptosis debido a la presencia de una gran cantidad de blancos a nivel del citoplasma, lo que lleva a un aumento en el estrés intracelular [16].

### *VIA INTRÍNSECA*

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

requerimiento a altas temperaturas A2 (HTRA2); y iii) la inhibición de la cadena respiratoria, aumentando la producción de ROS, dando en conjunto, un circuito de amplificación de la señal apoptótica.

Por su parte, una vez liberado de la mitocondria, el CYTC citosólico participa junto con la APAF1 y el dATP en la formación del apoptosoma. Este complejo recluta y activa a la caspasa 9, la cual a su vez activa a las caspasas efectoras (-3,-6 y -7). Por otro lado, en un mecanismo independiente de caspasas, AIF y ENDOG se relocalizan en el núcleo donde median la fragmentación del DNA. Además, DIABLO y HTRA2 impiden la función anti-apoptótica de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP's) [16, 20, 21].

### ***MUERTE CELULAR POR TRATAMIENTO CITOTÓXICO Y RESPUESTA INMUNE***

En años recientes, la visión dogmática de que la terapia antitumoral tiene un efecto inmunosupresor ha sido cuestionada por varias líneas de investigación. Estos estudios indican que algunos fármacos citotóxicos, a pesar de inducir apoptosis en la célula tumoral, provocan una muerte inmunogénica [22-24]. La inmunogenicidad de las células tumorales que mueren a causa de estos fármacos antineoplásicos, está mediada por un grupo de moléculas conocidas como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs). Dentro de estos DAMPs se encuentra el grupo de las alarminas. Las alarminas son moléculas intracelulares que se encuentran ejerciendo funciones específicas en las células viables, pero adquieren una propiedad inmunoestimulante al ser liberadas de las células dañadas[21, 25]. Estas moléculas ayudan a que procesos como la captura, procesamiento y presentación de antígenos tumorales sean más eficientes en las células presentadoras de antígeno (APCs). Las alarminas también promueven la maduración de células dendríticas (DCs) y la



posterior secreción de citocinas pro-inflamatorias. Una vez que la DC madura, puede presentar antígenos tumorales a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y por presentación cruzada a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, los cuales pueden madurar y ejercer su capacidad citotóxica sobre la célula tumoral. En conjunto, las alarminas ayudan a que se induzca una respuesta inmunológica específica en contra del tumor [22]. Por lo tanto, lograr una respuesta inmunogénica causada por el tratamiento, dependerá de: i) el tipo de célula que muere, ii) el lugar donde muere, iii) el tipo de muerte que presente, iv) las alarminas que exprese o libere, v) las APCs que la fagociten y vi) la posibilidad de un reconocimiento de antígenos tumorales por parte del sistema inmunológico. Debido a que este tipo de apoptosis en la célula tumoral provoca la activación de la respuesta inmunológica a través de las alarminas, se le ha denominado apoptosis inmunogénica [12, 22, 24].

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

Para lograr que se induzca una respuesta inmunológica específica por medio de la apoptosis inmunogénica, no solo se tiene que provocar la liberación y/o expresión de DAMP's, sino también lograr su aparición de una manera espacio-temporal [26].

### ***LA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)***

La HMGB1 es una proteína nuclear tipo no-histona, miembro de la familia del grupo de proteínas de alta movilidad electroforética. Este tipo de proteínas se divide en tres subgrupos: HMGB,

HMGN, HMGA. Estos subgrupos son similares en varias características físicas; sin embargo, cada familia tiene un motivo de secuencia funcional característico, el cual es el sitio principal de interacción con el DNA. El motivo funcional de la familia HMGB es llamado HMG-Box. La familia HMGB está compuesta por HMGB1, HMGB2 y HMGB3 [27].

La HMGB1 es la más abundante de las proteínas HMGB. El gen *Hmgb1* está localizado en el cromosoma 13q12 en el humano, consiste de seis exones que codifican para una proteína de 215 aminoácidos con un peso molecular de 30 kDa, tiene dos dominios de unión al DNA (llamados caja A y caja B) y un carboxilo terminal. Estructuralmente HMGB1 consiste en tres  $\alpha$ -hélices dispuestas en forma de L. Los dominios cajas A y B poseen cada uno alrededor de 75 aminoácidos de longitud y el dominio carboxilo-terminal, que está cargado negativamente, consiste en un tramo continuo de residuos de glutamato y aspartato. Los dominios A y B de HMGB1 se unen al surco menor del DNA, el dominio A tiene una mayor afinidad por estructuras de DNA distorsionadas (aductos de DNA formados por cisplatino). En contraste, el dominio B es menos afín a estas estructuras. El dominio C-terminal modula los efectos de HMGB1 sobre el DNA, tales como la interacción de HMGB1 con las proteínas de la maquinaria de remodelación de los nucleosomas y la cromatina (Fig. 1) [27].



Fig. 1. Estructura de la proteína HMGB1. A) Dominios de la proteína HMGB1 y sus sitios de interacción con otras proteínas. B) Secuencia de aminoácidos de la proteína HMGB1 y sus sitios de modificación postraduccional.

### *FUNCIONES NUCLEARES DE HMGB1*

Cuando la célula es viable, la HMGB1 se localiza en el núcleo. Su localización nuclear se debe a que posee dos secuencias señal de localización nuclear (NLS1 y 2). La HMGB1 se encuentra asociada transitoriamente a los nucleosomas (Fig. 1 y 2), se une a estos en una manera dependiente de conformación pero independiente de secuencia. En el núcleo de las células, las funciones de HMGB1 son: participar en los procesos de replicación celular, la recombinación de genes, y la

transcripción y reparación del DNA. Tanto el dominio caja A como el B son requeridos para facilitar la unión de algunos complejos de nucleoproteínas, tal como el complejo de recombinación V(D)J y el enhanceosoma ZEBRA [28].

Además, se ha reportado que la HMGB1 dentro del núcleo de las células tumorales interactúa con un gran número de factores de transcripción, implicados en el desarrollo del cáncer, aumentando su actividad. Estos factores incluyen p53, p73, Oct-1 y 2, HoxD9, RB, miembros de la familia Rel/NF- $\kappa$ B y receptores hormonales nucleares incluyendo el receptor a estrógenos.

La molécula HMGB1 se une con gran especificidad a los aductos de cisplatino, dependiendo del grado de daño en el DNA. La HMGB1 puede facilitar la unión de la maquinaria de reparación de escisión de nucleótidos (NER), actuando como un mecanismo de resistencia al fármaco. Por otro lado, existen reportes que indican que al unirse a los aductos de DNA, HMGB1 puede bloquear el sistema NER, favoreciendo que p53 reconozca el DNA dañado y la célula pueda morir por apoptosis (Fig.2) [29].

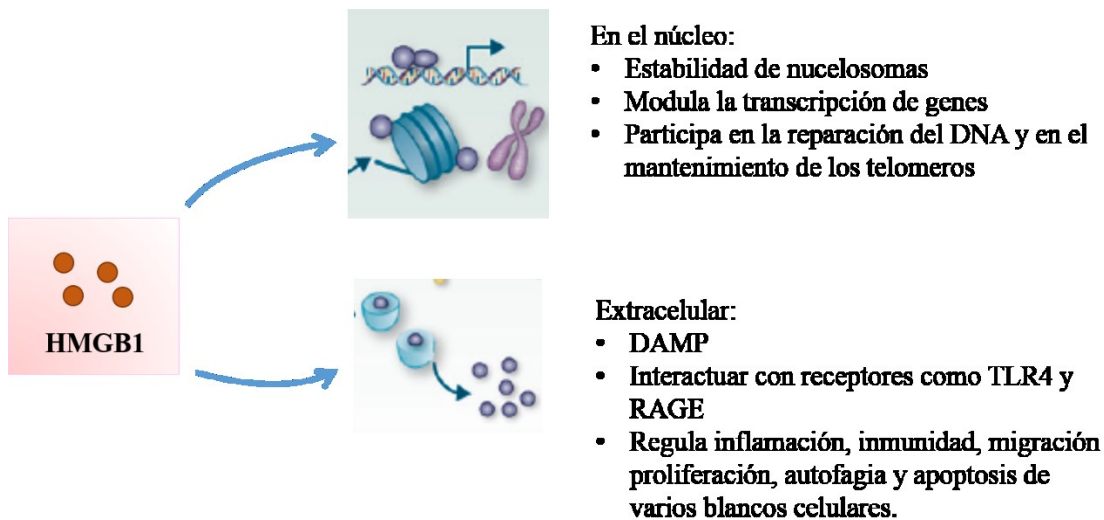


Fig. 2 Funciones nucleares y extracelulares de HMGB1.

### *FUNCIONES EXTRACELULARES DE LA MOLÉCULA HMGB1*

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

La HMGB1 puede localizarse de núcleo a citoplasma a través de 2 vías distintas (Fig. 2):

I) De forma pasiva, cuando las células mueren por necrosis, la cual está asociada con la pérdida de la compartimentalización de las membranas nuclear y citoplasmática y con la liberación de los componentes intracelulares [27, 29, 30].

II) De forma activa, los monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras, en respuesta a lipopolisacárido, TNF- $\alpha$ , o por estimulación con IL-1 $\beta$ , secretan activamente HMGB1; además de otras alarminas tales como ácido úrico, HSPs, etc [27, 31, 32].

El grado de acetilación de HMGB1 puede influir en su movilidad celular y por lo tanto en su

liberación. La proteína acetilada en las lisinas 2 y 11 (Fig. 1) puede ser liberada por las células en proceso de muerte. En contraste, la HMGB1 acetilada en todas las lisinas presentes en su secuencia (incluyendo los dominios de localización nuclear) es secretada activamente. En este caso, la proteína acetilada puede entrar a los lisosomas secretorios que son vesículas intracelulares cuyo contenido es liberado al medio extracelular. La HMGB1 puede presentar otras modificaciones postraduccionales como: la fosforilación que se asocia con facilitar el transporte núcleo/citoplasma dentro de las células; la metilación que disminuye la afinidad de HMGB1 al DNA y como consecuencia difunde pasivamente al citoplasma de los neutrófilos (Fig. 1) [28].

La HMGB1 después de ser liberada extracelularmente puede participar en procesos patológicos como son la enfermedad de Alzheimer, artritis y cáncer. La HMGB1 participa en estas patologías como una alarmina funcionando como:

I) DAMP ya que actúa como un factor quimiotáctico sobre monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, enterocitos, células pre-endoteliales y de músculo liso [31].

II) La HMGB1 puede actuar como una citocina pro-inflamatoria que activa a las células mononucleares y éstas liberan otras citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 1- $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), y la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa y beta (MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ) [31].

III) La HMGB1 puede promover la supervivencia celular, ya que se une con gran afinidad a RAGE, un receptor multiligando que activa vías de supervivencia celular como son la vía del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la proteína cinasa activada por mitógenos p38 (MAPK, por sus siglas en inglés) [31].

IV) Activa la respuesta inmune innata y adaptativa. La HMGB1 interactúa con el TLR4 presente

en las células dendríticas inmaduras (iDCs) implicadas en la presentación cruzada de antígenos a linfocitos T CD8<sup>+</sup> *in vivo* [27, 29, 31].

### ***LA HMGB1 Y SU PARTICIPACIÓN EN EL CÁNCER***

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

#### ***FUNCIONES PROTUMORALES DE HMGB1***

La progresión tumoral requiere una estrecha colaboración entre las células del tumor, las del sistema inmune y de los elementos del estroma. Datos recientes han llevado a la conclusión de que el constante crecimiento del tumor sumado a la muerte de células tumorales por falta de oxígeno y nutrientes, genera zonas de hipoxia y un estado anti-inflamatorio dado por un microambiente compuesto principalmente por IL-10 y TGF- $\beta$ , el cual activa la neo-angiogénesis e inhibe la participación de los macrófagos y linfocitos en la respuesta anti-tumoral. La continua muerte de células tumorales en estas áreas de hipoxia es acompañada por la liberación crónica de alarminas, entre estas HMGB1. La HMGB1 presente en el microambiente tumoral ejerce varios efectos incluyendo, supervivencia celular, angiogénesis, migración e invasión de las células tumorales a través de la activación del receptor RAGE presente en las células neoplásicas [33-35].

## LA HMGB1 Y LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

La cirugía, la quimioterapia y la radiación son actualmente las tres principales opciones para el tratamiento contra el cáncer. La cirugía elimina los principales nichos tumorales, mientras que la quimioterapia y la radioterapia destruyen células tumorales remanentes y circulantes a través del proceso de apoptosis. Recientemente se ha demostrado en modelos *in vitro* y modelos murinos que ciertos compuestos quimioterapéuticos, además de destruir a las células tumorales tienen la capacidad de producir un tipo de muerte celular que activa a la respuesta inmune antitumoral. Este tipo de muerte se caracteriza por la liberación y exposición, en forma aguda, de alarminas por las células tumorales susceptibles al tratamiento. Entre estas alarminas se encuentra la HMGB1 que liberada por efecto del tratamiento quimioterapéutico tiene varios efectos sobre el sistema inmune, entre los que se encuentran los siguientes [12, 23-26, 31, 36]:

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

II) Estudios recientes en modelos murinos han demostrado que la proteína HMGB1 es indispensable para los mecanismos inmunoadyuvantes de la quimioterapia, tales como el



procesamiento y presentación cruzada de antígenos provenientes de células tumorales. Dichos mecanismos no están totalmente estudiados; sin embargo, se ha demostrado que la interacción HMGB1-TLR4 previene la degradación acelerada de la carga fagocítica dentro de las iDCs, permitiendo así un óptimo procesamiento de los antígenos tumorales. Además, se ha estudiado que la presentación cruzada de antígenos derivados de células tumorales, por parte de las DC's a linfocitos T es dependiente de la interacción HMGB1-TLR4 y el adaptador MyD88.

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

IV) También se ha estudiado que la proteína HMGB1 puede incrementar la secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como, interleucina-12, IL-6, IL-1 $\alpha$ , IL-8, TNF- $\alpha$  y RANTES. La expresión de estas citocinas es dependiente de la vía MAPK p38.

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

## ANTECEDENTES

La molécula HMGB1 tiene múltiples funciones que dependen de su localización subcelular y extracelular. Debido a esto, la proteína HMGB1 tiene un rol importante en distintas condiciones patológicas, incluyendo el cáncer. Como ya se mencionó, la HMGB1 tiene una participación dual en el cáncer, ya que actúa como una molécula con actividad pro-tumoral participando en la proliferación de las células tumorales, así como en los procesos de angiogénesis, invasión y metástasis de los tumores. Por otro lado, puede tener un papel anti-tumoral, cuando es liberada al medio extracelular y actúa como DAMP durante el tratamiento con la quimioterapia y/o radioterapia [27, 29].

En los carcinomas de mama, colorectal, hepático y de testículo HMGB1 se localiza principalmente en el núcleo de las células tumorales, además de que la inmunoreactividad es mayor en el tumor que en el tejido libre de tumor. En las líneas celulares de distintos tipos de tumor, la HMGB1 puede presentar una localización en núcleo o citoplasma, lo que en la mayoría de los casos se asocia con una sobre expresión de la molécula [33].

En los carcinomas pulmonares hay pocos estudios de la localización celular de HMGB1 en biopsias de pacientes y/o líneas celulares tumorales. En estos trabajos se analiza principalmente el nivel de expresión de HMGB1 en las células tumorales y se ha encontrado que el RNAm y la proteína de HMGB1 se encuentran sobre-expresados cuando se compara con líneas de epitelio normal y tejido libre de tumor. En las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar A-549 y NCI-H23 la sobre-expresión de HMGB1 correlaciona con la sobre-expresión de la metaloproteinasa MMP-9, lo que favorece la invasión y la metástasis de las células tumorales. Esta sobre-expresión de HMGB1 se

ha asociado con el estadio del tumor, encontrando que los estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) se presenta una mayor sobre-expresión de HMGB1 que en los estadios tempranos (I y II). Además, la sobre-expresión de la molécula también se asocia con los procesos de angiogénesis en los tumores [37].

Dentro de las funciones nucleares de HMGB1 se encuentra la reparación de aductos inducidos por cisplatino. En los carcinomas pulmonares que son tratados con cisplatino, la HMGB1 tiene además una participación en la resistencia al tratamiento. En la línea celular A-549 expuesta al cisplatino se ha observado un cambio en la distribución (de citoplasma a núcleo) de HMGB1 [38]. El efecto del cisplatino en la localización o liberación de HMGB1 se ha visto en células hepáticas de ratón expuestas a daño por isquemia. En este estudio, los hepatocitos sometidos a estrés por isquemia liberan HMGB1; cuando son tratados con dosis bajas de cisplatino disminuye la liberación de HMGB1 y los autores proponen que el tratamiento puede disminuir el efecto dañino de HMGB1 en la isquemia hepática [39].

En procesos inflamatorios crónicos como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se presenta remodelación de vasos sanguíneos [35], se ha observado que la HMGB1 se localiza alrededor de los nuevos vasos sanguíneos, por lo que se le atribuye un papel importante en la angiogénesis y remodelación del tejido dañado. En otras patologías que cursan con inflamación crónica como son la rinosinusitis, el asma, la hepatitis, etc., los niveles séricos de HMGB1 se encuentran elevados cuando se comparan con los niveles séricos de sujetos sanos. En estas patologías la HMGB1 puede participar en mantener el microambiente inflamatorio [40].

En distintos tipos de cáncer se han evaluado los niveles séricos de HMGB1 encontrándose elevados en la mayoría de los casos. Cheng y colaboradores reportaron que los pacientes con cáncer hepático

sin tratamiento muestran niveles séricos de HMGB1 significativamente más elevados en comparación con los niveles séricos de pacientes con cirrosis hepática, hepatitis crónica y sujetos sanos; por lo que sugieren que el incremento de la HMGB1 en sangre puede ser un marcador útil para evaluar el estadio del tumor, además de que se asocia con mal pronóstico de la enfermedad [41]. En el carcinoma escamoso de laringe se encontró que los pacientes presentan niveles más elevados de HMGB1 que los sujetos sanos, y el incremento se asoció con una menor supervivencia [42]. En cáncer de ovario, también se detectaron niveles séricos elevados de HMGB1 en pacientes cuando se compara con pacientes que presentan enfermedad benigna de ovario y sujetos sanos. En cáncer cervical, los niveles más altos de HMGB1 se asociaron con enfermedad avanzada [43]. En mesotelioma peritoneal maligno, los niveles séricos de HMGB1 incrementados se observaron en pacientes con cáncer comparado con pacientes con asbestosis [44]. En todos estos trabajos se sugiere el empleo de HMGB1 sérica como biomarcador diagnóstico de cáncer.

En mesotelioma pulmonar se ha reportado un incremento de HMGB1 en la sangre de los pacientes con cáncer cuando comparan con sujetos expuestos a asbestos y que no desarrollaron el cáncer [44]. En cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) los incrementos de HMGB1 en sangre se relacionan con el avance de la enfermedad, el tamaño del tumor y en sujetos con posibilidad de tratamiento quirúrgico, disminuyen los niveles drásticamente después de la cirugía [45].

Por otro lado, como ya se mencionó, HMGB1 puede liberarse en los procesos de estrés y muerte celular. Ya que el tratamiento quimioterapéutico induce la muerte celular un aspecto importante a evaluar es la participación de HMGB1 como alarma.

En el caso de los carcinomas pulmonares, el fármaco citotóxico estándar para este tumor es cisplatino el cual induce aductos en el DNA. Además, ya que HMGB1 puede participar evitando,

ó bien reparando el daño al DNA, es importante determinar el papel que tenga HMGB1 durante el tratamiento. Por estas razones es necesario estudiar y analizar a la molécula HMGB1 en relación a su distribución celular y liberación al medio extracelular en líneas de adenocarcinoma pulmonar, así como la cuantificación de HMGB1 a nivel sanguíneo en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar durante el tratamiento quimioterapéutico con cisplatino y vincular ambos resultados.

## **HIPÓTESIS**

La expresión de HMGB1 por las células de adenocarcinoma pulmonar inducirá cambios en la distribución a nivel nuclear y citoplásmico en función a su actividad reparadora del daño al DNA causado por el cisplatino, las células resistentes al tratamiento localizarán HMGB1 a nivel nuclear, mientras que las células susceptibles al tratamiento liberarán HMGB1. Bajo esta premisa, los pacientes con adenocarcinoma pulmonar que respondan al tratamiento presentaran niveles elevados de HMGB1 y contrariamente, niveles bajos de HMGB1 se presentaran en pacientes con adenocarcinoma pulmonar que no respondan al tratamiento. Lo cual se reflejará en una menor sobrevida.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la distribución celular de HMGB1 en líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar y biopsias de carcinomas pulmonares así como el efecto del cisplatino en la liberación de HMGB1 en las líneas celulares y en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar cambios en su cuantificación a nivel sérico, durante la quimioterapia con cisplatino.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

### ESTUDIOS IN VITRO

- Determinar la sobre-expresión y distribución de HMGB1 en líneas celulares de cáncer pulmonar.
- Cuantificar la molécula HMGB1 en los sobrenadantes de cultivos de líneas celulares de cáncer pulmonar, en presencia y ausencia de cisplatino.

### ESTUDIOS EX VIVO

- Determinar la distribución de la molécula HMGB1 en células tumorales de biopsias de pacientes con carcinoma pulmonar sin tratamiento.

- Cuantificar la HMGB1 en los plasmas de los pacientes con cáncer pulmonar previo al tratamiento (quimioterapia) y en tiempos subsecuentes al mismo.
- Asociar cambios en la concentración sérica de HMGB1 con las variables clínicas RECIST y tiempo de sobrevida total.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***ESTUDIOS IN VITRO***

#### *DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE HMGB1 EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA PULMONAR.*

##### Cultivo celular

Se emplearon 3 líneas de adenocarcinoma pulmonar, de las cuales la línea A-549 y la línea SK-LU-1 fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC) y la línea 1.3.11 se estableció a partir de derrame pleural de un paciente con adenocarcinoma pulmonar [37, 46].

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v (*HyClone, UT, USA*). Para los ensayos de sobre-expresión de HMGB1 se empleó la línea Normal Human Bronchial Epithelial (NHBE) (Clonetics Lonza, Colonia Alemania) que crece en medio BEGM (Clonetics Lonza, Colonia Alemania). Todos los cultivos celulares se incubaron en un ambiente humidificado a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de formar una monocapa a confluencia, las células son separadas de la matriz plástica de la caja de cultivo con una mezcla de tripsina-verseno al 0.05% (*In Vitro, DF, México*) y agitación mecánica. Se determinó la viabilidad de la suspensión celular obtenida, empleando la tinción por exclusión con azul tripano (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*). El conteo y ajuste de concentración de células para los distintos ensayos se realizó empleando la cámara de Neubauer. De la suspensión celular obtenida se procedió a cultivar en: a) portaobjetos con cámara de 8 o 4



pózos (*Falcon BD, Bedford, USA*), b) placas de 96 pozos (*Nunclon, Roskilde, Denmark*) y c) botellas de 25 o 80 cm<sup>2</sup> (*Nunclon, Roskilde, Denmark*).

### *CITOTOXICIDAD EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR TRATADAS CON CISPLATINO*

#### Preparación del cisplatino

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

### *DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA 50 (CI<sub>50</sub>) DEL CISPLATINO POR TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA*

Después de que la monocapa presentara el 70-80% de confluencia en placas de 96 pozos. Las células se trataron con diferentes concentraciones de cisplatino por 24 h. Después de este tiempo, el sobrenadante del cultivo se recolectó y se almacenó. Las células se fijaron con solución de glutaraldehído al 2.5% (v/v). Después de fijar las células, se lavaron con PBS pH=7.4 y se les adicionó cristal violeta al 0.2% (w/v) por 15 minutos. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron exhaustivamente con PBS y se les adiciono ácido acético al 33% (v/v) por 20 min. Finalmente se tomó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Multiskan Ascent (*Thermo Scientific, Waltham, MA, USA*) empleando una longitud de onda de 540 nm. En cada ensayo se incluyeron

los siguientes controles: a) blanco, el cual consistía en un pozo sin células cultivadas para considerar la absorbancia de los reactivos utilizados, b) un control sin tratamiento, el cual consistió de células sin cisplatino para obtener el valor de la absorbancia del cultivo. Cada condición se realizó por triplicado. A continuación se muestra la fórmula empleada para calcular el porcentaje de mortalidad de cada condición.

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

#### *DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR POR TUNEL*

Después de obtener una monocapa celular al 70-80% de confluencia en portaobjetos con cámara de 8 pozos, las células se trataron con distintas concentraciones de cisplatino por 24 h. A continuación, las células se lavaron con PBS pH 7.4 y se fijaron con una solución de formaldehído al 3.7% (v/v) por 10 min. Se determinó la muerte celular utilizando el kit TumorTACS™ *In Situ* Apoptosis Detection Kit (*Trevigen Inc, Gaithersburgh, MD, USA*) siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante. En breve, se bloqueó la peroxidasa endógena de las células fijadas con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (v/v) en metanol por 5 min. Posteriormente, las células se trataron con la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y nucleótidos marcados con biotina a 37°C por 1 h. Finalmente, las células se incubaron con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa por 10 min a T.A. Las células TUNEL-positivas fueron reveladas usando 3,3'-diaminobencidina (DAB) más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y fueron contrateñidas con el colorante verde de metilo. De cada condición,

se tomaron micrografías en un aumento de x40 (magnificación total 400x) con un microscopio óptico Leica modelo DMLB (*Leica Geosystems St. Gallen, Switzerland*). Las imágenes se adquirieron utilizando el software LAS V.3.6.0. En cada ensayo se incluyó: i) un control negativo, consistente en células sin tratamiento para comprobar la viabilidad de las células en cultivo; ii) un control negativo de la reacción, consistente en omitir la enzima TdT para comprobar la especificidad de la reacción, iii) un control positivo, consistente en células sin tratamiento y, una vez fijadas, expuestas a un tratamiento con nucleasa por 1 h para comprobar que el sistema de detección funciona correctamente.

#### *LOCALIZACIÓN DE LA HMGB1 POR INMUNOFLUORESCENCIA*

Después de formada la monocapa celular en portaobjetos con cámara de 8 pozos, las células se trataron con distintas concentraciones de cisplatino en 100µL por distintos tiempos. Posteriormente, las células se lavaron con PBS pH 7.4 y se fijaron con etanol absoluto por 15 min. A continuación, las células se rehidrataron y fueron permeabilizadas con una solución de SDS en PBS al 1% (w/v) durante 5 min. Después de lavar, las células se incubaron con la solución bloqueadora (PBS y suero de cerdo al 2% (v/v)) durante 30 min a T.A. Las células se incubaron con el Ac policlonal de conejo anti-HMGB1 humana (*Abcam, Cambridge, UK*) toda la noche a 4°C en cámara húmeda; la dilución empleada fue 1:250 establecida como óptima. Después de lavar, las células se incubaron con el Ac anti-conejo conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (*Molecular Probes, CA, USA*) a 32°C por 1.5 h; la dilución empleada fue 1:150. A continuación, las células se lavaron y se incubaron con la solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) usando una dilución 1:150 establecida previamente como óptima.

Las laminillas se trataron con medio de montaje Vectashield (*Vector Laboratories, CA, USA*) para observarlas en un microscopio de fluorescencia marca Leica modelo DMLB. Se adquirieron las fotos con el software LAS V 3.6.0. En cada ensayo se empleó un control que consistió en omitir el Ac primario y adicionar el anticuerpo secundario.

#### *CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PARA HMGB1, RAGE Y TLR-4 POR PCR EN TIEMPO REAL*

La expresión de los genes para HMGB1, RAGE y TLR-4 fue medida por PCR en tiempo real. De las líneas A-549, SK-LU-1, 1.3.11 y de las células NHBE se extrajo el RNA total con el kit de extracción Pure Link RNA mini kit (*Ambion, CA USA*) y fue cuantificado con el equipo Nanodrop 2000 (*ThermoFisher Scientific, Whaltam, MA USA*). A partir de 2 $\mu$ g del RNA total, previamente tratado con Turbo DNAsa (*Ambion, CA USA*), se sintetizó el cDNA por transcripción reversa empleando el kit High Capacity cDNA (*Applied Biosystem, CA, USA*). El cDNA fue amplificado por PCR en tiempo real (valores de Ct de 20 a 30 ciclos) empleando el equipo 7500 Real-Time PCR systems (*Applied Biosystems, CA, USA*) con primers específicos para cada gen y sondas TaqMan (*Applied Biosystems, CA, USA*) (HMGB1 ID: 4453320, Hs 01923466\_g1, RAGE ID: 4448892, Hs 00542584\_g1, TLR-4 ID: 4453320 Hs 00152939\_ml) y el gen de  $\beta$ -actina (ID: 4331182, Hs 99999903\_m1) como gen endógeno para normalizar. Como control de referencia se emplearon las células NHBE. Todos los análisis se hicieron por triplicado, se realizaron curvas de eficiencia para asegurar la calidad de la amplificación del gen endógeno contra el gen de interés con un control de cDNA y aquellas con una pendiente igual a -3.3 en ambos genes se consideraron adecuadas. Los niveles de RNAm para cada gen de interés se calcularon por el método de expresión relativa.

### *CUANTIFICACIÓN DE LA HMGB1 POR ELISA*

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

### *ESTUDIOS EX VIVO*

#### *DETERMINACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE HMGB1 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CARCINOMA PULMONAR.*

Se recolectaron 38 biopsias en bloques parafinados de los cuales 13 fueron carcinomas epidermoides y 25 adenocarcinomas. Estos últimos se clasificaron de acuerdo a los subtipos: lepidico, papilar, acinar ó sólido (cuadro 1). De cada bloque se hicieron cortes seriales de 3µm.

Después de desparafinar y rehidratar los cortes histológicos, se realizó la recuperación de antígeno con solución amortiguadora de citratos (pH=6) en ebullición constante por 20 min. Las laminillas fueron incubadas con solución amortiguadora de fosfatos y 2% de suero de cerdo para bloquear los sitios de pegado inespecífico y posteriormente con el Ac primario policlonal anti-HMGB1 humana, (*Abcam, Cambridge, UK*) a la dilución 1:250 durante toda la noche a 4°C. Terminada la incubación, los cortes histológicos se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se incubaron con el Ac secundario anti-conejo biotinilado (*Dako, Glostrup, Denmark*) dilución óptima 1:100 por 1 hr a 32 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, las laminillas se lavaron con PBS y se incubaron por 30 min a 32°C, con el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (*Vector Laboratories, CA, USA*). Finalmente la reacción se reveló empleando el cromógeno tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (*Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA*) por 15 min Al finalizar este proceso, los cortes histológicos se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y se montaron con Entellan (*Merck Darmstadt, German*).

La localización celular de la proteína HMGB1 se estudió observando 10 campos de cada caso a un aumento de x40 usando un microscopio óptico Leica CME (*Leica Geostems, St. Gallen, Swizerland*) y las imágenes se analizaron con el software LAS V 3.6.0.

Cuadro 1. Clasificación de las biopsias.

Tipo histológico	N° de casos
Ca. epidermoide	13
Adenocarcinomas (subtipos):	25
<i>Lepidico</i>	3
<i>Papilar</i>	9
<i>Acinar</i>	13
<i>Sólido</i>	0
Total	38

## *CUANTIFICACIÓN DE HMGB1 EN EL PLASMA DE LOS PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR*

### *POBLACIÓN ESTUDIADA*

Sujetos sanos fumadores y no fumadores

En este estudio se incluyeron plasmas de 20 sujetos sanos no fumadores y 25 plasmas de sujetos fumadores pesados (índice tabáquico 20 paquetes/año). A este grupo de sujetos se les tomo una muestra de sangre, previa firma de la hoja de consentimiento informado y se les practicó una espirometria para conocer su volumen y capacidad pulmonar. Solo aquellas personas que presentaron volúmenes y capacidades pulmonares normales de acuerdo a su edad fueron incluidas en este estudio.

### *PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR*

De enero de 2010 hasta enero de 2012, 100 pacientes con adenocarcinoma pulmonar primario fueron incluidos en el presente estudio. El diagnóstico fue hecho por examen citológico ó histológico de derrames pleurales o biopsias pulmonares, respectivamente. El estadio clínico de los pacientes fue determinado de acuerdo a la clasificación TNM (Tumor, Nódulo, Metástasis). El estado general de los pacientes fue establecido a través del Karnofsky. Todos los pacientes fueron fumadores pesados (20-30 paquetes/año). Las características de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar se muestran en la tabla 3.

En el presente estudio se incluyeron solo pacientes que presentaban un genotipo silvestre para el gen EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). En base a parámetros clínicos y radiológicos, todos los pacientes incluidos en el presente estudio fueron tratados con seis ciclos de quimioterapia

consistente en cisplatino combinado con paclitaxel. Los pacientes no habían sido tratados previamente con radioterapia o quimioterapia.

Otros criterios de inclusión adicionales fueron funciones hematológicas, renales y hepáticas admisibles para recibir la quimioterapia. Los pacientes que mostraron comorbilidades (disfunción cardiopulmonar severa, arritmia no controlada, historia de isquemia al miocardio o infección activa) fueron excluidos. Todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado para la toma de sangre.

#### *COLECCIÓN DE LA MUESTRA SANGUÍNEA*

Muestras de sangre periférica fueron colectadas antes de la aplicación del primer ciclo, tercer ciclo y sexto ciclo de quimioterapia. Las muestras sanguíneas fueron tomadas con EDTA como anticoagulante, el plasma colectado fue centrifugado dos veces y filtrado con membrana con poro de 0.22  $\mu$ m. Este procedimiento fue hecho para evitar que posibles células contenidas en el plasma pudieran lisarse durante el congelamiento e incrementaran la concentración de HMGB1 en el plasma. El plasma fue inmediatamente almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización del ensayo de ELISA para la cuantificación de HMGB1.

#### *CUANTIFICACIÓN DE HMGB1 EN LAS MUESTRAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR.*

El mismo ensayo usado para la cuantificación de HMGB1 en los sobrenadantes de las líneas de adenocarcinoma pulmonar fue usado para la detección de HMGB1 en el plasma de los pacientes.



Las muestras de un mismo paciente fueron descongeladas y procesadas en la misma placa de ELISA para evitar variaciones inter-ensayo. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### *EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR*

A los pacientes con sospecha de carcinoma pulmonar se les realiza una serie de pruebas clínicas entre las que se encuentra la tomografía computarizada de tórax. Una vez hecho el diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar y si el paciente fue candidato a la quimioterapia se le realizan al menos otra tomografía para monitorear la respuesta al tratamiento que se evalúa por RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) versión 1.1. Si los pacientes presentan alguna complicación como derrame pleural, ya no se puede realizar la tomografía para el seguimiento del tratamiento. Algunas veces las tomografías de seguimiento no son tomadas con los mismos parámetros iniciales y no pueden ser empleadas para evaluar por la respuesta al tratamiento. Las que si se evaluaron por RECIST, se hizo por dos radiólogos expertos en un ensayo ciego. Dado que los pacientes se encontraban en etapas avanzadas de la enfermedad (estadios IIIb y IV), los resultados fueron clasificados como: i) respuesta parcial, que consistió en una disminución de la masa tumoral; ii) enfermedad estable, el tumor no disminuyo su masa tumoral; y iii) progresión de la enfermedad, hubo un aumento de la masa tumoral.

## *RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE HMGB1, LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y LA SOBREVIDA TOTAL*

Las concentraciones plasmáticas de HMGB1, la sobrevida total y la respuesta al tratamiento fueron evaluadas para elucidar si las fluctuaciones en los niveles de HMGB1 están asociadas con la respuesta al tratamiento. La sobrevida total de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar fue contabilizada desde el momento en que el paciente comenzó la quimioterapia paliativa hasta la fecha de fallecimiento del paciente.

### *ANÁLISIS ESTADÍSTICO*

Los datos obtenidos de las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar (DE). La prueba t de Student pareada se usó para comparar los porcentajes de la muerte celular inducida por el cisplatino en las líneas celulares empleando el software Graph Pad Prism 6. Los valores de  $p < 0.05$  fueron consideradas con significancia estadística.

Los datos de la concentración en plasma de HMGB1 obtenidos de los sujetos control y los pacientes con adenocarcinoma pulmonar, fueron expresados como la mediana y el rango intercuartil (IQR). La prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn fueron empleadas para comparar la concentración de HMGB1 en el plasma de los sujetos controles y pacientes. Las pruebas estadísticas se realizaron con software Graph Pad Prism 6.

Todos los pacientes fueron captados entre enero de 2010 hasta enero de 2012 y todos los pacientes fueron seguidos hasta diciembre de 2014. Las curvas de sobrevida fueron generadas usando la

técnica de Kaplan-Meier y las diferencias fueron analizadas empleando la prueba de Log-Rank. Para el análisis de sobrevida univariado y multivariado se usó el modelo de riesgos proporcionales de Cox, estimando los riesgos proporcionales con un intervalo de confianza al 95% con la prueba de Wald. La relación entre las fluctuaciones en la concentración de HMGB1 y la respuesta parcial, enfermedad estable o progresión fue analizada con la prueba exacta de Fisher. Los procedimientos estadísticos fueron hechos empleando el ambiente estadístico R 3.2.2 y R commander (RcmdrPlugin.EZR y RcmdrPlugin.survival) [47, 48]. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados con significancia estadística.

## **RESULTADOS**

### ***ESTUDIOS IN VITRO***

#### ***DISTRIBUCIÓN DE LA HMGB1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR***

La localización celular de HMGB1 en las líneas de adenocarcinoma pulmonar fue principalmente en el citoplasma.

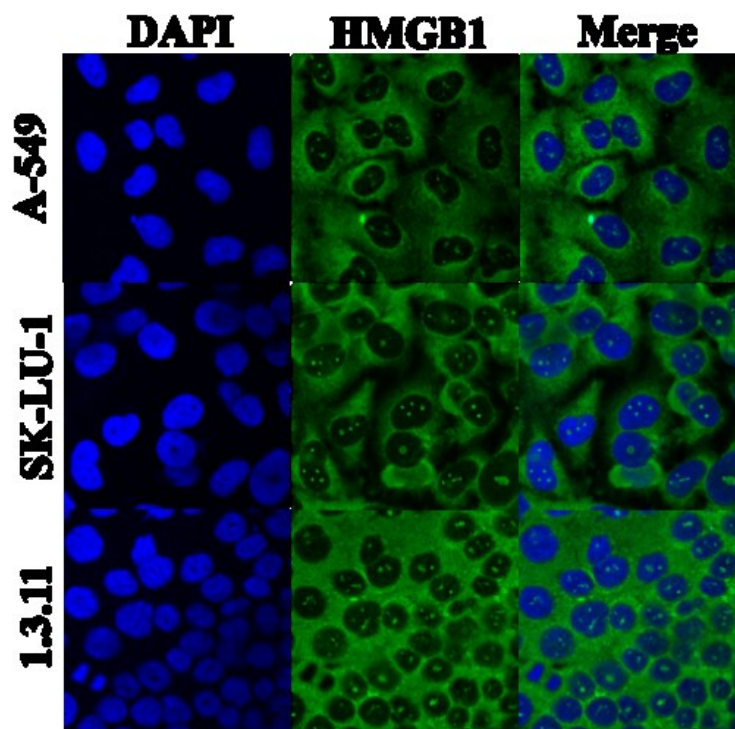


Fig.3. Distribución de HMGB1 en las líneas celulares de adenocarcinoma. En las líneas A-549, SK-LU-1 y en la 1.3.11 se observó una distribución núcleo-citoplasma de HMGB1. El DNA nuclear se observa en azul (DAPI) y la HMBG1 en verde (x100).

#### *EXPRESIÓN RELATIVA DEL RNA MENSAJERO DE HMGB1, RAGE Y TLR-4*

De las líneas celulares empleadas en este trabajo, la línea A-549 expresó casi 4 veces más RNAm para HMGB1, con respecto a las células normales epiteliales bronquiales (NHBE). En cambio las líneas 1.3.11 y SK-LU-1 de adenocarcinoma pulmonar expresaron 0.3 a 0.5 veces más mensajeros para HMGB1. Por el contrario, la expresión relativa de RAGE fue menor a 1 en la línea A-549; mientras que en la línea 1.3.11 y SK-LU-1 fue de 3 y 9 veces más que la línea NHBE. La expresión relativa del RNAm para TLR-4 fue prácticamente de cero en las líneas de adenocarcinoma pulmonar con respecto a la línea NHBE (Fig. 4A).

## *CITOTOXICIDAD EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR TRATADAS CON CISPLATINO*

Durante la cinética de tratamiento de las líneas de adenocarcinoma pulmonar con cisplatino se observaron los siguientes eventos. Las células de la línea A-549 que mostraron sensibilidad al cisplatino, exhibieron morfología de apoptosis. El mayor porcentaje de células en apoptosis se observó alrededor de las 9 horas de cultivo. A las 24 h, la concentración 20 $\mu$ M de cisplatino indujo el 50% de la muerte de las células (CI<sub>50</sub>). Mayores concentraciones de cisplatino incrementaron ligeramente el efecto citotóxico a 60%. Esta línea no alcanzó un 100% de citotoxicidad.

En la línea celular de SK-LU-1, pocas células mostraron un fenotipo apoptótico o necrótico, en los cultivos de 18-24 h con cisplatino. A concentraciones de 40  $\mu$ M o mayores, el cisplatino indujo citotoxicidad de alrededor del 30% de las células a las 24 h (Figuras 4A y 4B). La línea 1.3.11 fue la más sensible al cisplatino y mostró morfología de necrosis a las 15h de cultivo. A las 24 h, 20  $\mu$ M de cisplatino indujo la CI<sub>50</sub> y 40  $\mu$ M indujo el 100% de muerte celular (Fig. 4B). Además de observarse los cambios morfológicos asociados con la apoptosis/necrosis, se realizaron ensayos de TUNEL para corroborar apoptosis/necrosis en las líneas celulares tratadas con cisplatino (Fig. 4C). En conclusión, cada línea celular de adenocarcinoma pulmonar mostró distinta susceptibilidad al cisplatino.

## *CONCENTRACIÓN DE HMGB1 EN EL SOBRENADANTE DE LAS LÍNEAS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR*

Las líneas de adenocarcinoma que presentan una distribución núcleo-citoplasma o solo citoplasma de HMGB1, liberan constitutivamente HMGB1. La concentración basal de HMGB1 en el sobrenadante de la línea A-549 fue de 7.2 ng/ml, para la línea SK-LU-1 fue de 6.5 ng/ml y para la línea 1.3.11 fue de 4.0 ng/ml. El tratamiento con cisplatino incrementó la concentración de HMGB1 en el sobrenadante de la línea 1.3.11. En la línea A-549, la liberación de HMGB1 se incrementó en relación al porcentaje de las células muertas por efecto del cisplatino. Esta línea liberó el doble de concentración de HMGB1, lo que puede estar relacionado con que en esta línea sobre-expresó el RNAm para HMGB1. En contraste, en la línea SK-LU-1, la concentración de HMGB1 en los sobrenadantes de los cultivos tratados con cisplatino fue ligeramente mayor que en el cultivo sin cisplatino, y se observó que en las concentraciones más altas de cisplatino se disminuía la concentración de HMGB1 (Fig. 4B).

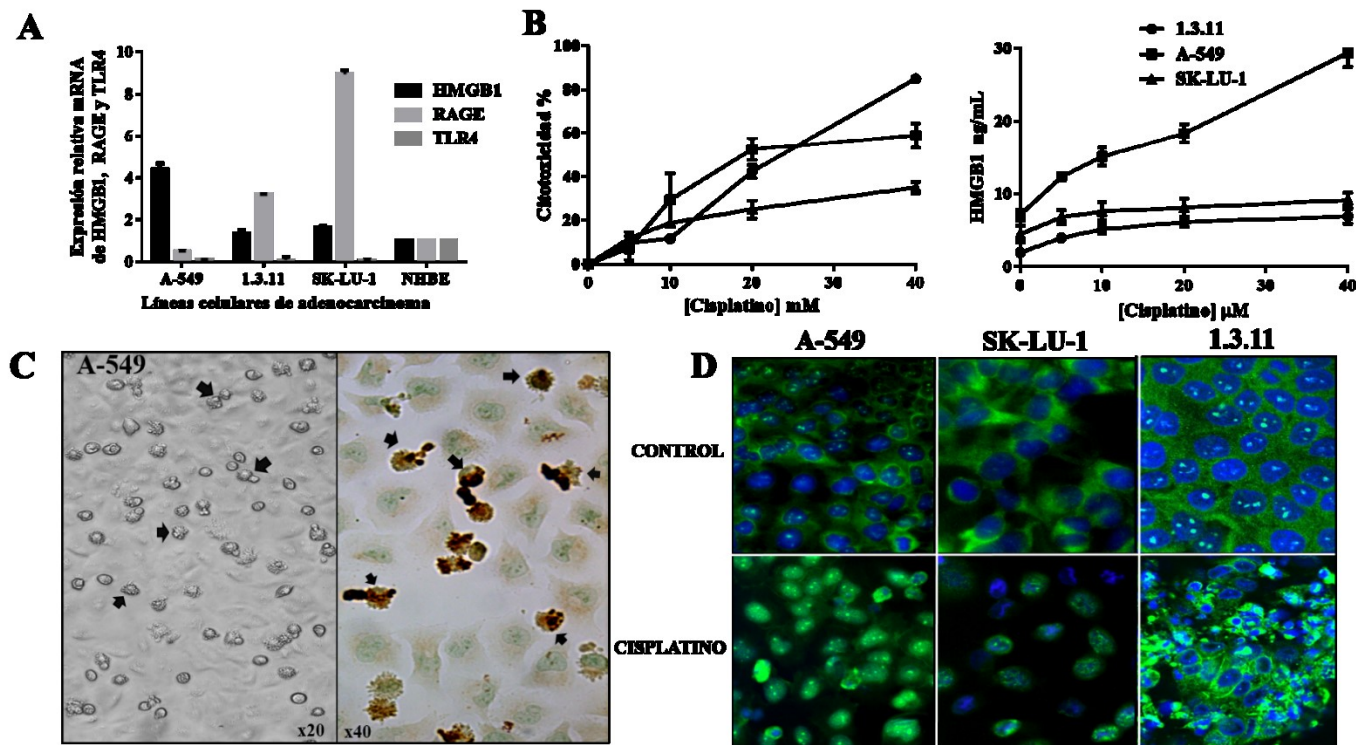


Fig. 4. (A) Expresión relativa del RNAm para HMGB1, RAGE y TLR-4 en las líneas de adenocarcinoma pulmonar, sin tratamiento, comparado con la línea NHBE. Datos provenientes de tres experimentos independientes por triplicado. (B) Efecto del tratamiento de cisplatino en las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar. Porcentajes de citotoxicidad y concentración de HMGB1 en los sobrenadantes de las líneas de adenocarcinoma pulmonar. Los datos provienen de tres experimentos independientes, cada experimento fue hecho por triplicado. (C) Morfología tipo apoptosis (cabeza de flecha) en las células susceptibles a cisplatino de la línea A-549, a las 9 h (ampliación original x20), la muerte celular fue corroborada por ensayo de TUNEL (células café, ampliación original x40). (D) Relocalización citoplasma-núcleo de la HMGB1 en las líneas resistentes al cisplatino. Cultivos a las 24 h (ampliación original x60), DNA nuclear en azul (DAPI) y HMGB1 en verde.

## *CAMBIOS EN LA DISTRIBUCIÓN DE HMGB1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR TRATADAS CON CISPLATINO*

Con la finalidad de conocer si la resistencia a la muerte que presentaron algunas de las células de las líneas A-549 y la línea celular SK-LU-1, posterior a que se expusieran al cisplatino, se relaciona a que la HMGB1 pueda interaccionar con los aductos de cisplatino, las células residuales de las líneas A-549 (~40%) y SK-LU-1 (~70%) mostraron una tinción nuclear de la HMGB1, disminuyendo la expresión de HMGB1 en el citoplasma (Fig. 4D).

## ***RESULTADOS EX VIVO***

### *DISTRIBUCIÓN CELULAR DE HMGB1 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR*

En las células del epitelio normal de la mucosa respiratoria, la molécula HMGB1 se localizó en el núcleo de las células como se esperaba y de acuerdo al papel biológico que se ha reportado y que tiene HMGB1 en las células.

En el 100% de los casos de carcinoma epidermoide, la localización de la HMGB1 fue nuclear. En cambio en los adenocarcinomas, el 32% de los casos exhibió la molécula en el núcleo, mientras en el 68% restante se presentó en el núcleo y citoplasma o únicamente en citoplasma. No se asoció la



localización de la molécula HMGB1 con algún subtipo histológico de adenocarcinoma pulmonar ver Fig.5.

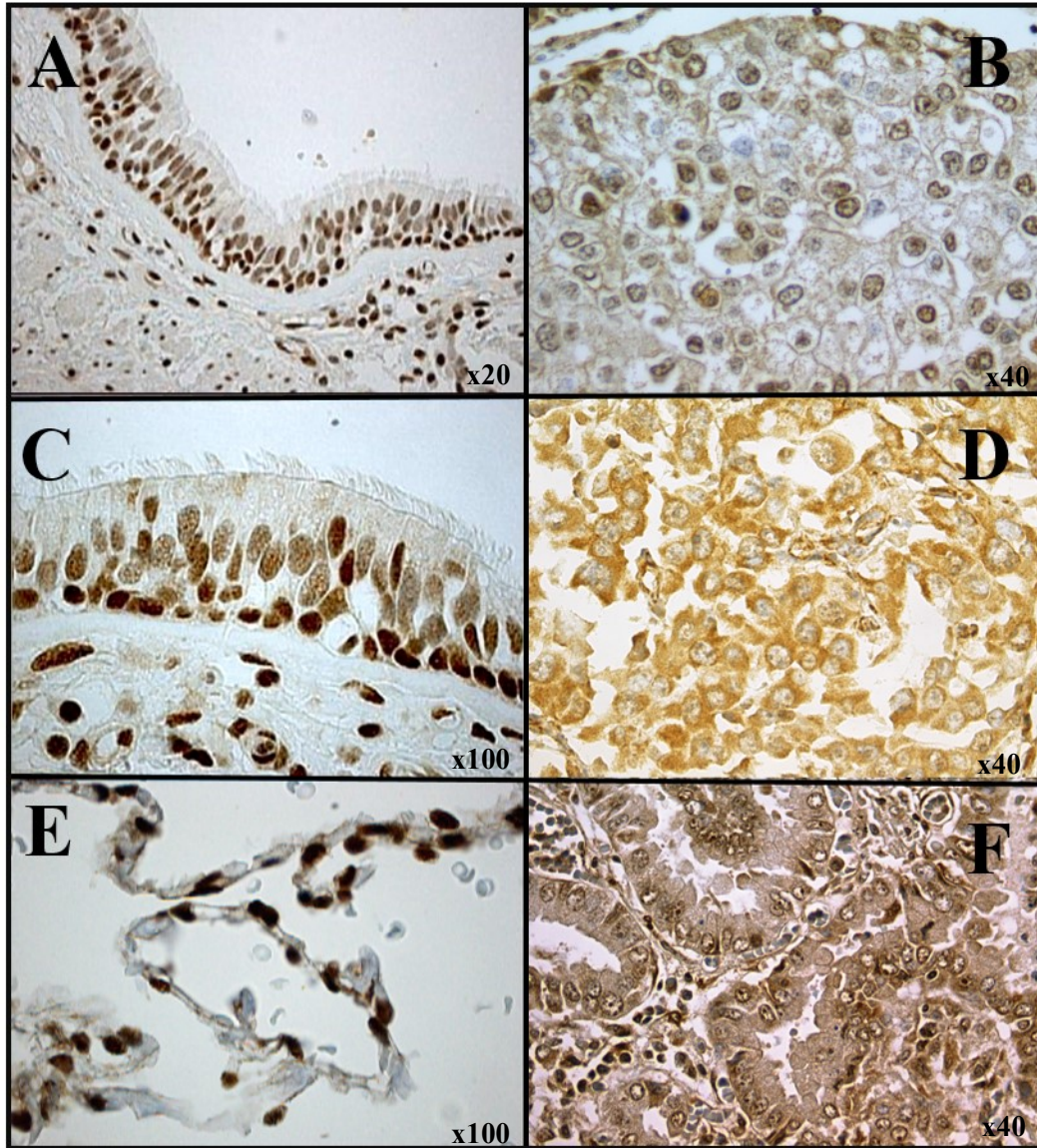


Fig. 5. Localización de HMGB1 en carcinomas pulmonares. En el epitelio bronquial (A y C) y en la zona alveolar (E) libre de neoplasia, la HMGB1 se localizó en el núcleo de las células (marca café). En los carcinomas epidermoides, la HMGB1 presentó una localización nuclear (B); mientras que en los adenocarcinomas se observó en el citoplasma (D) y en algunos casos en núcleo-citoplasma (F).

## CONCENTRACIÓN DE HMGB1 EN EL PLASMA DE LA COHORTE DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR

CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HMGB1 EN EL GRUPO DE SUJETOS SANOS FUMADORES, NO FUMADORES Y PACIENTES CON CÁNCER PREVIO AL TRATAMIENTO.

En el grupo de sujetos sanos, la concentración de HMGB1 en el plasma de los sujetos no fumadores fueron de 1.92 ng/mL (0.866 ng/mL) y en el grupo de fumadores fueron de 2.62 ng/mL (0.559 ng/mL). En los pacientes con adenocarcinoma, la concentración plasmática de HMGB1 antes de iniciar el tratamiento fue de 1.7 ng/mL (1.37 ng/mL). Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones plasmáticas de HMGB1 en los pacientes antes del tratamiento con respecto al grupo control de sujetos sanos fumadores ( $p=0.008$ ) (Fig. 6)

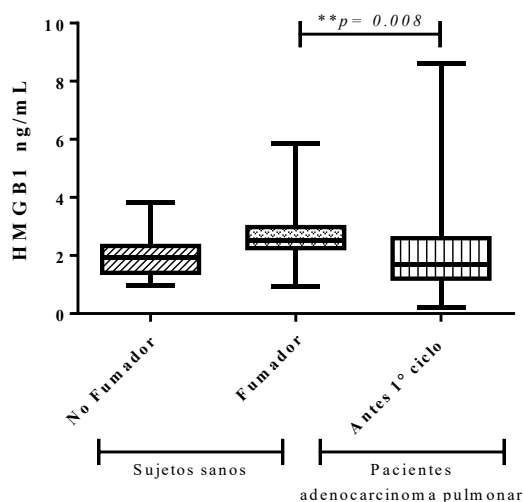


Fig. 6. Concentraciones plasmáticas de HMGB1 en los grupos control no fumador, control fumador y pacientes con adenocarcinoma pulmonar. Se indican la mediana y el rango intercuartil.

CONCENTRACIÓN DE HMGB1 EN EL PLASMA DE LA COHORTE DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR TRATADOS CON QUIMIOTERAPIA.

Las concentraciones de HMGB1 en el plasma de los pacientes con adenocarcinoma antes de iniciar el tratamiento fueron de 1.7 ng/mL (1.4 ng/mL), antes del tercer ciclo 1.8 ng/mL (1.5 ng/mL) y del sexto ciclo de quimioterapia 2.0 ng/mL (1.3 ng/mL) respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de HMGB1 entre estos ciclos de tratamiento.

Tabla 3. Características de los pacientes con adenocarcinoma

Género	Masculino/Femenino
Edad (años)	59/41
Mediana	58.5
IQR	51-66
Estadio IIIB/IV	82/18
Karnofsky,	
80	18
90	40
100	42

Sin embargo cuando se hizo un análisis más detallado de los datos se observó que las concentraciones plasmáticas de HMGB1 mostraban cambios durante el tratamiento, algunos

pacientes que mostraban un incremento en la concentración plasmática de HMGB1 entre el primero y el tercer ciclo de tratamiento y este incremento se sostenía hasta el sexto ciclo (Grupo A). Otro grupo de pacientes también presentaba un incremento de HMGB1 entre el primer ciclo y el tercer ciclo pero al sexto ciclo disminuía su concentración plasmática (Grupo B). Un grupo de pacientes presentó disminución en la concentración de HMGB1 entre el primer y al tercer ciclo pero después presentó incremento de HMGB1 (Grupo C). Por último, un grupo de pacientes mostró una disminución de HMGB1 en plasma durante todo el tratamiento con respecto a la medición inicial de la proteína (primer ciclo). La concentración de HMGB1 entre el primer ciclo y el sexto ciclo es estadísticamente diferente cuando se ajusta por el comportamiento de HMGB1 en los distintos ciclos de tratamiento (Fig. 7).

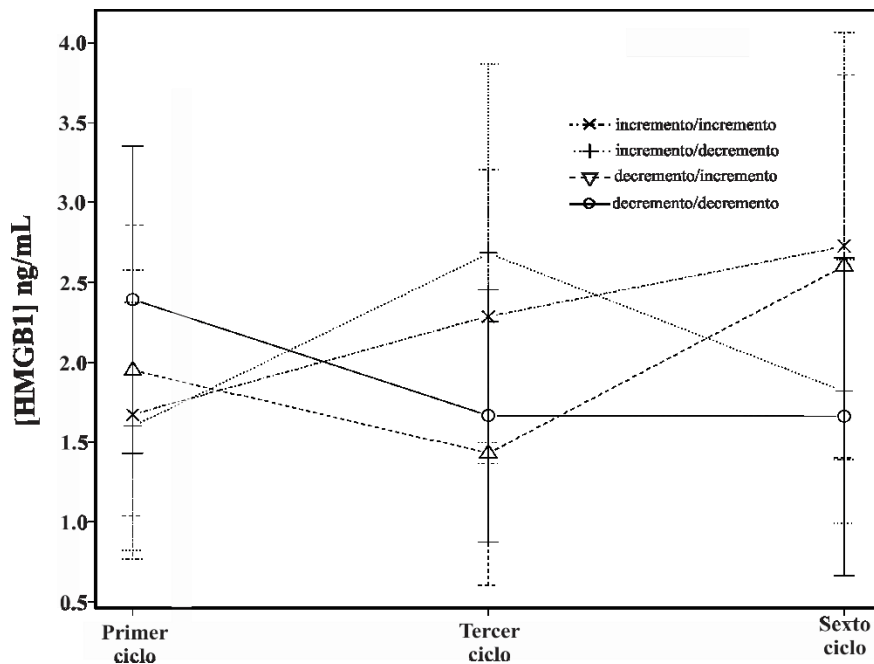


Fig.7. Gráfica de medias. Concentración de HMGB1 durante el tratamiento. Las concentraciones de HMGB1 en el primer ciclo y el sexto ciclo son estadísticamente diferentes. Prueba de ANOVA para muestras repetidas  $p=0.0018$

Tabla 4. Características de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar de acuerdo al comportamiento de HMGB1 durante el tratamiento: incremento/incremento (Grupo A), incremento/decremento (Grupo B), decremento/incremento (Grupo C), decremento/decremento (Grupo D) de HMGB1 en plasma durante el tratamiento.

	<b>Group A</b>	<b>Group B</b>	<b>Group C</b>	<b>Group D</b>
Género Masculino/femenino	16/15	9/7	14/7	20/12
Edad (años) Mediana IQR	55 (13.0)	58 (13.5)	61 (23.5)	61 (14.5)
Estadio IIIB/IV	29/2	14/2	17/4	22/10
Karnofsky, 80/90/100	2/14/15	2/6/8	4/10/7	10/10/12
HMGB1( ng/mL) antes:				
Primer ciclo (IQR)	1.5 (1.2)	1.2 (1.0)	1.8 (1.2)	2.2 (1.4)
Tercer ciclo (IQR)	2.1 (1.3)	2.2 (1.9)	1.2 (1.0)	1.5 (1.1)
Sexto ciclo (IQR)	2.3 (1.4)	1.8 (1.3)	2.4 (1.0)	1.4 (1.3)

#### CONCENTRACIÓN DE HMGB1 EN PLASMA DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR Y SU RELACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y LA SOBREVIVENCIA TOTAL

Como se observaron cambios estadísticamente diferentes en la concentración de HMGB1 entre los distintos ciclos de tratamiento, se evaluaron con respecto a la respuesta clínica en los pacientes.

Como ya se mencionó, debido a distintas razones clínicas, de los 100 pacientes totales a los que se les midió HMGB1 durante el tratamiento, solo 68 se evaluaron por RECIST. En la tabla 5 podemos observar que la respuesta al tratamiento (RECIST) tiene correlación positiva con el comportamiento de HMGB1.

Tabla 5. Tabla de contingencia para comportamiento de HMGB1 y RECIST

		R E C I S T		
		Respuesta parcial	Enfermedad estable	Progresión
Comportamiento HMGB1	Grupo A	0	19	9
	Grupo B	2	2	8
	Grupo C	0	10	2
	Grupo D	1	7	8

Prueba exacta de Fisher p-value = 0.00527

Se empleó la prueba exacta de Fisher para estimar la asociación entre comportamiento de la concentración plasmática de HMGB1 durante el tratamiento y la respuesta al tratamiento evaluado por el RECIST. El resultado de la prueba nos indica que hay una relación **no** debida al azar entre el RECIST y el comportamiento de HMGB1 y que los pacientes que presentan un incremento de HMGB1 en el plasma durante el tratamiento presentan enfermedad estable/respuesta parcial.

De todos los pacientes incluidos en el estudio y se les cuantifico HMGB1 se obtuvo el dato de sobrevida total. Las curvas de sobrevida de los distintos grupos, de acuerdo al comportamiento durante el tratamiento de la concentración en plasma de HMGB1: A (incremento/incremento), B (incremento/decremento), C (decremento/incremento) y D (decremento/decremento) se observan en la Fig.8.

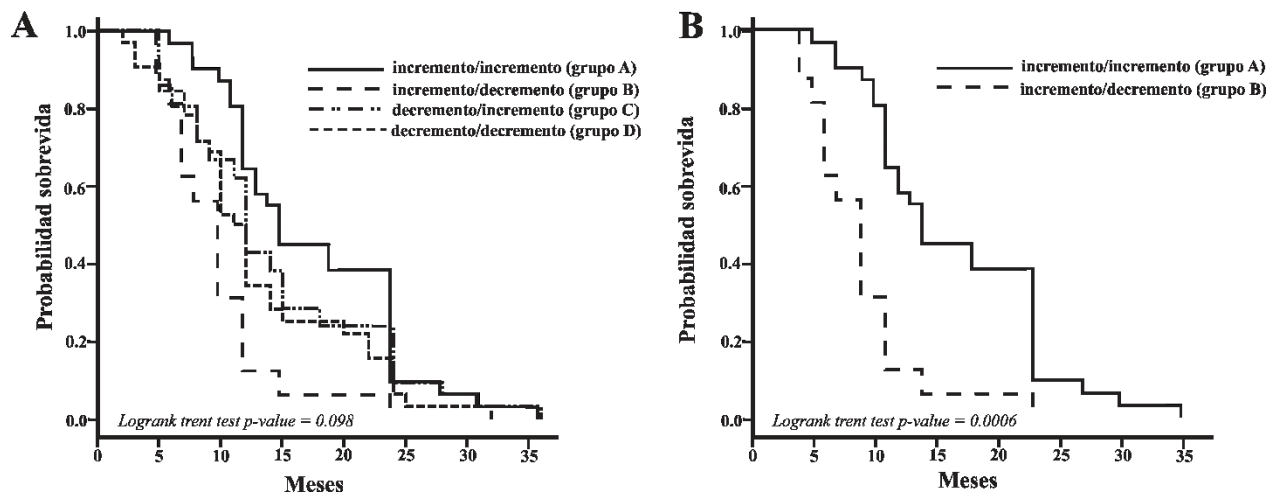


Fig. 8. Gráfica de Kaplan-Meier, sobrevida total en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar con respecto al comportamiento de HMGB1 durante el tratamiento. En el panel A se observan las curvas de sobrevida total de los grupos de pacientes que presentan múltiples comportamientos de HMGB1 durante el tratamiento. En B se presentan las gráficas de sobrevida total de los grupos de pacientes que tienen un incremento y posteriormente mantienen el incremento (grupo A) ó disminuyen la concentración de HMGB1 (grupo B).

Cuando se comparan las curvas de sobrevida de los pacientes con distintos comportamientos (grupos A, B, C y D) de HMGB1 no se encontraron diferencias significativas con la prueba de Log-Rank. En cambio, cuando se comparan las curvas de sobrevida de incremento de HMGB1 durante el tratamiento se observan diferencias entre los pacientes que presentaron un incremento constante de HMGB1 durante todo el tratamiento con cisplatino (grupo A) y los pacientes que incrementaron y después disminuyeron la concentración de HMGB1 en plasma (grupo B). Las covariables: edad, género, Karnofsky y la concentración sérica de HMGB1 durante el tratamiento; así como el factor RECIST, fueron incluidos en un modelo de regresión de Cox usando la sobrevida total de los pacientes como la variable de respuesta. En la siguiente tabla se observan la tasa de riesgo, el intervalo de confianza y la probabilidad de cada covariable y factor para el modelo

multivariado. El factor RECIST (progresión) y la covariable concentración de HMGB1 al sexto ciclo fueron estadísticamente significativos. El factor RECIST (progresión) tuvo una tasa de riesgo alta lo que indica que el resultado de RECIST (progresión) impacta negativamente sobre la sobrevida, lo cual es lógico si se observa por imagen crecimiento de la masa tumoral se esperara un incremento en el riesgo de muerte. Se empleó el método backward/forward dando como resultado que la concentración de HMGB1 al sexto ciclo es una covariable que indica que el incremento en la concentración de HMGB1 al sexto ciclo produce una reducción del riesgo de morir en un 26.5%.

Tabla 6. Modelo de regresión de Cox

Modelo univariado	Tasa de riesgo	Intervalo de confianza (95%)	<i>P value</i>
Edad	0.9919	0.9696 - 1.0150	0.4817
Género	1.5200	0.8917 - 2.5910	0.1239
Karnofsky	0.9950	0.9672 - 1.0240	0.7295
RECIST (progresión)	4.1520	2.3020 - 7.4900	0.000002 ***
RECIST (regresión)	2.4950	0.5811 - 10.7100	0.2187
HMGB1 antes de:			
Primer ciclo	0.8365	0.6005 - 1.1650	0.2909
Tercer ciclo	1.1440	0.8147 - 1.6080	0.4366
Sexto ciclo	0.7156	0.5164 - 0.9916	0.0443*
Modelo multivariado	Tasa de riesgo	Intervalo de confianza (95%)	<i>P value</i>
HMGB1 antes de:			
Sexto ciclo	0.7346	0.6056 - 0.891	0.0017350**



## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron en diversas muestras biológicas, la localización celular y la concentración en sangre de la molécula HMGB1 ya que estudiar los cambios en la distribución celular de la molécula HMGB1 en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar de manera previa y durante su tratamiento permitirá conocer su importancia como un biomarcador diagnóstico o de respuesta al tratamiento y/o como blanco terapéutico.

### *DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LA HMGB1 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR*

En NSCLC, se ha reportado una distribución nuclear de HMGB1 [49]. Nuestros resultados muestran distintos patrones de distribución subcelular de HMGB1 de acuerdo al tipo histológico de NSCLC. Los carcinomas epidermoides mostraron una la localización nuclear de HMGB1 además presentan un bajo infiltrado de células dendríticas, lo que sugiere que al localizarse en el núcleo de las células la HMGB1, no es liberada al medio extracelular y no participa como factor quimiotáctico para atraer DC's [50]. En los tumores de mama, colorectal y hepatocelular se ha reportado una localización nuclear de HMGB1 que se asocia con etapas avanzadas de la enfermedad [33].

En particular en el cáncer colorectal tratado con quimioterapia y radioterapia se ha asociado la localización nuclear de HMGB1 con la resistencia al tratamiento [51].

En cambio los adenocarcinomas pulmonares, mostraron una localización en el citoplasma de HMGB1. Esta distribución no se asoció con [50] ningún subtipo histológico de adenocarcinoma pulmonar en particular, aunque se requiere incrementar el número de muestra. De manera previa se ha reportado que los adenocarcinoma presentan sobre-expresión del mensajero de HMGB1. Esta sobre-expresión pudiera llevar a la distribución en núcleo y citoplasma observada en este estudio. Esta deslocalización de HMGB1 en los adenocarcinomas pulmonares ha sido reportada previamente en los adenocarcinomas pulmonares donde la relacionan con una sobreproducción de la proteína [37]. La sobreproducción de HMGB1 puede reflejarse en la fuerte inmunoreactividad observada en el citoplasma de las células tumorales presentes en las biopsias de adenocarcinoma pulmonar y en las líneas celulares. La línea A-549 mostró una mayor expresión relativa (sobre-expresión) de HMGB1 con respecto a las líneas SK-LU-1 y la 1.3.11. También, la línea A-549 presenta niveles basales de HMGB1 en el sobrenadante del cultivo más elevados en comparación con las otras dos líneas empleadas. Estos eventos nos sugieren que la localización en el citoplasma de HMGB1 en los adenocarcinomas pulmonares puede estar asociada con una sobre-expresión de la molécula y su liberación. En las biopsias de adenocarcinoma pulmonar que presentan a la molécula HMGB1 en el citoplasma tienen mayor infiltrado de DC's, lo que sugiere que al ser HMGB1 sobre-expresada es liberada y actúa como factor quimiotáctico para DC's.

Basándose en estos resultados, se propone que la sobre-expresión y localización subcelular de HMGB1 en el citoplasma de las células de adenocarcinoma pulmonar serían eventos responsables de la liberación de la molécula.

## *LIBERACIÓN DE HMGB1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA PULMONAR POR EFECTO DEL CISPLATINO*

Como ya se mencionó, tanto en biopsias, como en líneas de adenocarcinoma pulmonar se observó una localización de HMGB1 en el citoplasma de las células tumorales. Este evento puede estar relacionado con la liberación constitutiva de HMGB1 por las líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar que puede; a su vez, promover la invasión y la metástasis en el microambiente tumoral. [29, 31, 52]. En estas líneas celulares la expresión de RAGE, TLR2 y TLR4 los cuales son receptores para HMGB1 están siendo estudiados por nuestro grupo para confirmar la actividad protumoral de HMGB1.

Las tres líneas de adenocarcinoma pulmonar empleadas en este estudio presentan un genotipo silvestre para el gen de EGFR. Este aspecto es importante ya que la opción de tratamiento en los pacientes que presentan el genotipo silvestre para EGFR es el cisplatino o carboplatino. Por lo que estas células fueron empleadas como un modelo para estudiar el efecto del cisplatino en la biología de la molécula HMGB1 en adenocarcinomas pulmonares. En estas líneas celulares HMGB1 se observó en el citoplasma y la cantidad de HMGB1 liberada cuando las células fueron expuestas al cisplatino, mantuvo relación con la proporción de células muertas por efecto del fármaco. Chao y cols. [38] y Heijink y cols. [53] observaron cambios en la distribución celular de la proteína HMGB1 cuando la línea de adenocarcinoma pulmonar A-549 era expuesta al tratamiento por cisplatino. Ellos indican que hay un marcado cambio en la distribución de HMGB1 de citoplasma a núcleo, cuando incrementan la concentración de cisplatino. También observan una disminución

en la inmunotinción de HMGB1 en el citoplasma por lo que proponen que el reconocimiento, afinidad y unión de HMGB1 a los aductos de DNA-cisplatino son los eventos responsables del cambio en la distribución celular de HMGB1 en la línea celular A-549. Nosotros también observamos este fenómeno en la línea A-549 y en la línea SK-LU-1, esta última además fue la menos sensible al cisplatino por lo que sugerimos que el cambio de distribución celular de la HMGB1 observado en estas líneas celulares está asociado con resistencia al cisplatino. Se sabe que HMGB1 juega un papel importante en la reparación de aductos de DNA producidos por el cisplatino y también se ha reportado que participa en la resistencia a la quimioterapia de compuestos platinados [17, 54]. La re-localización de la HMGB1 al núcleo pudiera interferir con su liberación al medio extracelular. En conclusión en cada línea celular estudiada, distintas proporciones de células susceptibles y resistentes al cisplatino fueron detectadas, y el incremento en la liberación de HMGB1 estuvo relacionado con la fracción de células muertas.

#### *RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN LOS PACIENTES CON ADENOCARCINOMA PULMONAR Y SU RELACIÓN CON LA CONCENTRACIÓN DE HMGB1 Y LA SOBREVIDA TOTAL*

Cuando comparamos los niveles en sangre de HMGB1 entre los sujetos sanos no fumadores y fumadores observamos que los sujetos fumadores muestran un incremento significativo en la concentración en plasma de HMGB1. Heijink y cols., [53] han reportado que el humo de cigarro produce la muerte de los neutrófilos pulmonares y la consecuente liberación de DAMP's principalmente de HMGB1 favoreciendo la inflamación pulmonar que se presenta en los sujetos fumadores. La molécula HMGB1 se encuentra elevada a nivel sérico en pacientes que presentan otras patologías como son el EPOC y la tuberculosis [55]. En todas estas patologías la HMGB1 favorece que la inflamación crónica.

Al comparar los niveles en plasma de HMGB1 entre fumadores y los pacientes antes del primer ciclo de tratamiento encontramos que HMGB1 en plasma es menor en los pacientes con adenocarcinoma. Tomando en cuenta que el 80% de los pacientes que participaron en este trabajo son fumadores y la mayoría continua siéndolo durante el tratamiento; llama la atención esta diferencia en los niveles en sangre de HMGB1 entre estos grupos. Una de las posibles explicaciones a esta disminución en sangre de HMGB1 en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar es que la molécula puede actuar en los tumores de adenocarcinoma pulmonar de manera autócrina y/o paracrina favoreciendo la proliferación, invasión y metástasis. Jube y cols., [52] muestran que en los mesoteliomas pulmonares malignos, la HMGB1 participa como un factor imprescindible en la invasión y la metástasis, lo que podría también ocurrir en los adenocarcinomas pulmonares. Por tal motivo observamos una disminución de HMGB1 en los niveles plasmáticos de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar en comparación con los sujetos sanos fumadores.

Previamente, Shang GH, y cols., [56] estudiaron la concentración de HMGB1 en el suero de pacientes con NSCLC sin tratamiento. Encontraron que la concentración de HMGB1 incrementaba de acuerdo al estadio del tumor. La concentración de HMGB1 se redujo después de la resección del tumor. Los resultados de Shang y los resultados de este trabajo en las biopsias y líneas celulares de adenocarcinoma sugieren que el tumor produce y libera HMGB1. Evidencias adicionales sugieren que altos niveles de HMGB1 promueven la metástasis y están asociadas con un pobre pronóstico en algunos cánceres distintos al NSCLC.

Cada paciente responderá de manera particular a la quimioterapia. Algunos muestran una respuesta clínica positiva a esta terapia mientras otros presentan un progreso rápido del cáncer pulmonar. Aspectos genéticos y epigenéticos así como la heterogeneidad del tumor está implicada en esta respuesta clínica. Como ya se mencionó, observamos que en las líneas celulares resistentes al

cisplatino, HMGB1 cambia su distribución de citoplasma al núcleo de las células tumorales, lo que conlleva a una reducción en la liberación de la molécula; por lo que el decremento en los niveles plasmáticos de HMGB1 observado en algunos pacientes, puede estar relacionado a que presenten tumores con una alta proporción de células resistentes al cisplatino. Otra posible explicación para la reducción en el plasma de HMGB1 es que el tratamiento con cisplatino puede incrementar en las células tumorales la expresión de RAGE [31, 33] o de algunos receptores tipo Toll (TLR2, TLR4) [57, 58], favoreciendo la unión de la HMGB1 secretada y promoviendo la actividad protumoral de la HMGB1. De acuerdo a nuestros datos, este grupo de pacientes mostró progresión de la enfermedad (grupos C y D) (figura 9).

En contraste, el incremento en la concentración en plasma de la HMGB1 durante el tratamiento con cisplatino en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar permite suponer que la quimioterapia indujo la muerte de las células tumorales, ya que estos pacientes presentaban células tumorales susceptibles que pudieron ser eliminadas por el cisplatino y debido a los procesos de muerte celular por necrosis o apoptosis se liberó de HMGB1, lo que se asoció con una mayor supervivencia en estos pacientes (grupo A) (ver fig. 9).

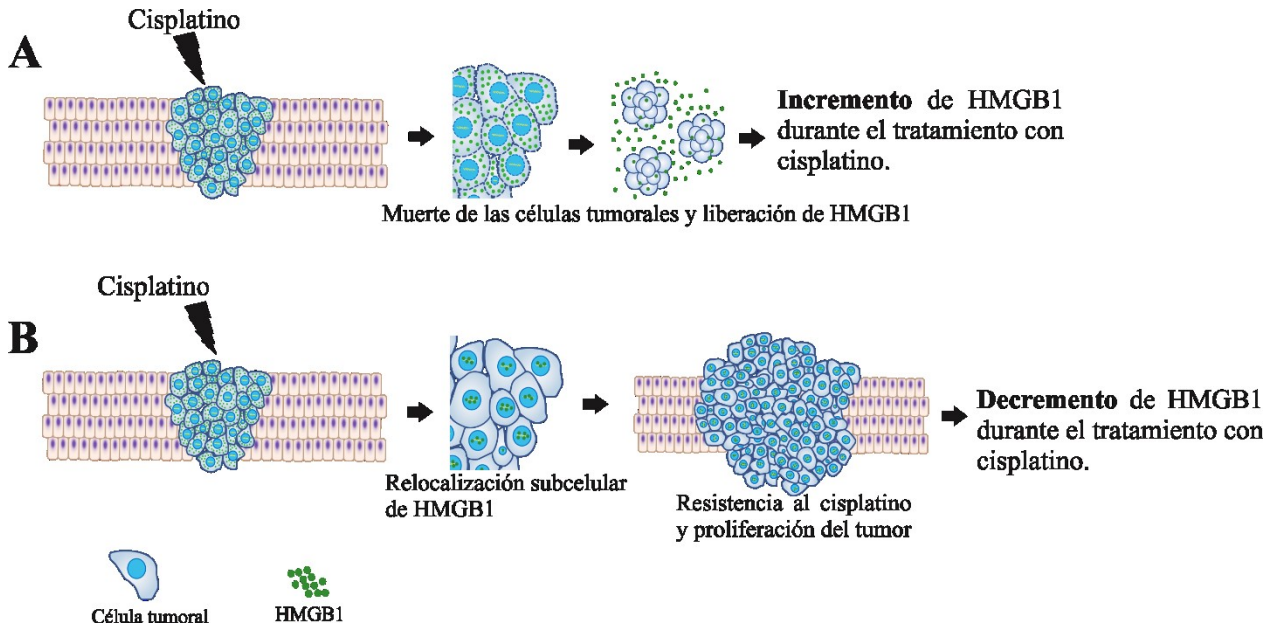


Fig. 9. Localización subcelular y relocalización de HMGB1 sin tratamiento y con tratamiento de cisplatino. (A) Cuando HMGB1 es localizada en el citoplasma de las células tumorales puede ser liberada a la muerte de las células tumorales como consecuencia del tratamiento con cisplatino. (B) La HMGB1 puede relocalizarse de citoplasma a núcleo como consecuencia del tratamiento con cisplatino; lo que causa una resistencia al cisplatino y progresión de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

En los adenocarcinomas pulmonares el tratamiento con cisplatino induce la muerte de las células susceptibles, incrementando la concentración en plasma de HMGB1. En contraste, en las células tumorales que muestran resistencia al cisplatino, se observa una re-distribución de HMGB1 del citoplasma al núcleo, probablemente involucrado en la reparación de aductos de cisplatino como un mecanismo de resistencia al fármaco. Este mecanismo de resistencia pudo reducir la cantidad de HMGB1 liberada. En pacientes, la heterogeneidad de las células malignas de la masa tumoral modifica el curso de la respuesta clínica a la quimioterapia. En los adenocarcinomas pulmonares, el éxito del tratamiento con cisplatino pudiera estar guiado por la medición de los niveles de

HMGB1. Nuestros resultados sugieren que además de las evaluaciones clínicas y radiológicas, HMGB1 puede ser empleada como un marcador sanguíneo asociado a la respuesta al tratamiento.



## LITERATURA CITADA

1. Institute NC. What is cancer? In <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>, 2014.
2. Hum IMECCR. Chemical agents and related occupations. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2012;100: 9-562.
3. Baltayiannis N, Chandrinou M, Anagnostopoulos D, Zarogoulidis P, Tsakiridis K, Mpakas A, Machairiotis N, Katsikogiannis N, Kougioumtzi I, Courcoutsakis N, Zarogoulidis K. Lung cancer surgery: an up to date. J Thorac Dis 2013;5 Suppl 4: S425-439.
4. Cooper WA LD, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. J Thorac Dis 2013;Suppl 5: 479-490.
5. Arrieta O, Cardona A, Bramuglia F, Gallo A, Campos-Parra A, Serrano S, Castro M, Avilés A, Amorin E, Kirchuk R, Cuello M, Borbolla J, Riemersma O, Becerra H, Rosell R. Genotyping non-small cell lung cancer (NSCLC) in Latin America. J Thorac Oncol. 2011;6: 1955-1959.
6. De Petris L, Crino L, Scagliotti GV, Gridelli C, Galetta D, Metro G, Novello S, Maione P, Colucci G, de Marinis F. Treatment of advanced non-small cell lung cancer. Ann Oncol 2006;17 Suppl 2: ii36-41.
7. Agustí SGSAS. Front Matter. In: Clinical Respiratory Medicine (Fourth Edition). Philadelphia: W.B. Saunders, 2012:i-iii.
8. Wang Z. Selection of chemotherapy for non-small cell lung cancer is facilitated by new therapeutic strategies. Int J Clin Exp Med 2014;7: 3833-3842.
9. Yang ZY, Liu L, Mao C, Wu XY, Huang YF, Hu XF, Tang JL. Chemotherapy with cetuximab versus chemotherapy alone for chemotherapy-naive advanced non-small cell lung cancer. Cochrane Database Syst Rev 2014;11: Cd009948.
10. Maciejczyk A, Skrzypczynska I, Janiszewska M. Lung cancer. Radiotherapy in lung cancer: Actual methods and future trends. Rep Pract Oncol Radiother 2014;19: 353-360.

11. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, Bazhenova LA, Borghaei H, Camidge DR, Cheney RT, Chirieac LR, D'Amico TA, Demmy TL, Dilling TJ, Govindan R, Grannis FW, Horn L, Jahan TM, Komaki R, Kris MG, Krug LM, Lackner RP, Lanuti M, Lilenbaum R, Lin J, Loo BW, Martins R, Otterson GA, Patel JD, Pisters KM, Reckamp K, Riely GJ, Rohren E, Schild S, Shapiro TA, Swanson SJ, Tauer K, Yang SC, Gregory K, Hughes M. Non-small cell lung cancer, version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 2014;12: 1738-1761.
12. Zitvogel L, Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of anticancer chemotherapy. *Bull Acad Natl Med* 2008;192: 1469-1487; discussion 1487-1469.
13. Lammers PE, Lovly CM, Horn L. A patient with metastatic lung adenocarcinoma harboring concurrent EGFR L858R, EGFR germline T790M, and PIK3CA mutations: the challenge of interpreting results of comprehensive mutational testing in lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2014;12: 6-11; quiz 11.
14. Vilmar A, Sørensen JB. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin: a review of current literature. *Lung Cancer* 2009;64: 131-139.
15. Wang G, Reed E, Li QQ. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep* 2004;12: 955-965.
16. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11: 215-233.
17. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;31: 1869-1883.
18. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007;14: 1237-1243.
19. Hotchkiss R, Strasser A, McDunn J, Swanson P. Cell death. *N Engl J Med* 2009;361: 1570-1583.
20. Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407: 770-776.
21. Kroemer G, Zitvogel L. Death, danger, and immunity: an infernal trio. *Immunol Rev* 2007;220: 5-7.

22. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, Schlemmer F, Adjemian S, Michaud M, Sukkurwala AQ, Menger L, Zitvogel L, Kroemer G. Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30: 61-69.
23. Garg A, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko D, Agostinis P. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1805: 53-71.
24. Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Joza N, Panaretakis T, Kepp O, Schlemmer F, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol* 2008;20: 504-511.
25. Kono K, Mimura K, Kiessling R. Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy: molecular mechanisms and a clinical translation. *Cell Death Dis* 2013;4: e688.
26. Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res* 2010;16: 3100-3104.
27. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan X, Yan Z, Sun X, Wang H, Wang Q, Tsung A, Billiar T, Zeh Hr, Lotze M, Tang D. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med* 2014;40: 1-116.
28. Andersson U, Antoine D, Tracey K. The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications. *J Intern Med* 2014;276: 420-424.
29. Kang R, Zhang Q, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clin Cancer Res* 2013;19: 4046-4057.
30. Ozturk N, Singh I, Mehta A, Braun T, Barreto G. HMGA proteins as modulators of chromatin structure during transcriptional activation. *Front Cell Dev Biol* 2014;2: 5.
31. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010;28: 367-388.
32. Tsung A, Tohme S, Billiar TR. High-mobility group box-1 in sterile inflammation. *J Intern Med* 2014;276: 425-443.
33. Kostova N ZS, Ugrinova I, Pasheva E. The expression of HMGB1 protein and its receptor RAGE in human malignant tumors. *Mol Cell Biochem*. 2010;337: 251-258.

34. Yang S, Xu L, Yang T, Wang F. High-mobility group box-1 and its role in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2014;95: 563-574.
35. Zabini D, Crnkovic S, Xu H, Tscherner M, Ghanim B, Klepetko W, Olschewski A, Kwapiszewska G, LM. M. High-mobility group box-1 induces vascular remodelling processes via c-Jun activation. *J Cell Mol Med*. 2015 Feb 28. doi: 10.1111/jcmm.12519. [Epub ahead of print] 2015.
36. Kepp O, Tesniere A, Zitvogel L, Kroemer G. The immunogenicity of tumor cell death. *Curr Opin Oncol* 2009;21: 71-76.
37. Sun KK, Ji C, Li X, Zhang L, Deng J, Zhong N, XY. W. Overexpression of high mobility group protein B1 correlates with the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells. *Mol Med Rep* 2013;7: 1678-1682.
38. Chao JC, Wan XS, Engelsberg BN, Rothblum LI, PC. B. Intracellular distribution of HMG1, HMG2 and UBF change following treatment with cisplatin. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1307: 213-219.
39. Cardinal J, Pan P, Dhupar R, Ross M, Nakao A, Lotze M, Billiar T, Geller D, A. T. Cisplatin prevents high mobility group box 1 release and is protective in a murine model of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2009;50: 565-574.
40. Bellussi L, Iosif C, Sarafoleanu C, Jianu E, Duda R, Panaitescu E, Passali F, Passali D. Are HMGB1 protein expression and secretion markers of upper airways inflammatory diseases? *J Biol Regul Homeost Agents* 2013;27: 791-804.
41. Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, Lu XF, Zhong N, Zhang ZL, Fan W, Li YQ. Serum high mobility group box chromosomal protein 1 is associated with clinicopathologic features in patients with hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2008;40: 446-452.
42. Qiu G, Li Y, Liu Z, Wang M, Ge J, X. B. Clinical value of serum HMGB1 in diagnosis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Oncol* 2014;31: 316-320.
43. Li Y, Tian J, Fu X, Chen Y, Zhang W, Yao H, Q. H. Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for ovarian cancer. *Neoplasma*. 2014;61: 579-584.
44. Tabata C, Kanemura S, Tabata R, Masachika E, Shibata E, Otsuki T, Nishizaki T, T. N. Serum HMGB1 as a diagnostic marker for malignant peritoneal mesothelioma. *J Clin Gastroenterol*. 2013;47: 684-688.

45. Takahata R OS, Tsujimoto H, Hiraki S, Kimura A, Kinoshita M, Miyazaki H, Saitoh D, Hase K. Postoperative serum concentrations of high mobility group box chromosomal protein-1 correlates to the duration of SIRS and pulmonary dysfunction following gastrointestinal surgery. *J Surg Res.* 2011;170: e135-140.
46. López-González JS, Aguilar-Cázares D, Prado-García H, Nieto-Rodríguez A, Mandoki JJ, Avila-Moreno F, Rivera RM, Chavarría-Garcés J. Lack of correlation between growth inhibition by TGF-beta and the percentage of cells expressing type II TGF-beta receptor in human non-small cell lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer* 2002;38: 149-158.
47. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013;48: 452-458.
48. Kanda Y. [Statistical analysis using freely-available "EZR (Easy R)" software]. *Rinsho Ketsueki* 2015;56: 2258-2266.
49. Shen X, Hong L, Sun H, Shi M, Song Y. The expression of high-mobility group protein box 1 correlates with the progression of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2009;22: 535-539.
50. Aguilar-Cazares D, Meneses-Flores M, Prado-Garcia H, Islas-Vazquez L, Rojo-Leon V, Romero-Garcia S, Rivera-Rosales R, Lopez-Gonzalez J. Relationship of dendritic cell density, HMGB1 expression, and tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2014;22: 105-113.
51. Hongo K KS, Tsuno NH, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Watanabe T. Immunohistochemical detection of high-mobility group box 1 correlates with resistance of preoperative chemoradiotherapy for lower rectal cancer: a retrospective study. *World J Surg Oncol.* 2015;13: 7.
52. Jube S RZ, Bianchi ME, Powers A, Wang E, Pagano I, Pass HI, Gaudino G, Carbone M, Yang H. Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 2012;72: 3290-3301.
53. Heijink IH, Pouwels SD, Leijendekker C, de Bruin HG, Zijlstra GJ, van der Vaart H, ten Hacken NH, van Oosterhout AJ, Nawijn MC, van der Toorn M. Cigarette smoke-induced damage-associated molecular pattern release from necrotic neutrophils

- triggers proinflammatory mediator release. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015;52: 554-562.
54. Ugrinova I ZS, Pashev IG, Pasheva EA. Native HMGB1 protein inhibits repair of cisplatin-damaged nucleosomes in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41: 1556-1562.
  55. Yang XM, H. Y. Expression of high mobility group box-1 in the lung tissue and serum of patients with pulmonary tuberculosis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2013;36: 497-500.
  56. Shang GH, Jia CQ, Tian H, Xiao W, Li Y, Wang AH, Dong L, Lin DJ. Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer. *Respir Med* 2009;103: 1949-1953.
  57. Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* 2007;7: 1271-1285.
  58. Luo Y, Chihara Y, Fujimoto K, Sasahira T, Kuwada M, Fujiwara R, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H. High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. *Eur J Cancer* 2013;49: 741-751.

**ANEXO: ARTÍCULO REQUISITO**

# Relationship of Dendritic Cell Density, HMGB1 Expression, and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Non-Small Cell Lung Carcinomas

*Dolores Aguilar-Cazares, MSc,\* † Manuel Meneses-Flores, MSc, † ‡  
Heriberto Prado-Garcia, PhD,\* Lorenzo Islas-Vazquez, MSc,\* Veronica Rojo-Leon, MSc,\* †  
Susana Romero-Garcia, PhD,\* Rosa M. Rivera-Rosales, MD, MSc, †  
and Jose S. Lopez-Gonzalez, PhD\**

**Abstract:** Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide and non-small cell lung carcinoma (NSCLC) is the most common type of lung carcinomas. In adenocarcinomas, the most frequent histologic type of NSCLC, dendritic cells (DCs) are localized in close contact with tumor cells, and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are observed in the peritumoral zones. In NSCLC, no studies investigating the density of intratumoral DCs and their impact on the density of TILs have been performed. In addition, the role of the alarmin high-mobility group box1 (HMGB1) in intratumoral DCs recruitment has not been analyzed. In the present study, a total of 82 cases of advanced stages of NSCLC were included. Tissue samples were obtained from biopsies and autopsies. DCs in biopsies or combinations of DCs and NK cells, CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, or CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from autopsy specimens were quantified in high power fields. Also, distribution of HMGB1 in tumor cells was detected. In lung adenocarcinomas, irrespective of subclassification, high densities of infiltrating DCs directly associated to high densities of peritumoral TILs. A 2.5-fold increase in TILs was found in specimens with high densities of infiltrating DCs compared with TILs from adenocarcinomas with low densities of infiltrating DCs. High densities of infiltrating DCs were associated with lung adenocarcinomas expressing cytoplasmic or nuclear-cytoplasmic HMGB1. Our results suggest that in adenocarcinoma patients, HMGB1 produced by tumor cells recruits DCs, which associate to an increase of TILs.

Encouraging tumor-DCs-T lymphocytes interactions should improve the quality of life and survival of NSCLC patients.

**Key Words:** non-small cell lung carcinoma (NSCLC), lung adenocarcinoma subtypes, dendritic cells (DCs), high-mobility group box1 (HMGB1), alarmin, tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulation

(*Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2014;22:105–113)

Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide and non-small cell lung carcinoma (NSCLC) is the most common type of lung carcinoma.<sup>1,2</sup> Of this group of carcinomas, adenocarcinoma is the most common histologic type. Even though options such as platinum-based chemotherapy and radiotherapy are available for lung cancer treatment, other therapeutic approaches, such as targeted therapy and immunotherapy are desirable.<sup>2–4</sup> A prerequisite to the development of efficient immunotherapy for lung cancer is an accurate characterization of inflammatory cells infiltrating these tumors.

Dendritic cells (DCs) are heterogenous professional antigen-presenting cells that play a critical role in the initiation of primary T-cell responses.<sup>5</sup> In cancer patients, several authors have found that some types of tumors have a low number of infiltrating DCs; however, other types of tumors feature high degrees of infiltration by DCs.<sup>6–9</sup> Infiltrating DCs express an immature phenotype. Although some authors have proposed that this immature stage is a tumor evasion mechanism, others contend that this phenotype is needed for the generation of tumor-specific immune responses.<sup>6,7</sup>

Tumor infiltration by DCs is associated with chemotactic molecules produced by apoptotic or necrotic tumor cells. Apoptotic or necrotic tumor cells express or release several intracellular and nuclear molecules collectively referred to as damage associated molecular patterns (DAMPs) or alarmins.<sup>10,11</sup> High-mobility group box1 (HMGB1) is a nuclear protein that is constitutively expressed in the nucleus of eukaryotic cells. Several studies have shown that extracellular HMGB1 released by necrotic cells has a potent chemotactic activity for DCs.<sup>11,12</sup>

Received for publication September 19, 2012; accepted December 22, 2012.

From the \*Department of Chronic-Degenerative Diseases; †Department of Pathology, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas; and ‡Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México.

D.A.-C. and M.M.-F. contributed equally.

Supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT) grant 102106.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: Jose S. Lopez-Gonzalez, PhD, Department of Chronic-Degenerative Diseases, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, CP 14080, Mexico City, Mexico (e-mail: slopezgonzalez@yahoo.com).

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins



In NSCLC, some reports indicate that infiltrating DCs show an intratumoral distribution.<sup>13,15</sup> Two patterns of intratumoral DCs distribution, characterized by high or low densities of immature tumor-infiltrating DCs, have been reported.<sup>14</sup> However, no significant association between an increase of apoptotic tumor cells and high densities of DCs in intratumoral areas has been identified.<sup>14</sup>

Previous studies indicate that HMGB1 is upregulated in many kinds of tumors. Probably, NSCLC are overexpressing and releasing HMGB1, which would attract DCs into tumors. Some reports indicate that the degree of DCs infiltration correlates with a better prognosis in lung cancer patients.<sup>14,15</sup>

Another type of cells found in solid cancers are tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), which are considered to be a manifestation of the host's immune response against cancer cells.<sup>16,17</sup> Some reports indicate that lung tumors have fewer TILs, suggesting that an immune response is not typically primed<sup>18,19</sup>; however, other authors indicate that the density of TILs, or CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations, correlates with better clinicopathologic features.<sup>19-22</sup> However, TILs are mainly observed in the peritumoral zones and very few are in close contact with tumor cells.

To date, no studies examining the density of intratumoral DCs or their impact on the density of TILs in NSCLC have been done. In addition, HMGB1 expressed by tumor cells, and involved in the intratumoral DCs recruitment, has not been analyzed. Data obtained from our study indicate that NSCLCs with a high density of infiltrated DCs directly associates to high densities of peritumoral TILs. Tumors with a high density of DCs have a lower proportion of CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulations compared with tumors with a low density of DCs. In addition, a high density of infiltrating DCs was associated with lung adenocarcinoma tumors expressing cytoplasmic or nuclear-cytoplasmic HMGB1. Identifying the role of high and low densities of DCs and their outcome in TILs should impact conventional therapy for NSCLC and improve future modalities of antitumor immunotherapies.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample Collection

Patients included in this study did not receive any type of anticancer therapy before sample collection. A total of 82 cases of primary NSCLC in advanced (III and IV) stages were studied. Thirty-eight tissue samples were obtained by needle biopsy; of these, 25 were adenocarcinomas and 13 were squamous-cell carcinomas. In addition, 44 lung adenocarcinoma blocks were collected from archival autopsy material. Irrespective of material origin, tumor specimens were fixed in 10% buffered formalin, processed routinely and embedded in paraffin. Tissues examined were obtained from the Department of Pathology at the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. This study was ap-

proved by the Science and Bioethical Committee and was carried out in accordance with the ethical guidelines of our institution.

From the tissue material collected, 4- to 6- $\mu$ m serial sections were cut. From each case, one of the sections was stained with hematoxylin and eosin for morphologic examination. For lung adenocarcinoma classification, the 2011 International Multidisciplinary Classification by the International Association for Study of Lung Cancer, the American Thoracic Society, and the European Respiratory Society was followed.<sup>23</sup> Histologic criteria and immunohistochemical stains according to the algorithm proposed for pathologic classification were done. Tumor contained in the biopsy specimen represented 50% to 90% of the total biopsy. When material was obtained from autopsies, a representative block containing tumor and inflammatory cells were chosen. Table 1 shows the subtypes of lung adenocarcinoma incorporated in the study.

### Immunoenzymatic Staining for Immune Cells

For the immunostaining procedure, remaining serial tissue sections were deparaffinized in xylene, rehydrated, and treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 10 minutes to block endogenous peroxidase activity. All sections were subjected to heat-induced epitope retrieval (0.01 M citrate buffer, pH 6.0) in a microwave oven. After 2 washes in phosphate buffered saline (PBS), nonspecific antibody binding was blocked with PBS containing 10% mouse serum for 30 minutes; then, sections were prepared for single-staining or double-staining immunohistochemical procedures.

Because of the limited amount of tissue obtained from biopsy specimen, only DCs identified as S-100<sup>+</sup> cells and HMGB1 distribution in tumor cells were studied in the biopsy specimens. In contrast, in tissue material obtained through autopsy, the following cells were analyzed: DCs (S-100<sup>+</sup>, CD1a<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup>), NK cells (CD57<sup>+</sup>), total T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>), and cytotoxic T lymphocyte subpopulation (CD8<sup>+</sup>). Double immunostaining was performed to simultaneously analyze the spatial distribution and densities of 2 types of immune cells in the same tissue section.

TABLE 1. Subclassification of Lung Adenocarcinomas

Tissue Material	Subtype	No. Cases	Percentage
Biopsy	Lepidic	3	12
	Papillar	9	36
	Acinar	13	52
	Solid	0	0
	Total 25		100
Autopsy	Lepidic	2	4
	Papillar	11	25
	Acinar	10	25
	Solid	21	48
	Total 44		100

### Double Immunoperoxidase Staining

To identify DCs in autopsy materials, slides were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with one of the following monoclonal antibodies (mAbs): anti-S-100 (4C4.9 clone; 1:60 dilution; Cell Marque, Hot Springs, AR), anti-CD1a (CD1a007 clone; 1:25 dilution; Abcam, Cambridge, MA), or anti-CD83 (1H4b clone; 1:50 dilution; Abcam). The following day, the tissue sections were washed in PBS and incubated with biotin-labeled anti-mouse antibody (1:500 dilution; Dako Corp.) in a humidified chamber at 32°C for 2 hours. After washing, tissue sections were incubated with StreptAB-Complex/HRP (1:250 dilution; Dako Corp.) at 32°C for 30 minutes. Horseradish peroxidase activity was developed using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrate and diaminobenzidine as chromogen (brown color; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tissue sections previously stained for DC were treated with 0.01M citrate buffer, pH 6.0 for two, 5 minutes microwave heating cycles to quench the layer of immunologic reactants used in the first staining, according to the procedure described by Ian's group.<sup>24</sup> After washing with PBS, each tissue section was treated with one of the following human antibodies: (i) NK cells, anti-CD57 (NK-1 clone; 1:50 dilution; Chemicon Int., Temecula, CA); (ii) Total T lymphocytes, mAb anti-CD3 (PS1 clone; 1:50 dilution; Biocare Medical); or (iii) CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulation, rabbit anti-CD8 (1:60 dilution; Abcam) for 2 hours. As secondary antibodies, biotin-labeled anti-mouse or anti-rabbit antibodies were used (1:500 and 1:250 dilution, respectively). Slides were incubated in a humidified chamber at 32°C for 2 hours. After washing, tissue sections were incubated with StreptABComplex/HRP. NK and T cells were revealed with VIP substrate kit for peroxidase (purple color) from Vector Laboratories (Burlingame, CA).

### Single Immunoperoxidase Staining

Slides were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with one of the following anti-human mAbs. In biopsies, DCs were identified as S-100<sup>+</sup> cells, and when sufficient tissue material was available CD1a-positive or CD83-positive DCs were also detected. In autopsies, memory T cells were identified using anti-CD45RO (UCHL-1 clone, 1:50 dilution; Chemicon Int.). The following day, tissue sections were washed in PBS and incubated with a biotin-labeled anti-mouse antibody (1:500 dilution; Dako Corp.) in a humidified chamber at 32°C for 2 hours. After washing, tissue sections were incubated with StreptAB-Complex/HRP. As described before, horseradish peroxidase activity was developed using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as the substrate and diaminobenzidine as the chromogen.

Irrespective of the staining protocol used, tissue sections were counterstained with Harris hematoxylin and mounted. Control slides were prepared using normal mouse serum instead of primary antibodies. Tonsils were always run as positive controls, for identification of each of the markers studied and for testing the reactivity of each antibody.

### HMGB1 Immunohistochemistry Staining

Distribution of HMGB1 in tumor cells was detected using rabbit polyclonal anti-HMGB1 antibody (1:500 dilution; Abcam). The single immunohistochemistry staining protocol was used, as described above. Liver tissue sections were used as positive controls for nuclear HMGB1 localization. Normal bronchial epithelia cells and inflammatory cells, present in malignant tissue, were used as an internal staining control. Tissue sections were slightly counterstained with Harris hematoxylin and mounted.

### Evaluation of Immunohistochemical Staining DCs and TILs

Cellular infiltrates were divided into 2 types according to their localization: intratumoral cells infiltrated beyond the basal membrane of the tumor cells, whereas peritumoral cells infiltrated the stroma around the nests of tumor. For each type of immune cell observed in the immunostained slide, areas containing the highest cellular density were chosen.

For lung biopsies, 3 to 5 distinct high power fields (HPFs) from each tissue section containing DCs (S100<sup>+</sup> cells) were observed using a ×40 objective and averaging for density. Detection of CD1a-positive and/or CD83-positive DCs was performed in cases where sufficient tissue material was available. In these cases, the same fields used for quantification of DCs were used for detection of CD1a<sup>+</sup> or CD83<sup>+</sup> cells. For S-100<sup>+</sup> DCs, a total of 144 HPF from the 38 biopsies included were observed.

For autopsy tissues, at least 10 distinct HPFs from each tissue section containing DCs were observed using a ×40 objective, averaging for cell density. A total of 880 HPFs were observed. According to the density of DCs, 8 cases, 4 with high DCs density and 4 with low DCs density, were selected for the study of TILs. In serial tissue sections, positive cells (using single or double immunostaining) were detected in our study. More than 240 HPFs were observed. Digital images of HPFs in the most densely infiltrated areas were acquired. HPFs were photographed with a DFC425 C color camera (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany) coupled to a Leica DMI.B light microscope and captured on a computer using Leica Application Systems v. 3.6.0 software (Leica Microsystems Inc.).

For each marker studied, positive cells were scored by 2 independent pathologists (R.M.R.R. and M.M.F.) according to Hussein's method.<sup>25</sup> In occasional cases of discrepancies in interpretation, a consensus was reached after discussion with the aid of multiheaded microscopy. Within each field, areas of necrosis, scar tissue, clusters of anthracotic pigment, and tumor-infiltrating lymph nodes were excluded from analysis.

### HMGB1

HMGB1 distribution in tumor cells from biopsied material was classified as follows: (i) nuclear, when staining was mainly observed in nuclear compartment;

(ii) cytoplasmic, when staining of HMGB1 was mainly observed in this cellular compartment; or (iii) nuclear-cytoplasmic, when staining was observed in both compartments. In the majority of cases, staining intensity was strong. Digital images of HPFs in the most densely infiltrated areas were acquired.

### Statistical Analysis

Values of cell density are expressed as the mean  $\pm$  SD. Student *t* test was performed to comparisons between groups with high and low infiltration of DCs or between TILs. Spearman correlation test was used to analyze relationship among DCs density and (i) adenocarcinomas subtypes, (ii) HMGB1 localization, or (iii) TILs. *P* values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### DCs in Tissue Specimens

In biopsied material from lung carcinomas DCs identified as S-100-positive cells were mainly observed in close contact with tumor cells. Intratumoral areas showed the highest densities of DCs, consistent with previous reports.<sup>14,19</sup> Squamous-cell carcinomas were poorly infiltrated by DCs with approximately 2 DCs/HPF (Table 2, Fig. 1A). In contrast, in adenocarcinomas, 2 patterns of intratumoral DCs densities were observed. Seventy-two percent of cases demonstrated high densities of intratumoral DCs. The remaining cases showed low densities of intratumoral DCs. No association among the patterns of DCs infiltration with the subtypes of lung adenocarcinomas were found (Figs. 1C, E and Table 2).

To determine whether DC distribution is a focal or a more general event in adenocarcinoma, the study was also performed in tissue obtained through autopsy. In autopsy material obtained from patients with diagnosis of adenocarcinoma, DC distribution was observed in 10 or more HPFs. DC densities were similar to that observed in the biopsies. High densities of intratumoral DCs were observed in 50% of the cases. Low densities of intratumoral DCs were detected in 50% of the cases (Table 2). In some cases, quantification of DCs was performed using 2 or 3 distinct blocks from the same case. In these cases, similar densities of infiltrating DCs were detected among the various blocks studied.

In the adenocarcinoma group, most of the infiltrating S100+ DCs were also stained with anti-CD1a

antibody, irrespective to the origin of the tissue used. This result indicates that the infiltrating DCs are immature, as has been reported by several groups previously in several types of carcinomas, including NSCLC.<sup>13,14</sup> In general, no CD83<sup>+</sup> DCs were observed in the areas of tissue that were examined (data not shown).

No significant differences in the density of intratumoral DCs were found between tissues obtained from biopsy and autopsy. However, for each group significant differences were found when cases with high versus low intratumoral DC infiltration were compared (Table 2). These results suggest that DC tumor infiltrations depends more on the biology of lung adenocarcinoma than the area of malignant tissue studied. In addition, the source of biological material studied did not affect the density of intratumoral DCs.

### HMGB1 Distribution and its Relationship to DCs in NSCLC

In normal lung, HMGB1 is located in the nucleus of bronchial epithelial and stromal cells (Fig. 1B'). HMGB1 was observed in the nucleus of 100% squamous-cell carcinomas and in 32% of adenocarcinomas (Fig. 1B). However, in 68% of adenocarcinomas, HMGB1 was observed mainly in the cytoplasm of tumor cells (Fig. 1D), or in both nucleus and cytoplasm of strongly stained cells (Fig. 1F). No associations among adenocarcinoma subtypes and HMGB1 tumor cell distribution were found.

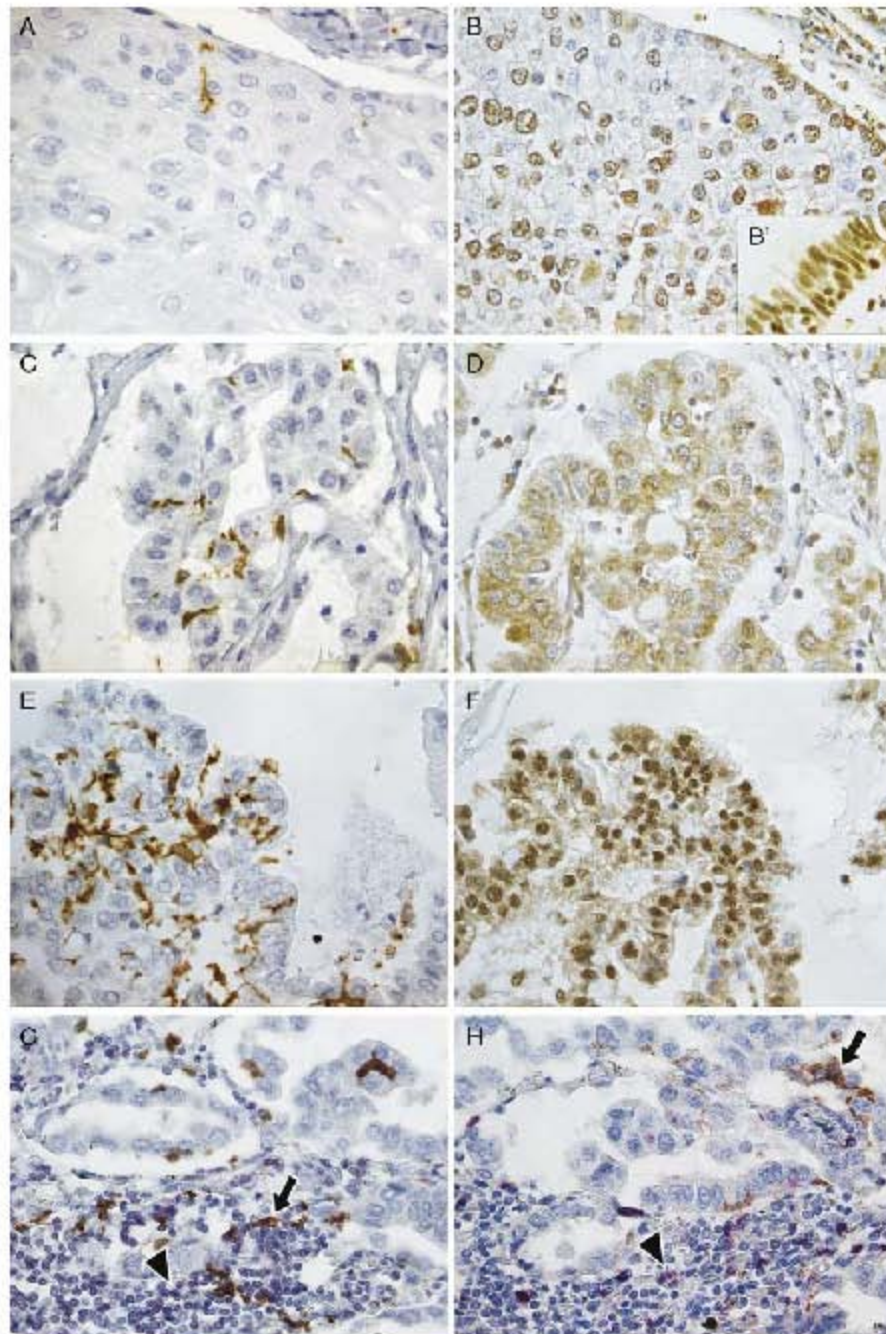
To assess whether infiltration of DCs is associated with distribution of HMGB1 staining in adenocarcinomas, the same HPFs were examined in serial biopsy tissue sections. A low density of DCs/HPF was associated with nuclear localization of HMGB1 in tumors. High DC infiltration was observed in tumors expressing mainly cytoplasmic HMGB1. But, the highest infiltration of DCs/HPF was associated with both cytoplasmic and nuclear HMGB1 staining in tumor cells (Figs. 1A–F). Thus, we found that HMGB1 redistribution in tumor cells positively correlated with intratumoral DC density ( $P = 0.025$ ). On the basis of these results, HMGB1 may be released by lung adenocarcinomas to support a high degree of DC infiltration.

As tumor cells induce defects in DCs, tumor may be hampering migration of DCs to lymph nodes to block induction of an antitumor immune response.<sup>26,27</sup> Alternatively, DCs may be phagocytizing apoptotic tumor cells and processing tumor antigens to prime T lymphocytes.<sup>5</sup> To discern in which of these 2 possibilities DCs are

TABLE 2. Density of DCs in Non-Small Cell Lung Carcinomas

Tissue Material	Histologic Type	No. Cases	Infiltration of DCs (% of Cases)	No. DCs/HPF Mean $\pm$ SD
Biopsy	Squamous-cell carcinoma	13	Low (100)	2 $\pm$ 1
	Adenocarcinoma	25	Low (28)	5 $\pm$ 3
			High (72)	21 $\pm$ 9*
Autopsy	Adenocarcinoma	44	Low (50)	4 $\pm$ 3
			High (50)	27 $\pm$ 14*

\**P*  $< 0.05$  with respect to adenocarcinomas with low DCs density.  
DCs indicates dendritic cells; HPF, high power fields.



**FIGURE 1.** Relationship of DCs density, HMGB1 expression, and TILs in NSCLC. Low number of DCs infiltrating squamous-cell carcinomas (A), and high number of DCs infiltrating acinar adenocarcinoma subtype (C, E) are shown. For HMGB1, nuclear distribution was observed in squamous-cell carcinomas (B); for comparison, nuclear HMGB1 staining in normal bronchial epithelial cells is shown (B'). Cytoplasmic (D) or nuclear-cytoplasmic (F) distributions were observed in acinar adenocarcinomas. In adenocarcinomas, high infiltration of DCs identified as S-100+ cells (G, brown, arrow) or CD1a (H, brown, arrow) and high infiltration of CD3+ T lymphocytes (G, purple, arrowhead) or low infiltration CD8+ T lymphocytes (H, purple, arrowhead) are shown. Single immunostaining in biopsies (A–F). Double immunostaining in autopsies (G, H). Original magnification  $\times 40$ . DCs indicates dendritic cells; HMGB1, high-mobility group box1; NSCLC, non-small cell lung carcinoma; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes.

participating, we decided to analyze whether there is an association between the degree of DC infiltration of lung adenocarcinoma and the density of TILs.

### TILs

Owing to the limited amount of tissue obtained from biopsies,<sup>28</sup> we decided to use autopsy material to analyze whether high or low infiltration of intratumoral DCs impacts the quantity of TILs. Because of combination of cell markers used in this study, and high number of HPFs observed on a slide, only 8 representative cases were included in this analysis. Four of these cases contained high DC density and 4 contained low DC density. With respect to NK cells, very sparse CD57<sup>+</sup> cells were observed in the peritumoral and intratumoral zones (data not shown), similar data have been reported previously.<sup>19</sup> Contrary to the observed intratumoral DC distribution, CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, and the CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulation were found to infiltrate the peritumoral zones. This has been reported previously by several authors.<sup>16,17,19,29</sup>

Tumors with high number of intratumoral DCs showed high densities of peritumoral CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. CD3<sup>+</sup> T lymphocytes were increased by approximately 2.4-fold compared with peritumoral CD3<sup>+</sup> T lymphocytes in tumors with low DC density. The CD8<sup>+</sup> T-cell subpopulation increased by 1.4-fold; however, this increase did not reach statistical significance (Table 3 and Figs. 1G, H).

In adenocarcinomas with a high density of DCs, 32% of total T cells were CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, compared with 54% in adenocarcinomas with a low density of DCs (Table 3). These results suggest that adenocarcinomas with high DC density have a higher number of CD4<sup>+</sup> T cells than the adenocarcinomas with low density of DCs.

In lung adenocarcinomas, most TILs were detected as CD45RO-positive cells (Table 3). Our results regarding the memory phenotype of TILs in adenocarcinoma agree with previous reports.<sup>30–33</sup> In primary lung adenocarcinomas containing high densities of intratumoral DCs, the density of peritumoral CD3<sup>+</sup> T lymphocytes was similar to the density of CD45RO<sup>+</sup> cells (ratio = 0.95). In contrast, in lung adenocarcinomas with a low DC density, the density of peritumoral CD3<sup>+</sup> cells was slightly higher than the density of CD45RO<sup>+</sup> cells observed in the same tissue area (ratio = 0.76; Table 3). However, these differences were not statistically significant.

### DISCUSSION

Recently, Dieu-Nosjean et al<sup>34</sup> identified tertiary lymphoid structures in the early stages of NSCLC. These structures within tumors are very heterogeneous and are composed of T and B lymphocytes and mature DCs. The cellular organization and cell distribution of these structures are reminiscent of secondary lymphoid organs, so they are referred to as tumor-induced bronchus-associated lymphoid tissue (Ti-BALT). In our study, mature CD83<sup>+</sup> DC in contact with CD3<sup>+</sup> lymphocyte infiltration were not observed. Discrepancy of our results with respect to that reported by Dieu-Nosjean et al<sup>34</sup> might be due to the different stages of NSCLC under investigation. Possibly, Ti-BALT organization is only observed in early, and not in advanced stages of NSCLC, because the tumor-stroma cell environment changes in different stages of NSCLC. The tumor microenvironment in advanced stages of NSCLC could impede Ti-BALT development. Whether this phenomenon is a fortuitous event or an evasion mechanism of NSCLC requires further investigation.

Most reports show that lung carcinoma DCs are located mainly in close contact with tumor; our results are similar to these studies.<sup>14,19</sup> The squamous-cell lung carcinomas and a low number of adenocarcinomas showed a small number of infiltrating DCs. Our results indicate that lung adenocarcinoma can be separated into 2 groups based on density of intratumoral DCs. In addition, intratumoral DCs in both groups were in an immature state. In a previous report, Kurabayashi et al<sup>14</sup> proposed that lung carcinomas could be divided into 2 groups, according to the degree of DCs infiltration; however, density values of both groups were lower than in the current study.

### DC Infiltration of Lung Adenocarcinomas and HMGB1 Distribution in Tumor Cells

Tumor infiltration by DCs is associated with chemotactic molecules produced by apoptotic or necrotic tumor cells. Several studies have shown that extracellular HMGB1 has a potent chemotactic activity for DCs.<sup>11,12</sup>

Regarding NSCLC, some authors have observed a nuclear distribution of HMGB1.<sup>35,36</sup> Our results show that NSCLC has distinct patterns of HMGB1 distribution. All of the squamous-cell carcinomas and a small number of the lung adenocarcinomas expressed nuclear HMGB1. However, most lung adenocarcinomas expressed both nuclear-cytoplasmic HMGB1 or only

TABLE 3. Relationship Between DCs and TILs in Adenocarcinomas

Intratumoral Density of DCs/HPF	Peritumoral No. Immune Cells/HPF Mean ± SD			Ratio	
	T Lymphocytes	CD8 <sup>+</sup> T-Cell Subpopulation	CD45RO <sup>+</sup> Cells	CD8/CD3	CD45RO/CD3
High (n = 4)	62 ± 43	20 ± 11	59 ± 31	0.32	0.95
Low (n = 4)	26 ± 15*	14 ± 8	20 ± 11*	0.54*	0.76

\*P < 0.05 with respect to high DCs density.

DCs indicates dendritic cells; HPF, high power field; TILs, tumor-infiltrating lymphocytes.

cytoplasmic HMGB1 and no association with adenocarcinoma subtypes were found. Similar distributions of HMGB1 have been observed in NSCLC and delocalization of this molecule may be associated with upregulation of the HMGB1 protein.<sup>35</sup> Overexpression of HMGB1 by adenocarcinoma cells might explain the strong staining in both the nucleus and cytoplasm. In addition, our preliminary observations in several lung adenocarcinoma cell lines show similar distribution patterns of HMGB1 to those observed in tumor biopsies. These cell lines constitutively release HMGB1 (unpublished data, Aguilar-Cazares D, Rojo-Leon V, Meneses-Flores M, et al.).

On the basis of our results, we propose that in patients, most lung adenocarcinomas overproduce and release HMGB1. This event is responsible for the relocalization of HMGB1 in tumor cells. Our data suggest that lung adenocarcinomas can be categorized into 2 groups: (i) tumors that maintain HMGB1 inside the nucleus and consequently have a low intratumoral DC density and (ii) tumors that overproduce HMGB1 and conceivably release this molecule, which increases intratumoral DCs infiltrations. Further studies are required to evaluate whether HMGB1 is recruiting DCs into adenocarcinomas.

### Relationship Between DC Density and Density of TILs

TILs have been proposed to reflect an ongoing host immune responses against neoplastic cells.<sup>37,38</sup> Association of TILs with tumor dimension, tumor stage, or patient survival have been examined in NSCLC.<sup>19,21,39–44</sup> In addition, the density of TILs could be predictive of the efficacy of conventional chemotherapies in patients.<sup>30</sup>

To our knowledge, studies in lung carcinomas that associate the degree of infiltrating DCs to the density of peritumoral TILs have not been undertaken. Our study shows that lung adenocarcinomas with a high degree of intratumoral DC infiltration is associated with a high density of peritumoral, but not intratumoral, memory phenotype TILs (in particular, CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes). In this group, and with respect to the total number of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes/HPT, only one third correspond to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. However, in lung adenocarcinomas with a low density of intratumoral DCs, the density of peritumoral CD8<sup>+</sup> T lymphocytes accounted for half of the total CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. Although in this group, the degree of TILs was reduced with respect to high DC density lung adenocarcinomas.

Recently, it has been reported that in the tumor microenvironment, cytokines produced by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes contribute to CD8<sup>+</sup> T lymphocyte recruitment.<sup>45,46</sup> Perhaps this phenomenon is occurring in lung adenocarcinomas with a high density of peritumoral CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. However, studies are required to analyze whether CD4<sup>+</sup> T cells in TILs are stimulating (Th1 or Th17) or blocking (Th2 or Treg cells) the anti-tumor immune response.<sup>50</sup> Currently, we are studying these T-cell subsets in NSCLC biopsies.

Several factors induced by tumor and stromal cells are known to inhibit intratumoral lymphocyte infiltration.<sup>30</sup> This phenomenon might be caused by: (A) an absence of T-cell attracting chemokines in the tumor microenvironment,<sup>30</sup> (B) altered expression of receptors for chemokines or downstream chemokine signaling in T lymphocytes,<sup>30</sup> (C) increased cell death of T lymphocytes upon arrival at the tumor mediated by activation-induced cell death.<sup>47</sup> Along this line, our group previously reported that CD8<sup>+</sup> T lymphocytes isolated from malignant pleural effusion obtained from lung adenocarcinoma patients undergo apoptosis after T-cell receptor stimulation.<sup>47</sup>

Because high intratumoral infiltration of DCs, but not T cells, was observed in most lung adenocarcinomas, this type of tumor possibly expresses mechanisms that selectively obstruct intratumoral infiltration of T lymphocytes. A better knowledge of soluble molecules produced by the tumor cells and the receptors and signaling pathways involved are required to induce in T lymphocytes their recruitment into the tumor.

Current information with respect to conventional cancer treatments suggest that some evasion mechanisms of tumor cells might be diminished or abolished.<sup>48–50</sup> In addition, conventional treatments induce necrosis or immunogenic apoptosis of tumor cells with the concomitant release of tumor antigens and DAMPs.<sup>11,48,49</sup> In the group of patients whose tumor cells overexpress HMGB1, treatment should induce an acute release of HMGB1 and other DAMPs that participate in the induction of a tumor-specific adaptive immune response. To date, evidence supports the concept that conventional chemotherapy stimulates the participation of both innate and adaptive immune responses.<sup>50</sup> Recently, Hong et al<sup>51</sup> demonstrated that chemotherapy induces the production of chemokines in melanoma cells that support intratumoral T lymphocytes and control tumor growth.

In this scenario, and with a deteriorated immunosuppressor microenvironment due to tumor cell death, TILs from adenocarcinomas could arrive at tumor and recognize and interact with DCs and residual tumor cells. Encouraging DC-T lymphocyte-tumor cell interactions should mediate destruction of tumor cells and promote efficient tumor regression. This approach could increase clinical responsiveness to NSCLC, especially in the context of lung adenocarcinoma patient survival.

### ACKNOWLEDGMENTS

*This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). V. Rojo-Leon acknowledges the scholarship (No. 46904) and financial support provided by of CONACYT and UNAM.*

### REFERENCES

- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.

2. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc*. 2009;83:584–594.
3. Rosell R, Felip E, Garcia-Campelo R, et al. The biology of non-small-cell lung cancer: identifying new targets for rational therapy. *Lung Cancer*. 2004;46:135–148.
4. Restifo NP, Dudley MF, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:269–281.
5. Pollock K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:265–277.
6. Ma Y, Shurin GV, Gutkin DW, et al. Tumor associated regulatory dendritic cells. *Semin Cancer Biol*. 2012;22:298–306.
7. Petersen TR, Dieckgreber N, Hermans IF. Tumor antigen presentation by dendritic cells. *Crit Rev Immunol*. 2010;30:345–386.
8. Bergeron A, El-Hage F, Kambeuchner M, et al. Characterisation of dendritic cell subsets in lung cancer micro-environments. *Eur Respir J*. 2006;28:1170–1177.
9. Yican AP, Treilleux I, Lebecque S. Regulation of the trafficking of tumour-infiltrating dendritic cells by chemokines. *Semin Cancer Biol*. 2004;14:161–169.
10. Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep*. 2004;5:825–830.
11. Chow MT, Moller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2012;22:23–32.
12. Dumitriu IE, Bicachi ME, Bacci M, et al. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2007;81:84–91.
13. Mu CY, Huang JA, Chen Y, et al. High expression of PD-1.1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011;28:682–688.
14. Kurabayashi A, Furihata M, Matsumoto M, et al. Distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human non-small cell lung carcinoma in relation to apoptosis. *Pathol Int*. 2004;54:302–310.
15. Zeid NA, Muller HK. S100 positive dendritic cells in human lung tumors associated with cell differentiation and enhanced survival. *Pathology*. 1993;25:338–343.
16. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest*. 2006;86:231–245.
17. Drescher K, Lynch H. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) Lessons learned in 30 years of study. *Clin Appl Immunol Rev*. 2005;5:149–166.
18. Wakabayashi O, Yamazaki K, Ozumi S, et al. CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*. 2003;94:1005–1009.
19. de Costa Souza P, Parra ER, Annazio MJ, et al. Different morphology, stage and treatment affect immune cell infiltration and long-term outcome in patients with non-small-cell lung carcinoma. *Histopathology*. 2012;61:587–596.
20. Zhuang X, Xin X, Wang C, et al. A high number of CD8+ T cells infiltrated in NSCLC tissues is associated with a favorable prognosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18:24–28.
21. Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, et al. Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2000;27:27–35.
22. Kawai O, Ishii G, Kubota K, et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2008;113:1387–1395.
23. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6:244–285.
24. Fan HY, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, et al. A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody cross-reactivity and retrieve antigens. *J Histochem Cytochem*. 1995;43:97–102.
25. Hussein MR, Hassan IH. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinoma: preliminary observations. *J Clin Pathol*. 2006;59:972–977.
26. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006;90:51–81.
27. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;3:999–1005.
28. Thunnissen F, Kerr KM, Herth FJ, et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer*. 2012;76:1–18.
29. Talmadge JF. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: mechanisms and clinical impact. *Semin Cancer Biol*. 2011;21:131–138.
30. Rahir G, Moser M. Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61:751–759.
31. Yoshino I, Yano T, Murata M, et al. Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. *Cancer Res*. 1992;52:775–781.
32. Wald O, Izhar U, Amir G, et al. CD4+CXCR4 high CD69+ T cells accumulate in lung adenocarcinoma. *J Immunol*. 2006;177:6983–6990.
33. de Chaisemartin L, Goc J, Darnotte D, et al. Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res*. 2011;71:6391–6399.
34. Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol*. 2008;26:4410–4417.
35. Liu PL, Tsai JR, Hwang JJ, 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*. 2010;43:530–538.
36. Shen X, Hong T, Sun H, et al. The expression of high-mobility group protein box 1 correlates with the progression of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2009;22:535–539.
37. Riemann D, Wenzel K, Schulz T, et al. Phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from non-small-cell lung cancer. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;114:38–45.
38. Balch CM, Riley LB, Hae YJ, et al. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg*. 1990;125:200–205.
39. Kazaki A, Scheid P, Piet M, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. *J Lab Clin Med*. 2002;140:320–328.
40. Lee TK, Horner RD, Silverman IF, et al. Morphometric and morphologic evaluations in stage III non-small cell lung cancers. Prognostic significance of quantitative assessment of infiltrating lymphoid cells. *Cancer*. 1989;63:309–316.
41. Tosi P, Sforza V, Santopietro R, et al. Bronchiole-alveolar carcinoma: an analysis of survival predictors. *Eur J Cancer*. 1992;28A:1365–1370.
42. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, et al. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Brit J Cancer*. 2006;94:275–280.
43. Tormunen-Napankangas U, Soini Y, Paakko P. High number of tumour-infiltrating lymphocytes is associated with apoptosis in non-small cell lung carcinoma. *APMIS*. 2001;109:525–532.
44. Eerola AK, Soini Y, Paakko P. A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000;6:1875–1881.

45. Wong SB, Bos R, Sherman LA. Tumor-specific CD4+ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8+ T cells. *J Immunol*. 2008;180:3122–3131.
46. Bos R, Sherman LA. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res*. 2010;70:8368–8377.
47. Prado-Garcia H, Romero-Garcia S, Morales-Puentes J, et al. Activation-induced cell death of memory CD8+ T cells from pleural effusion of lung cancer patients is mediated by the type II Fas-induced apoptotic pathway. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61:1065–1080.
48. Kepp O, Galluzzi L, Martins I, et al. Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30:61–69.
49. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:59–73.
50. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, et al. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res*. 2011;71:4809–4820.
51. Hong M, Puaux AL, Huang C, et al. Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control. *Cancer Res*. 2011;71:6997–7009.