



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INFLUENCIA DEL SEXO, EL ESTADIO HORMONAL Y LOS ESTRÓGENOS EN LA
EXPRESIÓN DEL EJE CXCR4/CXCL12 EN EL ADENOCARCINOMA PULMONAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

VIANEY RODRÍGUEZ LARA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2014.



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INFLUENCIA DEL SEXO, EL ESTADIO HORMONAL Y LOS ESTRÓGENOS EN LA
EXPRESIÓN DEL EJE CXCR4/CXCL12 EN EL ADENOCARCINOMA PULMONAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

VIANEY RODRÍGUEZ LARA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:

DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2014.

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 junio de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **RODRÍGUEZ LARA VIANEY** con número de cuenta **98261642** con la tesis titulada **"INFLUENCIA DEL SEXO, EL ESTADIO HORMONAL Y LOS ESTRÓGENOS EN LA EXPRESIÓN DEL EJE CXCR4/CXCL12 EN EL ADENOCARCINOMA PULMONAR"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA FORTOUL VAN DER GOES**:

Presidente: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ
Vocal: DRA. ALEJANDRA RENATA BAEZ SALDAÑA
Secretario: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Suplente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCA
Suplente: DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 07 de agosto de 2014

María del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

**AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNAM**

AL COMITÉ TUTOR:

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dr. Eduardo García Zepeda

Dr. Moisés Eduardo Selman Lama

Por su apoyo en mi formación académica y en la realización de este proyecto

Agradecimientos

Al Jurado revisor de esta tesis:

Dra. Renata Báez Saldaña
Dra. Marcela Lizano Soberón
Dr. Mariano Martínez Vázquez
Dr. Manuel García Carrancá
Dr. Moisés Selman Lama

Por su tiempo y valiosos comentarios

A mi tutora y mentora

Dra. Teresa Fortoul van der Goes

Por tus enseñanzas y apoyo, por impulsarme siempre y fomentar mi crecimiento, por acompañarme en el camino de la ciencia, por tu amistad y cariño... Gracias

A la unidad de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México, (INER) "Ismael Cosío Villegas"

A la Dra. Eugenia Vázquez Manríquez
A la Dra. Renata Báez Saldaña
A la Dra. Erika Peña Mirabal

Por todo su apoyo en la obtención de muestras y el seguimiento de este trabajo,
Muchas Gracias

Al laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM

Téc. Verónica Rodríguez Mata
Téc. Raquel Guerrero Alquicira

Por el apoyo técnico en la obtención de cortes histológicos

Al Dr. Eduardo García Zepeda

Por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyarme en la realización de este trabajo

A la Dra. Ana Luisa Esparza Silva, Al Dr. Julio Valdivia

Por su amistad y apoyo en la realización de este proyecto

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Por recibirme en su laboratorio y permitirme desarrollar parte de este proyecto, por creer en mi y permitirme colaborar en otros proyectos...Gracias

Agradecimientos

A la Dra. Adriana Mendoza Rodríguez y al Dr. Ignacio González Sánchez

Por su apoyo técnico y por su amistad...Gracias

A la Dra. María Rosa Ávila Costa

Por que siempre has estado cerca, por tu gran apoyo en éste proyecto, por no dejarme rendirme cuando se puso complicado, por tu amistad, por ser un ejemplo de vida y una gran luz para todos los que te rodean, Equipo gracias por estar en mi vida!

A mis compañeros de trabajo y amigos Armando, Paco, Adri, Shere, Paty B, Martha, Paty Roa y a todos los compañeros de laboratorio que enriquecieron mi trabajo y mi vida

A mi familia... Por todo su apoyo y comprensión en mis ausencias, por impulsarme y acompañarme en éste y en cada proyecto que emprendo, por ser mi fuerza y mi luz siempre... son el tesoro más valioso que tengo...Gracias

A mis amigos todos y a la gente que amo...

Angélica, Gala, Sandra, Manuel, Alan Cid, Chio, Miri, Julio, Roberto, Gaby Saenz, Alan Calvo, por su cariño y por tantos momentos

A los que ya no están... Por haberme acompañado y apoyado en este camino, por lo que aprendí, por lo que me enseñaron

A Dios...Por permitirme llegar a este punto de mi vida gozando de la compañía de los que amo, por los momentos de luz y de tormenta que me permitieron aprender, por lo afortunada que he sido... Por que aquí termina una larga etapa en mi preparación académica pero inicia un viaje increíble de aprendizaje... Es momento de dar...

Esta Tesis esta dedicada a...

MIS PADRES

Por su ejemplo constante de trabajo, dedicación y amor, por su apoyo incondicional y su entrega a mis hermanas y a mi, por ser mi motor en la vida y por que esto y todo lo que soy lo debo a ustedes...Son el tesoro más grande que tengo agradezco por tenerlos como padres, los amo...

MIS HERMANAS

Por que además son mis mejores amigas, mis consejeras y compañeras de vida, gracias por siempre estar... las amo

MI FAMILIA

A todos ustedes, abuelos, tíos y primos que han estado presentes en cada logro y en cada momento difícil... agradezco por tenerlos en mi vida

MI ABUELITO

Donde estés... Gracias por creer en mi siempre, te extraño, se que estarás cerca...Prometo seguir trabajando con todo el corazón para generar conocimiento que pueda ayudar a otros a superar el cáncer, se que volveré a verte, hasta pronto...

Todas las personas que amo

Por acompañarme en éste y todos los proyectos que emprendo pero sobre todo por ser parte de mi vida...

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	3

Capítulo 1

Introducción: Cáncer Pulmonar	5
1.1 Epidemiología	5
1.2 Clasificación y Etiología	8
1.3 Diferencias en el comportamiento del cáncer pulmonar en hombres y mujeres	9
1.4 Estrógenos y su relación con el cáncer pulmonar	10
1.5 Vías estrogénicas y carcinogénesis pulmonar	12
1.6 Estrógenos y su relación con el eje CXCR4/CXCL12	15
1.7 Expresión de CXCR4/CXCL12 en el cáncer pulmonar	16
1.8 Participación de CXCR4/CXCL12 en el cáncer pulmonar	18

Capítulo 2

Justificación	25
----------------------------	----

Capítulo 3

Objetivos	26
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	

Capítulo 4

4. Estrategias y Método

4.1 Selección de Pacientes y de Biopsias	27
4.2 Inmunohistoquímica y Evaluación de la inmunoreactividad	29
4.3 Líneas Celulares y Cultivo celular	30
4.4 Tratamiento de las líneas celulares con Estrógenos y Tamoxifen	31
4.5 Inmunofluorescencia para CXCR4 y Evaluación de la fluorescencia	32
4.6 Análisis Estadístico	33

Capítulo 5

Resultados

5.1 Características Clinicopatológicas de los Pacientes	35
5.2 Expresión de ER β en tejido pulmonar sano y en los ADC pulmonares	36
5.3 Expresión de CXCR4 en tejido pulmonar sano y en ADC pulmonares	37
5.4 Expresión de CXCL12 en tejido pulmonar sano y en ADC pulmonares	38
5.5 Relación entre los niveles de inmunoreactividad de ER β , CXCR4, CXCL12 y el sexo, el estadio hormonal, el estadio del tumor y el hábito tabáquico	43
5.6 Participación de los estrógenos en la expresión de CXCR4 <i>in vitro</i>	46

Capítulo 6

Discusión	54
-----------------	----

Capítulo 7

Conclusiones	64
--------------------	----

Capítulo 8

Perspectivas	65
--------------------	----

9. Referencias	66
----------------------	----

10. Apéndice	77
--------------------	----

Artículo: **Vianey Rodríguez-Lara**, Erika Peña-Mirabal, Renata Baez-Saldaña, Ana Luisa Esparza-Silva, Eduardo García-Zepeda, Marco Antonio Cerbon Cervantes, Daniel Diaz, Teresa Imelda Fortoul. Estrogen Receptor Beta and CXCR4/CXCL12 Expression: Differences by Sex and Hormonal Status in Lung Adenocarcinoma. *Archives of Medical Research* 2014, 45 (2):158-169.

DOI: 10.1016/j.arcmed.2014.01.001 PMID: 24486245

RESUMEN

Estudios recientes han demostrado que el comportamiento del cáncer pulmonar es diferente por sexo y estadio hormonal (premenopausia/posmenopausia), lo cual sugiere un papel importante de los estrógenos y su receptor en la carcinogénesis del pulmón sin embargo los mecanismos son aun poco conocidos. En el cáncer de mama y el cervicouterino, se ha mostrado que los estrógenos pueden regular la expresión del eje CXCL12/CXCR4 a través del receptor de estrógenos beta (ER β). La alta expresión de éste eje quimiocina/receptor (CXCL12/CXCR4) es de mal pronóstico en el cáncer pulmonar ya que promueve el crecimiento tumoral y la metástasis. La expresión de CXCR4 por las células tumorales es suficiente para favorecer la carcinogénesis, ya que las células del estroma e infiltrado inflamatorio secretan CXCL12, estimulando con ello la vía de señalización CXCR4/CXCL12. Debido a lo anterior, nuestro objetivo fue investigar si existen diferencias en la expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 en adenocarcinomas pulmonares (ADC) de mujeres premenopáusicas, de mujeres posmenopáusicas y de hombres y si su expresión se asocia con características clinicopatológicas como el sexo, la condición hormonal, el estadio del tumor y el hábito tabáquico. Finalmente investigamos si los estrógenos (17- β -estradiol) estimulan la expresión de CXCR4 *in vitro*. Se estudiaron las diferencias en la expresión de las proteínas por inmunohistoquímica, en 60 biopsias de ADC, de las cuales; 20 fueron de mujeres premenopáusicas, 20 de mujeres posmenopáusicas y 20 derivadas de hombres. 30 muestras de tejido pulmonar sano adyacente al tumor fueron considerados como control, 10 biopsias derivadas de cada grupo. La expresión de las proteínas fue evaluada mediante un software digital y comparada entre sexo y condición hormonal. Además el efecto de los estrógenos sobre la expresión de CXCR4 fue evaluado mediante inmunofluorescencia en las líneas SKLU-1,

H1435 y H23 de ADC las cuales fueron tratadas con dosis crecientes de 17- β - estradiol (0.03nM-10nM) durante 24 y 72h. Nuestros resultados muestran que los ADC pulmonares presentan la mayor expresión de ER β , CXCR4/CXCL12 comparado con el tejido pulmonar normal en todos los grupos analizados, sin embargo los tumores derivados de las mujeres premenopáusicas presentan la mayor expresión de éstas proteínas comparado con los ADC de las mujeres posmenopáusicas y los ADC de los hombres quienes presentan la expresión más baja de las tres proteínas. El análisis multivariado mostró una fuerte asociación entre el nivel de inmunoreactividad de ER β , CXCL12/CXCR4 y el sexo y la condición hormonal, pero no con el estadio del tumor ni el hábito tabáquico. Finalmente el estudio *in vitro*, demostró que los estrógenos favorecen significativamente ($p < 0.001$) la expresión de CXCR4 de manera dosis y tiempo dependiente en tres líneas celulares de ADC pulmonar. En conclusión, nuestros resultados muestran que en el ADC pulmonar la expresión de ER β , CXCL12 y CXCR4 depende del sexo y del estadio hormonal y que los estrógenos fuertemente influyen en la expresión de CXCR4 de manera dosis y tiempo dependiente. Estos resultados pueden explicar en parte las diferencias en el comportamiento del ADC pulmonar por sexo y estadio hormonal y nos sugieren fuertemente el considerarlas para establecer esquemas de tratamiento más específicos por sexo y condición hormonal.

ABSTRACT

Studies have reported differences in lung cancer behavior between sex and hormonal status that suggest a role of estrogens and estrogen receptor beta (ER β) in lung carcinogenesis. In some types of hormone-dependent cancer, estrogens may regulate CXCL12/CXCR4 expression through ER β signaling. High expression of CXCL12/CXCR4 is associated with poor prognosis in lung cancer, since they promote tumor growth and metastasis. CXCR4 expression in tumor cell is enough to support lung carcinogenesis, since stromal and inflammatory cells can secrete CXCL12 chemokine. Therefore in this study we investigated whether lung adenocarcinoma tissues from premenopausal and postmenopausal women and men exhibit different ER β , CXCR4/CXCL12 expression and if this expression is associated with clinicopathological features (sex, hormonal status, tumor stage and smoking habit). Also we investigate if estrogen affect CXCR4 expression in lung ADC cell lines. Sixty primary tumor samples of lung adenocarcinoma from premenopausal, postmenopausal women and men were collected for this study. Thirty samples of healthy lung tissue adjacent to the tumor site were used as controls. ER β and CXCL12/CXCR4 expression was analyzed by immunohistochemistry. The expression of these proteins was measured by digital image software and compared between sex and hormonal status. CXCR4 expression in SKLU-1, H1435 and H23 cell lines was analyzed by immunofluorescence after estrogenic stimulation (0.03nM-10nM) for 24 and 72h. We observed that lung adenocarcinomas overexpressed ER β , CXCR4 and CXCL12 compared to normal lung. Moreover, lung adenocarcinomas from premenopausal women exhibited higher signals for ER β , CXCL12 and CXCR4 compared to postmenopausal and men, who showed the lower signals for these proteins. A multivariate analysis revealed a strong association between the immunoreactivity level of ER β , CXCL12/CXCR4 and both sex and hormonal status, but not with tumor stage and smoking. Finally, we observed that estrogen

stimulate the CXCR4 expression *in vitro* in a dose and time dependent manner. In conclusion our results demonstrated that ER β , and CXCL12/CXCR4 expression in lung adenocarcinoma depends on sex and hormonal status, and estrogen may strongly influence CXCR4 expression in ADC lung cancer cells. These results may partly explain the sex and hormonal differences in lung cancer behavior, these findings also suggest to consider this differences and estrogen role in lung cancer to consider establishing more specific treatment schemes.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER PULMONAR

1.1 Epidemiología

El cáncer pulmonar (CP) ha sido el tipo de cáncer más común en el mundo durante décadas y es actualmente uno de los problemas de salud pública más relevantes en el mundo debido a su alta incidencia y mortalidad. A nivel mundial, constituye la primera causa de muerte por cáncer en los hombres y la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres (Fig. 1). En el 2012 la organización mundial de la salud (OMS) registró 1,242,000 casos nuevos de cáncer pulmonar en los hombres y 583,000 casos nuevos en las mujeres, de los cuales 1,099,000 hombres y 491,000 mujeres murieron por ésta patología (Globocan, 2012).

El cáncer pulmonar es cada vez un problema de mayor relevancia en las mujeres, debido a que ha alcanzado una alta incidencia y mortalidad en la población mundial (Globocan, 2012) (Fig. 1). Actualmente, es la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres en Europa y Estados Unidos, sobrepasando la mortalidad por cáncer de mama y cérvico uterino (Eilstein y Eshai, 2012; Malvezzi et al., 2012; Novaes et al., 2008; Novello y Vavala, 2008; Thomas et al., 2005; Thompson et al., 2012; Youlden et al., 2008).

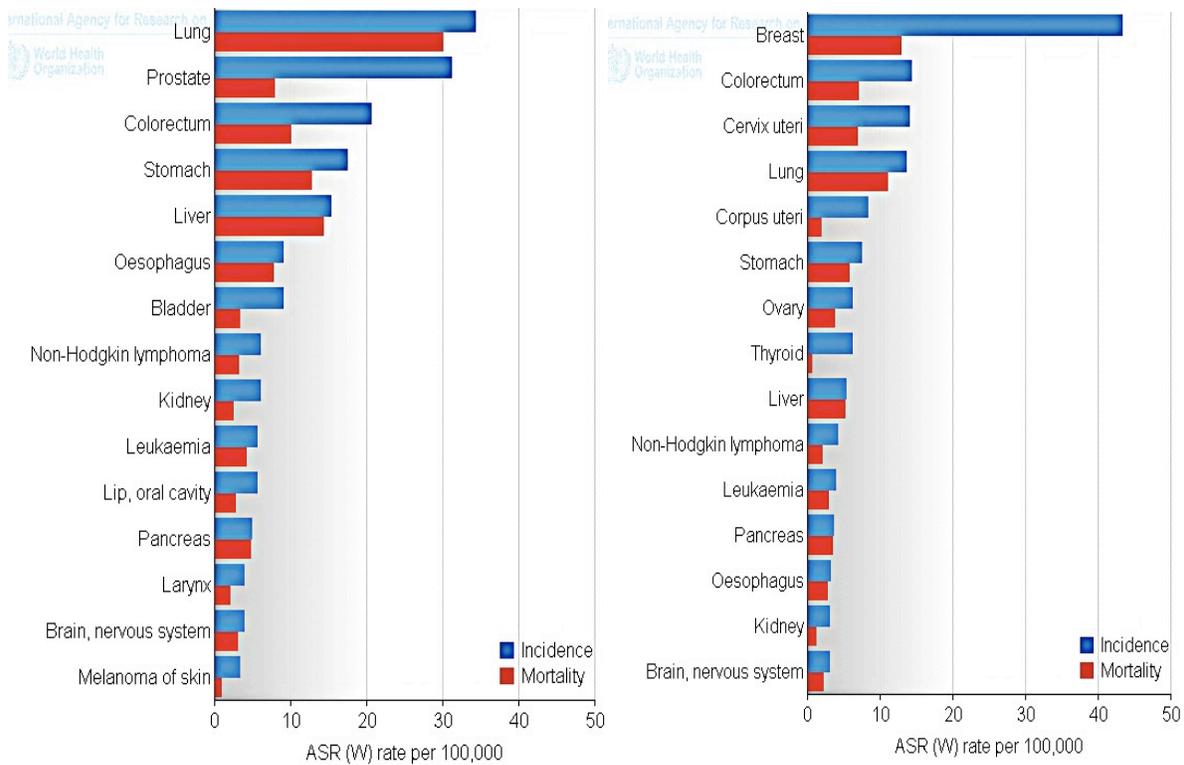


Figura 1. Incidencia y mortalidad para los diferentes tipos de cáncer en hombres y mujeres a nivel mundial. El cáncer de pulmón presenta la mayor incidencia y mortalidad en los hombres (izquierda) y se encuentra en el cuarto sitio en incidencia y el segundo en mortalidad en las mujeres (derecha) (Tomado de Globocan 2012).

Es probable que el aumento en la incidencia y mortalidad del cáncer pulmonar en las mujeres sea reflejo del incremento en el hábito tabáquico en ésta población aunado a otros factores asociados a ésta patología, sin embargo, es interesante que un gran porcentaje de mujeres con cáncer de pulmón son no fumadoras (Chakraborty et al., 2010; Egleston et al., 2009; Remon et al., 2013; Weiss et al., 2008).

Con respecto a la situación en México, el cáncer de pulmón también se considera una patología de interés, los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) indican que en los hombres este tipo de neoplasia presenta la mayor mortalidad después

del cáncer de próstata y en las mujeres es la cuarta causa de muerte debida a cáncer (Globocan, 2012; INEGI, 2013) (Fig. 2).

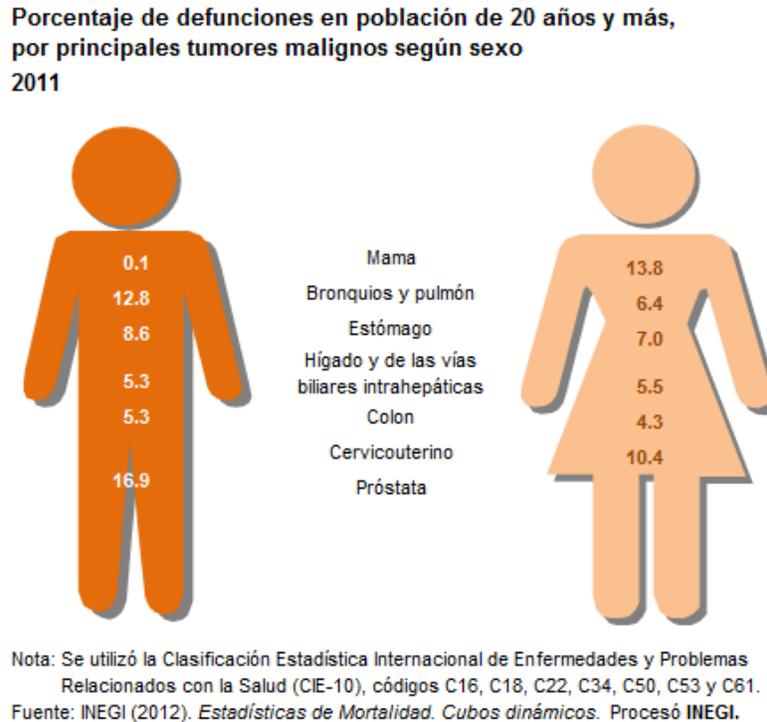


Figura 2. Distribución de las principales causas de defunción por tumores malignos según el sexo en el 2011 en México. El cáncer de pulmón es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres y la cuarta en mujeres (Tomado de INEGI 2013).

La sobrevida de los pacientes con cáncer pulmonar es muy pobre, después del diagnóstico, sólo el 13% viven más de 5 años y a pesar de los avances en la detección temprana y en el inicio de tratamiento, el 80% de los casos, se diagnostican en estadios avanzados y tienen un mal pronóstico (Wang et al., 2010).

Estos datos enfatizan la importancia de fortalecer la investigación en la biología de este tipo de cáncer y en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.

1.2 Clasificación y Etiología

El cáncer de pulmón se clasifica en dos grandes tipos de acuerdo a su histología, localización y comportamiento: el cáncer pulmonar de células pequeñas, por sus siglas en inglés *SCLC* (small cell lung cancer) y el cáncer pulmonar de células no pequeñas, por sus siglas en inglés *NSCLC* (non-small cell lung cancer). El cáncer pulmonar de células no pequeñas (*NSCLC*) es el tipo más frecuente en la población mundial y consta del 85% del total de los casos de cáncer pulmonar, mientras que el cáncer de células pequeñas solo representa el 15% de los casos (Herbst et al., 2008).

El *NSCLC*, a su vez se clasifica de acuerdo a sus características histológicas en: carcinoma de células grandes, carcinoma epidermoide y adenocarcinoma pulmonar. Actualmente el adenocarcinoma (ADC) pulmonar es la forma más común de *NSCLC* en el mundo, ya que del 30 al 50% de los casos corresponden a éste tipo histológico (Herbst et al., 2008).

Aunque el hábito tabáquico es el principal factor etiológico asociado al cáncer pulmonar, el adenocarcinoma (ADC) de pulmón es el tipo histológico menos asociado al tabaco y a pesar de que se ha observado en fumadores, se presenta con mayor frecuencia en no fumadores, en personas jóvenes y en mujeres (Yang et al., 2002).

El adenocarcinoma pulmonar es una patología compleja y debido a su poca asociación con el tabaquismo, se ha investigado qué otros factores etiológicos podrían ser importantes para su establecimiento. Con respecto a ello, se ha descrito que la exposición crónica a algunos contaminantes del aire como el óxido nítrico (NO_x) y el dióxido de carbono (CO_2), se asocia con una mayor incidencia de ADC pulmonar (Chen et al., 2009; Liaw et al., 2008; Turner et al., 2011). De igual forma, la exposición al humo de leña y a

vapores de aceite empleados en la cocina también incrementan el riesgo de desarrollar este tipo de cáncer pulmonar (Hernandez-Garduno et al., 2004; Wang et al., 2009; Yu et al., 2006). Algunas mutaciones en oncogenes como Kras, EGFR, HER2, BRAF, también se han asociado con el adenocarcinoma de pulmón (Stahel, 2007).

Diversos estudios muestran que la biología del cáncer pulmonar principalmente del ADC podría ser diferente entre hombres y mujeres, lo cual sugiere que las hormonas sexuales también pueden tener una participación en la carcinogénesis pulmonar (Powell et al., 2013; Wakelee et al., 2007).

1.3 Diferencias en el Comportamiento del Cáncer Pulmonar en Hombres y Mujeres

Existe vasta evidencia epidemiológica que muestra que el sexo y el estadio hormonal, podrían influenciar el comportamiento del cáncer pulmonar. Por ejemplo, independientemente de su estatus como fumador o no fumador, las mujeres presentan mayor incidencia (53%) y riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, especialmente ADC pulmonar comparado con los hombres (15%). Además, a diferencia de los hombres, la mayor parte de las mujeres con CP no presentan hábito tabáquico (Freedman et al., 2008; Powell et al., 2013; Siegfried et al., 2009; Wakelee et al., 2007).

Otros estudios muestran que las mujeres premenopáusicas presentan una alta incidencia de ADC pulmonar y pobre supervivencia cuando se comparan con las mujeres posmenopáusicas (Albain et al., 2007; Oton et al., 2006; Stabile et al., 2011). Además, las mujeres premenopáusicas frecuentemente se presentan con estadios clínicos más avanzados, tipos histológicos menos favorables (adenocarcinoma) y pobremente diferenciados comparado con las mujeres posmenopáusicas y los hombres (Albain et al.,

2007; Moore et al., 2003). Estos datos indican que el cáncer pulmonar se comporta diferente entre hombres y mujeres, siendo las mujeres principalmente premenopáusicas mas susceptibles a ésta patología.

Los datos anteriores sugieren que los estrógenos podrían tener un papel importante en la patogénesis del cáncer pulmonar especialmente en el ADC pulmonar (Zhao et al., 2011), sin embargo, los mecanismos de los estrógenos en la carcinogénesis pulmonar descritos hasta el momento aun son pobres y su participación en ésta patología es contradictoria.

Cabe mencionar que existen otros reportes que muestran una mayor supervivencia en las mujeres con CP comparado con los hombres (Chang et al., 2009; Hsu et al., 2009; Pitz et al., 2013), sin embargo, estos reportes incluyen solo o principalmente mujeres de 60 años de edad o mayores (posmenopáusicas), en quienes los efectos de las hormonas sexuales femeninas sobre el comportamiento del cáncer pulmonar no pueden ser evaluados.

1.4 Estrógenos y su Relación con el Cáncer Pulmonar

Diferentes estudios han mostrado que las células de cáncer pulmonar son capaces de producir estrógenos mediante la actividad de la aromatasa (CYP19A1), la expresión de ésta enzima ha sido detectada tanto en tejidos como en líneas celulares de NSCLC (Miki et al., 2011; Niikawa et al., 2008; Pietras et al., 2005).

Algunos estudios, han relacionado a los estrógenos con el pronóstico del cáncer pulmonar por ejemplo; la sobreexpresión de la aromatasa en mujeres posmenopáusicas ha sido relacionada con un mal pronóstico (Mah et al., 2011; Stabile et al., 2011). Además, los hombres con estadios avanzados de NSCLC y altos niveles de β -estradiol sérico

presentan significativamente peor pronóstico comparado con hombres con NSCLC y bajos niveles de ésta hormona (Ross H, 2007).

Aunado a ello, se ha reportado que los fármacos antiestrogénicos pueden reducir el riesgo por cáncer pulmonar (Rapiti, 2009), mientras que la terapia de reemplazo hormonal (HRT) en mujeres no fumadoras puede incrementar el riesgo de adenocarcinoma pulmonar (Greiser et al., 2010) y la mortalidad por ésta patología (Chlebowski et al., 2009; Greiser et al., 2010). Además la HRT y el tabaquismo incrementan el riesgo 2 veces más en las mujeres comparado con aquellas mujeres fumadoras que no tomaron terapia de reemplazo estrogénica (Taioli y Wynder, 1994). De igual forma, Liu y cols. (Liu et al., 2005) presentan evidencia de que los estrógenos endógenos y exógenos pueden estar involucrados en el cáncer pulmonar, al reportar que mujeres con menarcas tempranas y menopausias tardías tuvieron dos veces mayor riesgo de CP comparado con mujeres con menarcas tardías y menopausias tempranas. Además observaron que la menopausia inducida más el uso de HRT incrementó el riesgo de CP en las mujeres comparado con aquellas que presentaron una menopausia natural y no usaron HRT, el riesgo relativo (RR) fue de 2.4. Por otro lado, Ganti y cols. (Ganti et al., 2006) reportaron que mujeres que usaban HRT hasta el momento del diagnóstico tuvieron menor supervivencia (39 meses) comparado con aquellas mujeres que no emplearon la HRT (79 meses).

En un trabajo de la Women's Health Initiative (WHI) en el cual 16,600 mujeres posmenopáusicas sanas fueron tratadas con HRT a base de estrógenos equinos conjugados (EEC) (0.62mg) más progestina (2.5mg) con el objetivo de evaluar los riesgos de algunas enfermedades como las cardiovasculares y el cáncer de mama, inesperadamente se observó un incremento significativo en la mortalidad por cáncer pulmonar principalmente por NSCLC aunque no en la incidencia de éste tipo de cáncer,

éstas pacientes además presentaron frecuentemente metástasis distante y bajo grado de diferenciación tumoral (Chlebowski, 2009; Chlebowski et al., 2009). Aunado a éste estudio, se ha reportado que la terapia combinada de estrógenos y progesterona incrementa el riesgo de CP de manera tiempo dependiente (50% mayor riesgo después de 10 años de uso) (Slatore et al., 2010).

A pesar de estos estudios, el efecto de los estrógenos en el CP aun es contradictorio ya que otros trabajos reportan por ejemplo que el uso de la HTR (estrógenos y progesterona) por un tiempo prolongado se asocia con una mayor supervivencia en el NSCLC (razón de riesgo ó hazard ratio (HR) 0.69; 95% intervalo de confianza, 0.54-0.89)(Katcoff et al., 2014) incluso se propone que la HTR tiene un papel protector para este tipo de cáncer (Pesatori et al., 2013). El uso de anticonceptivos orales (OC) y el riesgo de CP también ha sido estudiado sin embargo no se ha encontrado asociación de su uso con el CP (OR=0.91; 95% CI=0.81-1.03) (Wu et al., 2014).

Dadas las inconsistencias en cuanto a la participación de los estrógenos en el CP de los estudios en pacientes y debido a la importancia de éstas hormonas, se ha mostrado un creciente interés en explorar a mayor detalle el papel de los estrógenos en ésta patología.

1.5 Vías Estrogénicas y Carcinogénesis Pulmonar

Los estrógenos pueden actuar directamente como carcinógenos a través del metabolismo a catecol estrógenos y la formación de aductos del ADN (Hershberger et al., 2009; Marquez-Garban et al., 2011; Zhang et al., 2009; Zhao et al., 2011).

Así mismo, la respuesta que llevan a cabo en las células depende de su unión a los receptores celulares alfa ($ER\alpha$) y beta ($ER\beta$). Ambos receptores han sido identificados tanto en líneas celulares como en tejido pulmonar de NSCLC, sin embargo el receptor más importante en el CP es el $ER\beta$ ya que se encuentra sobreexpresado en 60 a 80% de los tumores (Chakraborty et al., 2010; Hershberger et al., 2009) y se asocia con las funciones biológicas de los estrógenos al activar las vías de señalización genómicas y no genómicas que favorecen el proceso carcinogénico en el pulmón (Miki et al., 2011; Omoto et al., 2001; Pietras et al., 2005; Taylor y Al-Azzawi, 2000; Zhao et al., 2011).

En cuanto a la expresión del $ER\beta$ en los pacientes, se ha reportado que los tejidos de NSCLC de mujeres expresan significativamente éste receptor comparado con los hombres y que su expresión se correlaciona principalmente con el ADC (Marquez-Garban et al., 2011; Niikawa et al., 2008; Stabile et al., 2002). Algunos estudios han concluido además que la expresión de $ER\beta$ se relaciona con un buen pronóstico en hombres pero con un pobre pronóstico en mujeres (Baik y Eaton, 2012; Schwartz et al., 2005). Otros estudios muestran que los pacientes que presentan una alta expresión de ambos $ER\beta$ y de la aromatasa presentan una baja supervivencia comparado con aquellos que presentan alta expresión de la aromatasa pero baja expresión de $ER\beta$, especialmente en mujeres con 65 años de edad o mayores con NSCLC. De igual forma, la alta expresión del $ER\beta$ se ha relacionado con el estadio del NSCLC (Mah et al., 2011).

Se han descrito cinco isoformas del $ER\beta$, sin embargo la $ER\beta 1$ es la única isoforma funcional que se puede unir al ligando. Stabile y cols. (Stabile et al., 2011) reportaron que la expresión de $ER\beta 1$ en los tejidos de NSCLC de mujeres y hombres es un factor independiente, de pronóstico negativo ya que se relaciona con un comportamiento más

agresivo del tumor y su expresión tiene un impacto significativo en el pronóstico el cual se basa en el estadio de la enfermedad (Navaratnam et al., 2012).

Aun existen inconsistencias en cuanto al potencial de los receptores de estrógeno en el pronóstico del cáncer pulmonar ya que otros estudios mencionan que la expresión de ER se asocia con un buen pronóstico (Navaratnam et al., 2012; Wu et al., 2005). Sin embargo la combinación de la expresión de la aromatasa y el ER β predicen significativamente la supervivencia, cuando se ajustan las covariables clínicamente significativas como el grado del tumor, el estadio y la edad, esto ha sido observado tanto en hombres como en mujeres. Es interesante que la combinación de la expresión de ER α y la aromatasa no predicen la supervivencia, lo cual apoya que el receptor beta es el subtipo biológicamente más activo en la carcinogénesis pulmonar (Baik y Eaton, 2012).

Los estrógenos a través del ER β actúan directamente sobre elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en la vía genómica o sobre las MAPK (EGFR) y AKT cinasas y en la fosforilación de coactivadores de receptores esteroideos (SRC-3/AIB1) en la vía no genómica. Los estrógenos estimulan así la proliferación celular lo cual ha sido probado tanto *in vitro* como *in vivo*, además favorecen la resistencia a la apoptosis, la secreción de factores de crecimiento (TNF- α , EGF, IGF-1) y angiogénicos como el VEGF (factor de crecimiento endotelial y vascular) así como la progresión tumoral (Hershberger et al., 2009; Kiyohara y Ohno, 2010; Marquez-Garban et al., 2011; Zhang et al., 2009; Zhao et al., 2011). El uso de fármacos antiestrogénicos como el Fulvestrant inhiben este efecto (Stabile et al., 2002).

Algunos estudios en fase II han demostrado que la adición de Tamoxifeno o Toremifeno a la quimioterapia en estadios avanzados de NSCLC es bien tolerada y resulta en una eficacia razonable con una respuesta de 18 a 25% en pacientes que han tenido un tratamiento previo con *cis*-platino. Sin embargo esto no ha podido ser confirmado en estudios aleatorios posteriores. A pesar de la actividad antitumoral de los fármacos antiestrógenos y los inhibidores de la aromatasa observados en modelos preclínicos, aun no hay suficientes datos de los estudios clínicos de terapias hormonales para ser utilizados en la clínica y es preciso entender a fondo los mecanismos de los estrógenos en el CP (Baik y Eaton, 2012; Chen et al., 2000a; Chen et al., 2000b; Lara et al., 2001).

1.6 Estrógenos y su Relación con el eje CXCR4/CXCL12

Aunque en los últimos años se ha estudiado en gran manera el efecto de los estrógenos en el cáncer pulmonar, los mecanismos explorados de estas hormonas en la carcinogénesis del pulmón aun son escasos. Se ha sugerido que los estrógenos podrían favorecer la carcinogénesis pulmonar mediante mecanismos similares a los observados en el cáncer de mama, sin embargo en el cáncer de mama los estrógenos juegan un papel importante en la iniciación mientras en el cáncer de pulmón parecen principalmente favorecer la progresión y la metástasis (Baik y Eaton, 2012; Dubey et al., 2006). Esto podría promoverse por la expresión de quimiocinas como CXCL12 y su receptor CXCR4 por las células tumorales. La expresión de éstas proteínas ha sido asociada a etapas tardías del cáncer de pulmón ya que favorecen entre otros eventos la metástasis. En algunos tipos de cáncer hormono-dependientes como el de mama y ovario, se ha reportado que los estrógenos favorecen la expresión de CXCL12 a través de su señalización mediante ER (Belperio et al., 2004; Boudot et al., 2011; Hall y Korach, 2003; Rodriguez-Lara et al., 2014; Sauve et al., 2009; Wagner et al., 2009; Wald et al., 2011),

sin embargo ésta asociación no ha sido investigada en el cáncer de pulmón, un cáncer cuya relación con los estrógenos es cada vez más evidente.

1.7 Expresión de CXCR4/CXCL12 en el Cáncer de Pulmón

Las quimiocinas son una familia de citocinas quimioatrayentes de 8 a 14kDa que se unen a receptores transmembranales acoplados a proteínas G. Conforman una superfamilia de 50 ligandos y 20 receptores, los cuales se dividen en cuatro familias: CXC, CC, C y CX3C, con base en la posición de los residuos de cisteína adyacentes al extremo amino terminal. También se clasifican de acuerdo con su función en *homeostáticas* e *inflamatorias*. Las quimiocinas homeostáticas se expresan constitutivamente y dirigen la migración de los leucocitos durante la vigilancia inmunológica. Las quimiocinas inflamatorias que son la mayoría, son inducibles y controlan el reclutamiento de las células a los sitios de infección e inflamación. A pesar de la capacidad de las quimiocinas de inducir la migración celular, distintas quimiocinas inducen respuestas diferentes y activan vías de señalización para una respuesta particular. La respuesta fisiológica y la vía de señalización depende de la combinación receptor/ligando, del tipo de célula y del estado patofisiológico (Minamiya et al., 2010; O'Hayre et al., 2008).

Las células tumorales, las cuales expresan un repertorio relativamente restringido de quimiocinas y de receptores de quimiocinas, utilizan y manipulan éste sistema para favorecer el crecimiento del tumor y su diseminación (Wald et al., 2013).

CXCL12 ó SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) es una quimiocina homeostática de la familia CXC, que se une selectivamente a los receptores CXCR4 y CXCR7 para realizar su función. En condiciones normales CXCL12 se expresan en una variedad de tejidos, incluyendo el pulmonar, donde CXCL12 es producida por las células epiteliales para

reclutar leucocitos en caso de daño agudo. CXCL12 tiene otras funciones como dirigir la hematopoyesis, la migración de linfocitos hacia los sitios de infección y mantener la arquitectura de los órganos linfoides secundarios.

Sin embargo su expresión ha sido detectada en diferentes tipos de cáncer entre los que se encuentra el de pulmón en el cual su expresión es contradictoria. Algunos autores reportan empleando ELISA y RT-PCR que CXCL12 no se expresa en líneas celulares (A549 y Calu-1) ni en tejidos de pacientes con NSCLC (Belperio et al., 2004; Phillips et al., 2003). En contraste estudios más recientes muestran la expresión de esta proteína, en tejidos de pacientes con NSCLC mediante RT-PCR, PCR e inmunohistoquímica (Suzuki et al., 2008; Wagner et al., 2009; Wald et al., 2011). Wald y cols. (Wald et al., 2011) reportaron que los niveles de CXCL12 en el tejido pulmonar canceroso son incluso mayores que en la sangre periférica. Además mostraron que CXCL12 es expresado por las células neoplásicas y los fibroblastos asociados al carcinoma.

A pesar de las discrepancias en la expresión de esta proteína existen más datos en la literatura que apoyan la expresión de la quimiocina en el NSCLC (Imai et al., 2010; Lee et al., 2011; Suzuki et al., 2008; Wagner et al., 2009; Wald et al., 2011). Es probable que las diferencias en los datos se deban a la variabilidad de las muestras y a la sensibilidad de las técnicas empleadas.

CXCR4 es una proteína de 7 dominios transmembranales acoplada a proteína G y es un receptor selectivo de CXCL12. La expresión de éste receptor en condiciones normales no es amplia, se observa en algunos tejidos incluyendo el linfoides y el sistema nervioso y puede mediar la migración de las células en respuesta a su ligando, la expresión de éste eje es importante para el desarrollo, su bloqueo induce alteraciones en el sistema inmune,

nervioso, circulatorio, hematopoyético entre otros. La expresión de éste receptor también ha sido observada en diferentes tipos de cáncer.

A diferencia del pulmón sano, donde la expresión de CXCR4 es baja o imperceptible (Minamiya et al., 2010; Phillips et al., 2003; Spano et al., 2004; Su et al., 2005), en tejidos de pacientes con NSCLC y en líneas celulares, CXCR4 se encuentra sobreexpresado (Minamiya et al., 2010; Na et al., 2008; Phillips et al., 2003; Spano et al., 2004; Wagner et al., 2009). La sobreexpresión de CXCR4 es de mal pronóstico ya que un incremento en su expresión se observa principalmente en pacientes con metástasis comparado con aquellos que se encuentran en estadios tempranos del cáncer.

Recientemente se descubrió que CXCR7 es otro receptor para CXCL12 y se ha propuesto que también puede tener un papel en la carcinogénesis pulmonar, sin embargo los estudios aun no son claros. Además la expresión de éste receptor no se ha visto en todos los tipos de CP, se ha observado principalmente en el carcinoma escamoso y ocasionalmente en ADC pulmonares (Sun et al., 2010).

1.8 Participación de CXCR4/CXCL12 en el Cáncer de Pulmón

El eje CXCR4/CXCL12 ha sido ampliamente estudiado en el cáncer pulmonar debido a su implicación en diversos eventos de la carcinogénesis como la proliferación, la sobrevivencia, el crecimiento del tumor, la angiogénesis, la migración y la metástasis (Phillips et al., 2003; Wald et al., 2011). Como consecuencia la alta expresión de éstas proteínas se correlaciona con un mal pronóstico en el NSCLC (Suzuki et al., 2008).

La producción de CXCL12 y la expresión de CXCR4 por los fibroblastos del tumor y las células tumorales favorecen la proliferación celular en el NSCLC. La estimulación de líneas celulares de cultivos primarios (L3 y L4) y de la línea A549 con CXCL12 promueve la formación de colonias de manera dosis dependiente, este efecto es inhibido por el AMD3100 un bloqueador específico de CXCR4. Se ha reportado que uno de los mecanismos por los cuales CXCL12 induce la proliferación de las células tumorales es a través de la fosforilación de ERK (Wald et al., 2011). La disminución en la proliferación celular y la formación de colonias también fue observada al emplear iRNA y un anticuerpo anti-CXCL12 en líneas de NSCLC (Imai et al., 2010).

Por otro lado, el eje CXCL12/CXCR4 también estimula la angiogénesis. Para que un tumor pueda crecer es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos que lo nutran, este proceso de angiogénesis es estimulado por factores de crecimiento principalmente el factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF). Phillips y cols. (Phillips et al., 2003) observaron que SDF-1 α , incrementa los niveles de VEGF y del factor de crecimiento fibroblástico en tumores de NSCLC, lo que resulta en la formación local de vasos sanguíneos.

La activación del eje CXCR4/CXCL12 además favorece la adhesión de las células de NSCLC y SCLC a proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, la colágena I y VCAM-1. Esta interacción es importante para la adhesión y la migración de las células neoplásicas durante la metástasis a médula ósea la cual por secretar altas concentraciones de CXCL12, es el principal sitio de metástasis de este tipo de cáncer (Burger y Stewart, 2009; Burger et al., 2003). La adhesión de las células de cáncer pulmonar a los ligandos de la β 1-integrina, fibronectina y colágena se incrementa por la actividad de CXCL12, ya que activa a las integrinas α -2 favoreciendo la adhesión de las

células a la colágena, activa también la integrina α -4 y 5 estimulando la adhesión a la fibronectina en la matriz extracelular (Hartmann et al., 2005). De igual forma, CXCL12 activa a la GTPasa Rho, involucrada en la reorganización del citoesqueleto principalmente de los microfilamentos para promover la formación de filipodios y favorecer la migración, Rho también es un adaptador de la transducción de señales en las adhesiones focales en las células H82 y N592 (Applanat et al., 2008; Burger et al., 2003; Hartmann et al., 2005; Kijima et al., 2002). Se ha propuesto que la activación de las integrinas β 1 y β 3 en NSCLC por CXCR4/CXCL12 se lleva a cabo a través de ERK, IKK α / β y NF κ β (Burger et al., 2003; Gangadhar et al., 2010; Huang et al., 2007). Otros reportes indican también que la fosforilación de ERK vía CXCL12 favorece la secreción de MMP-9 y aumenta la motilidad de células de NSCLC (Huang et al., 2007; Phillips et al., 2003; Wald et al., 2011).

Por otro lado, Hartmann y cols. (Hartmann et al., 2005) reportaron igualmente que la adhesión de células de SCLC y NSCLC a la matriz, las protege de los efectos apoptóticos inducidos por fármacos como el etopósido. La activación de la β 1-integrina es suficiente para promover la resistencia a fármacos, este efecto es parcialmente mediado por CXCR4/CXCL12. Estos autores, mostraron por primera vez la intervención de CXCR4 en la resistencia a drogas mediada por la adhesión celular (CAM-DR).

La función más estudiada de CXCR4/CXCL12 en el cáncer pulmonar es la metástasis. Las células de NSCLC que expresan CXCR4 siguen un gradiente de concentración y migran atraídas por las altas concentraciones de CXCL12 en los nódulos linfoides, el hígado, el cerebro, la médula ósea y el pulmón contralateral (Belperio et al., 2004; Phillips et al., 2003; Su et al., 2005; Wagner et al., 2009).

La expresión diferencial de CXCR4 en el NSCLC se ha correlacionado con el potencial metastático tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual sugiere que la migración de las células de NSCLC del tumor primario a sitios de metástasis puede depender de los niveles de expresión de CXCR4. Como resultado, las células que expresan altas concentraciones de CXCR4 son más susceptibles a ser atraídas por CXCL12 en otros tejidos con respecto a las células que expresan bajas concentraciones de CXCR4 (Su et al., 2005). Lo anterior explica lo que se ha reportado en pacientes con NSCLC, donde la expresión alta de CXCR4 es de mal pronóstico (Na et al., 2008; Spano et al., 2004). Su y cols. (Su et al., 2005) reportaron que los pacientes con la mayor expresión de éste receptor presentaron metástasis comparado con aquellos con baja o nula expresión de CXCR4.

La expresión de CXCL12 en tejidos con NSCLC se ha asociado también con metástasis a nodos linfoides (Suzuki et al., 2008; Wagner et al., 2009). Sin embargo, los niveles de CXCL12 son significativamente altos en los órganos que son altamente susceptibles a la metástasis de las células de NSCLC comparado con el tumor primario o el plasma. El gradiente quimiotáctico entonces se establece entre el sitio de tumor primario y aquellos órganos donde hay metástasis, de acuerdo con los datos reportados por Phillips y cols. (Phillips et al., 2003) que muestran en un modelo *in vivo* que el eje CXCR4/CXCL12 media la metástasis del NSCLC.

Se ha descrito también que CXCR4 puede modular la vía de TLR9 y potenciar la metástasis de esta forma. En otros tipos de cáncer como el de próstata y mama TLR-9 induce la metástasis al favorecer la secreción de MMP-13 (Ilvesaro et al., 2007). El uso de agonistas de TLR-9 (CpG-ODNs) en las células 95D de cáncer pulmonar, potencia la expresión de CXCR4, donde el iRNA de CXCR4 reduce la metástasis de éstas células en respuesta a CpG-ODNs. Además la activación de CXCR4 por CXCL12 induce la

fosforilación de Akt pero no de I- κ B y la activación de NF- κ B en respuesta al agonista de TLR-9. La fosforilación de Akt ha sido relacionada con la metástasis del cáncer de mama (Liang et al., 2007). Por lo que CXCL12/CXCR4 puede potenciar la metástasis inducida por la activación de TLR-9 en el cáncer pulmonar a través de Akt, sin embargo es necesario investigar esta relación (Xu et al., 2009).

CXCR4 también parece tener un papel importante en la biología de las células madre del cáncer en el NSCLC (Wald et al., 2013). Bertolini y cols. (Bertolini et al., 2009) encontraron que las células de NSCLC con alta capacidad de autorenovación y con alta resistencia a la quimioterapia expresan altos niveles de CXCR4 comparado con las células que carecen de éstas características. De igual forma Jung y cols. (Jung et al., 2013) mostraron que la inhibición farmacológica o con iRNA de CXCR4 y la posterior activación de STAT3 suprimen significativamente la capacidad de autorenovación de varias líneas de NSCLC y concluyen que las células de NSCLC CXCR4 positivas son fuertes candidatos para ser células parecidas a las células madre del cáncer que mantienen ésta capacidad a través de la vía CXCR4/STAT3.

Además se ha sugerido que CXCR4 puede actuar río abajo en la transcripción del factor 5T4 en la transición epitelio-mesénquima y en la migración de las células iniciadoras del cáncer de NSCLC (Damelin et al., 2011). Todos éstos estudios proveen evidencia de la existencia de subpoblaciones de células de NSCLC con características de células madre del cáncer y también proponen a CXCR4 como un importante elemento en su biología característica (Wald et al., 2013).

Otra de las actividades de CXCL12 y su receptor, es la modulación del infiltrado inflamatorio en el microambiente tumoral en el adenocarcinoma pulmonar. Una elevada

expresión de CXCL12 se ha observado en muestras de pacientes en estadios IA a IIB, este incremento en la quimiocina se relacionó con un aumento en inflamación e infiltración de linfocitos TCD4+ CXCR4+^{high}CD69+ (Raman et al., 2007; Wald et al., 2006). Es posible que la presencia de linfocitos TCD4+CD169+ se relacione con la secreción de TGF- β y medie la evasión del sistema inmune. TGF- β es principalmente producido por el infiltrado inflamatorio en el NSCLC y se asocia con un comportamiento agresivo del tumor. La liberación de TGF- β dirige al incremento de CXCR4 en el infiltrado y la retención de más linfocitos TCD3+CD4+CD69+ capaces de liberar más TGF- β en el microambiente tumoral y contribuir a la patogénesis del adenocarcinoma pulmonar (Wald et al., 2006). CXCL12 también induce en líneas celulares de NSCLC (L3, L4, generadas por cultivo primario y A549) la secreción de CCL20, lo cual puede explicar la asociación de CXCL12 con un incremento en el infiltrado inflamatorio y la acumulación de linfocitos T CD4+ y células dendríticas (DC) (Wald et al., 2011).

Por otro lado CXCR7/RDC1 es un receptor alternativo de CXCL12 recientemente descubierto (Burns et al., 2006) y se ha propuesto que puede participar en la regulación del crecimiento tumoral y en la angiogénesis (Miao et al., 2007), su expresión también ha sido relacionada con la metástasis distante del cáncer pulmonar (Iwakiri et al., 2009). Sin embargo, Choi y cols. (Choi et al., 2014) reportaron que la expresión de CXCR4 y no la de CXCR7 favorece la metástasis mediante CXCL12 en el NSCLC, la migración y la metástasis de éstas células es dependiente de la interacción CXCR4/CXCL12 pero es independiente de la interacción de CXCL12/CXCR7. Otros autores sugieren que CXCR7 no participa en la carcinogénesis y mencionan que podría actuar exclusivamente como un receptor señuelo (Luker et al., 2010). En éste contexto el papel de CXCR7 y su relación con CXCR4/CXCL12 aun no ha sido investigada a profundidad y es aun contradictoria, lo cual es un campo de interés en futuras investigaciones.

Como se muestra anteriormente el eje CXCR4/CXCL12 ha sido bien estudiado y se conoce que participa de manera importante en diferentes etapas de la carcinogénesis pulmonar desde la proliferación hasta la metástasis, siendo su expresión de mal pronóstico en los pacientes. La expresión de CXCR4 en las células tumorales es crucial para este proceso y aunque CXCL12 es también producido por las células del tumor, la expresión del receptor es suficiente para promover la proliferación, la migración y otros eventos relacionados con la carcinogénesis, ya que el microambiente tumoral es rico en CXCL12 que también es producido por las células del estroma y del infiltrado inflamatorio.

Debido a la implicación del eje CXCR4/CXCL12 en la carcinogénesis pulmonar y dadas las diferencias observadas en el comportamiento de ésta patología entre sexos y dado que se ha reportado que las mujeres jóvenes (premenopáusicas) cursan con estadios mas avanzados y menos diferenciados en los cuales podría estar involucrada la expresión de este eje, es interesante estudiar la relación de CXCR4/CXCL12 con los estrógenos.

JUSTIFICACIÓN

Diferentes estudios sugieren que las mujeres principalmente las premenopáusicas pueden tener peor pronóstico, tumores menos diferenciados y estadios más avanzados en el CP, lo cual apoya la participación de los estrógenos en ésta patología, sin embargo los mecanismos por los cuales podrían participar en la carcinogénesis del pulmón han sido pobremente abordados. La expresión del eje CXCR4/CXL12 en el cáncer pulmonar es de mal pronóstico ya que favorece la progresión y la metástasis. En el cáncer de mama y ovario se ha mostrado que la expresión de estas proteínas es favorecida por los estrógenos. Debido a las diferencias en el comportamiento del CP por sexo y dado que las mujeres premenopáusicas cursan con peor pronóstico, es importante estudiar si la expresión de CXCR4/CXL12 puede ser asociada al sexo, al estadio hormonal y si los estrógenos a través de ER β pueden favorecer la expresión de CXCR4 como se ha visto en otros tipos de cáncer, lo cual podría ser un mecanismo por el cual estas hormonas participen en la carcinogénesis del pulmón.

OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales

- 1) Investigar la probable relación del sexo y el estadio hormonal en la expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 en el ADC pulmonar.
- 2) Investigar si la expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 se asocia con alguna característica clinicopatológica de los pacientes.
- 3) Evaluar si los estrógenos favorecen en la expresión de CXCR4 en éste tipo de cáncer.

3.2 Objetivos Particulares

- 1) Identificar mediante inmunohistoquímica la expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 en ADC pulmonares de mujeres premenopáusicas, posmenopáusicas y hombres, y comparar la expresión de las proteínas de los ADC con la observada en el tejido pulmonar sano de los tres grupos analizados.
- 2) Realizar un análisis de correspondencia para evaluar la posible asociación de la expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 y el sexo, el estadio hormonal, el estadio del cáncer y el hábito tabáquico.
- 3) Evaluar *in vitro*, la participación del 17- β -estradiol (E2) en la expresión de CXCR4 en las líneas celulares H1435, SK-LU, H23 de ADC pulmonar mediante inmunofluorescencia.

ESTRATEGIAS Y MÉTODOS

4.1 Selección de Pacientes y de Biopsias

Se obtuvieron 107 biopsias de adenocarcinoma pulmonar de la Unidad de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México "Ismael Cosío Villegas". Se consultaron los expedientes clínicos de cada paciente para obtener los siguientes datos: sexo, edad, estado hormonal (premenopausia/postmenopausia), estadio del cáncer (TNM), hábito tabáquico, exposición a otros tóxicos, ocupación, toma de radio ó quimioterapia, presencia de otras patologías pulmonares además del cáncer.

Se seleccionaron las biopsias de pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma pulmonar realizado por el patólogo, que presentaran los datos antes mencionados en su expediente clínico y que las biopsias recolectadas tuvieran tejido suficiente para el análisis de la expresión de proteínas. Los pacientes que no cumplieron con estos requisitos, así como aquellos que presentaron otras patologías pulmonares o que tomaron quimio o radioterapia fueron excluidos del estudio. De esta forma se obtuvieron 20 biopsias de mujeres premenopáusicas, 20 de mujeres posmenopáusicas y 20 de hombres. Las características de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la tabla 1.

Las mujeres con adenocarcinoma pulmonar incluidas en el estudio se encontraron entre los 30 y 80 años de edad. Las pacientes fueron definidas como postmenopáusicas cuando experimentaron naturalmente al menos doce meses consecutivos sin menstruación, y como premenopáusicas, cuando presentaron periodos menstruales normales al momento del diagnóstico (Baumgartner et al., 2011; Dratva et al., 2009;

NORMA Oficial Mexicana NOM-035-SSA2-2002, 2003). Los pacientes con ooforectomía o con alguna disfunción hormonal fueron excluidas del estudio así como aquellas pacientes que tomaban terapia hormonal hasta el momento del diagnóstico.

Los hombres con adenocarcinoma pulmonar se encontraron entre los 30 y 80 años de edad. En este estudio, las mujeres posmenopáusicas y los hombres fueron empleados para comparar el efecto de los estrógenos en la expresión de ER β y CXCR4/CXCL12 con respecto a las mujeres premenopáusicas.

En lo que se refiere a la evaluación de hábito tabáquico, se consideró el criterio de la guía estandarizada para la medida de tabaquismo, para definir a un paciente como fumador, fumador pasivo y no fumador (WHO, 1998). Se definió como fumador aquel paciente que fumó 100 o más cigarrillos en su periodo de vida y aun fuma. Un no fumador fue definido como aquel paciente que nunca ha fumado en su vida o no ha sido fumador ocasional y si han fumado menos de 100 cigarrillos en su vida. Las mujeres y hombres no fumadores que vivieron o convivieron con fumadores en el periodo de su vida y reportaron exposición a humo de cigarrillo fueron definidos como fumadores pasivos.

Por otro lado, se obtuvieron 30 muestras de tejido pulmonar sano adyacente a la zona del tumor los cuales fueron empleados como controles. Diez de los cuales fueron de mujeres premenopáusicas, 10 de mujeres postmenopáusicas y 10 de hombres. Se empleó el criterio antes descrito para clasificar las muestras controles de acuerdo al estado hormonal (premenopausia/posmenopausia).

Este estudio fue realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” y de la Facultad de Medicina UNAM, México.

4.2 Inmunohistoquímica y Evaluación de la inmunoreactividad

La expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 en tejido pulmonar sano y en adenocarcinomas pulmonares fue analizado mediante inmunohistoquímica. Las biopsias fueron fijadas en formalina al 10% y embebidas en parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μ m y se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma, St Louis, MO). Los tejidos fueron desparafinados en xilol, se rehidrataron colocándolos en alcohol en concentraciones decrecientes hasta llevarlos a agua y posteriormente fueron sujetos a presión (120lbs) y calor durante 3min para la recuperación antigénica. La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con 3% de H₂O₂ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) por 20 minutos. Se realizó un lavado con PBS-Albúmina 1% y se incubó por 30min a 37°C con los anticuerpos primarios policlonales Anti-ER β diluido 1:500 (ab3577 Abcam, Cambridge, MA), anti-CXCR4 a una concentración 1:100 (ab2074 Abcam) y anti-CXCL12 a una concentración de 1:200 (ab80118 Abcam). De la misma forma se incubó con el anticuerpo secundario (biotinylated goat-anti-rabbit, sc-2053 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y con el complejo HRP-streptavidina (sc-2053 Santa Cruz Biotechnology). Los tejidos fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS) después de ser tratados con cada reactivo y anticuerpo. La reacción inmunológica fue revelada con diaminobencidina (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). Finalmente, los tejidos fueron contrastados con hematoxilina y montados. Los controles negativos fueron obtenidos reemplazando el anticuerpo primario con PBS.

La inmunoreactividad de ER β , CXCR4 y CXCL12 fue medida en los tejidos por densitometría mediante el analizador de imágenes Image Pro Plus (v. 6.0 Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Las imágenes de los tejidos se obtuvieron utilizando una cámara digital (Evolution MP Color, Media Cybernetics, Canada) acoplada a un microscopio de campo claro (Olympus BX51, Tokyo, Japan). De cada tejido se analizaron 5 campos al azar de un área de 76.241 mm² a una magnificación de 100x. La inmunopositividad fue determinada por la presencia de color ocre en los tejidos. El software evaluó el total de color ocre presente en el área de tejido ya sea que se encontrara en el núcleo o en el citoplasma de las células. La intensidad de color fue reportada en pixeles (Rodriguez-Lara et al., 2014).

4.3 Líneas Celulares y Cultivo celular

Se obtuvieron las líneas celulares NCI-H1435, NCI-H23 de adenocarcinoma pulmonar de la American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) y se cultivaron en RPMI 1640 (ATCC-30-2001) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco) y 1% de solución de penicilina/estreptomina (PAA). Las células SK-LU1 de adenocarcinoma pulmonar fueron donadas por el Dr. Cerbon MA, esta línea fue cultivada en medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de SBF. Las células fueron cultivadas y mantenidas en una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ 95% aire y humedad.

La línea celular NCI-H1435 se deriva de un adenocarcinoma pulmonar de una mujer de 35 años; la SK-LU-1 proviene de un ADC pulmonar de una mujer de 60 años, y la NCI-H23 se deriva de un ADC de pulmón de un hombre de 51 años. Todas las líneas celulares empleadas fueron previamente caracterizadas y la expresión de ER (ER α , ER β) ha sido reportada (Caltagirone et al., 1997; Ivanova et al., 2010; Mollerup et al., 2002; Pietras et al., 2005).

4.4 Tratamiento de las líneas celulares con Estrógenos y Tamoxifen

Las células fueron cultivadas en cubreobjetos colocados en cajas de 12 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%. Para obtener un cultivo libre de hormonas esteroideas, el medio fue cambiado 48h antes del estudio por RPMI-1640 y DMEM libres de fenol rojo, con 1% de SBF sin hormonas. Las tres líneas celulares fueron tratadas por triplicado con vehículo (medio sin fenol y SBF sin hormonas) (condición control) o en concentraciones crecientes de 17- β -estradiol (disuelto en etanol y agregado al medio) (Sigma Aldrich) (0.03nM–10nM) y en 17- β -estradiol (10nM) más Tamoxifen (17.5mM) (disuelto en DMSO) un antagonista del receptor de estradiol beta, el cual es la forma predominantemente expresada en el ADC pulmonar y en éstas líneas celulares. El Tamoxifen además ha sido empleado en otros estudios de cáncer pulmonar mostrando un efecto antiproliferativo al inhibir la vía ER (Shen et al., 2010).

Se realizó una curva dosis respuesta probando los rangos de concentraciones de estrógenos que se reportan en la sangre de mujeres premenopáusicas (60-400pg/ml) y posmenopáusicas (10-60pg/ml) y de los hombres (10-60pg/ml). Las dosis que se probaron en la curva fueron: 0.03nM (10pg/ml), 0.22nM (60pg/ml), 0.55nM (150pg/ml), 0.91nM (250pg/ml), 1.65nM (450pg/ml), 3.76nM (1000pg/ml) y 10nM. Se eligió la concentración a la cual se observó la mayor expresión del CXCR4 (10nM) para administrarla junto con el Tamoxifen. Después de 24 y 72h de cultivo, la viabilidad celular fue determinada y se realizó inmunofluorescencia para detectar la expresión de CXCR4 y evaluar los posibles cambios en la expresión posterior al estímulo con estradiol.

4.5 Inmunofluorescencia para CXCR4 y Evaluación de la fluorescencia

Después del tratamiento con estradiol, el sobrenadante fue removido y las células fueron lavadas con PBS dos veces. Las células se fijaron con PBS-PFA 4% por 10min a temperatura ambiente (TA), después se lavaron con PBS dos veces. Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados incubando durante 1h con PBS-3%SBF-1%BSA. El anticuerpo primario anti-CXCR4 (Abcam) a una concentración de 1:100 y el secundario a una concentración de 1:1000 (Rodamina-anti-conejo) (Zymed) fueron incubados en la solución bloqueadora por 2h a 37°C, el anticuerpo secundario fue incubado en oscuridad. Se realizaron lavados con PBS en cada paso. Las células fueron contrastadas con DAPI (Sigma). Finalmente los cubreobjetos fueron montados sobre los portaobjetos y se observó al microscopio de fluorescencia.

Para cada condición experimental, en cada línea celular, se analizaron por triplicado, ambos la expresión basal de CXCR4 y la expresión de ésta proteína después del estímulo con las diferentes concentraciones de 17- β -estradiol. En cada caso, se analizaron 10 campos al azar a una magnificación de 1000x usando una cámara digital (Nikon DS-5M-L1) acoplada a un microscopio de fluorescencia. La evaluación de la fluorescencia fue medida empleando Image J versión 10.2 (Maryland, USA) (Rasband, 2012). La media de fluorescencia para CXCR4 fue evaluada en 100 células por cada condición por cada línea celular.

4.6 Análisis Estadístico

Para determinar las diferencias en la expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 entre los grupos de pacientes (mujeres premenopáusicas, posmenopáusicas y hombres) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (Prisma 6.0, GraphPad Software La Jolla California, USA). Posteriormente se aplicó la prueba *post-hoc* de Tukey con el fin de investigar si la expresión de las proteínas en los tumores fue diferente de la de los tejidos pulmonares no cancerosos en cada grupo. Estas mismas pruebas estadísticas se emplearon para determinar si la expresión de CXCR4 fue diferente entre los grupos de células sin estradiol y con las diferentes dosis de estradiol en el cultivo. En todos los casos $P < 0.001$ fue considerada como significativa.

Por otro lado, se realizó un análisis de correspondencia para determinar el patrón de asociación entre el sexo, la condición hormonal, el estadio del tumor, el hábito tabáquico y el nivel de expresión de ER β , CXCR4 and CXCL12 (bajo, medio, alto) resultante de la densitometría de las muestras con ADC pulmonar. Para definir los rangos bajo, medio y alto se establecieron puntos de corte mediante un análisis de frecuencias de la inmunoreactividad de las proteínas de todas las muestras de tejido canceroso. Para cada proteína, el nivel de inmunoreactividad fue obtenido de la distribución de frecuencias de los valores de las densitometrías de todas las muestras. Para ello los valores de corte se establecieron en el 33% y 66%. Los valores $\leq 33\%$ fueron definidos en el rango de inmunoreactividad baja, mientras que los valores $> 33\%$ y $< 66\%$ fueron considerados como dentro del rango de inmunoreactividad media y finalmente los valores de densitometría $\leq 66\%$ fueron categorizados como inmunoreactividad alta.

El análisis de correspondencia es un método descriptivo para determinar la relación entre grupos específicos y el nivel de inmunoreactividad de las proteínas. El análisis fue aplicado usando la frecuencia de incidencia de cada grupo (sexo y estado hormonal) con respecto al nivel de expresión de las proteínas (bajo, medio, alto) junto con la asociación respectiva de hábito tabáquico y estadio del tumor. El análisis usa una distancia de X^2 -calculada para evaluar la asociación entre los grupos y el nivel de inmunoreactividad. Basado en estas distancias, el análisis de correspondencia registra dos combinaciones de inmunoreactividad desde el cual se calcula un puntaje para cada grupo. La primera combinación (primer factor o Dim 1) define una escala de variación que permite un alto nivel de discriminación entre los grupos. La segunda combinación (segundo factor o Dim 2) define la máxima dispersión entre los grupos no correlacionados y el nivel de inmunoreactividad. Cada combinación ayudó a explicar un porcentaje de la varianza total que aparece en el conjunto de datos. El resultado se muestra en una gráfica XY que representa el segundo y primer factor respectivamente. Las coordenadas del gráfico son los valores calculados para ambos factores y representan los grupos sexo, estado hormonal y los niveles de inmunoreactividad. Existe una correspondencia directa o una mayor asociación entre dos posiciones adyacentes (Hill, 1974).

Finalmente analizamos si existe una asociación entre el hábito tabáquico y el nivel de expresión de las proteínas analizadas en cada grupo mediante un análisis de X^2 de dos colas y el test exacto de Fisher. Además empleamos un ANOVA de dos vías para buscar diferencias significativas en la media inmunoreactividad de cada marcador de acuerdo con el hábito tabáquico (fumador vs no fumador); si el ANOVA resultó significativo se realizó la prueba *post-hoc* Bonferroni de comparación múltiple.

RESULTADOS

5.1 Características Clinicopatológicas de los Pacientes

Se incluyeron 60 pacientes diagnosticados con ADC pulmonar. Las mujeres premenopáusicas se encontraron entre los 30 y 48 años, la media de edad para este grupo fue de 41 años. Las mujeres posmenopáusicas se encontraron entre los 55 y 80 años y la media fue 65 años. La media de edad para los hombres incluidos en el estudio fue 55 años. Nuestros resultados muestran que ambos grupos de mujeres pre- y posmenopáusicas con ADC pulmonar fueron predominantemente no fumadoras (70 y 80% respectivamente). Por el contrario, sólo el 10% de los hombres fueron no fumadores. Además observamos que un alto porcentaje de las mujeres premenopáusicas (85%) se encontraron en estadios mas avanzados del cáncer (IV) al momento del diagnóstico, comparado con las mujeres posmenopáusicas (70%) y los hombres (60%). De igual forma, las mujeres premenopáusicas frecuentemente (40%) presentaron adenocarcinomas pobremente diferenciados comparado con los otros grupos (Tabla 1).

Tabla 1. Características Clinicopatológicas de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar

Total de Pacientes (60)			
Sexo	Mujeres		Hombres (n=20)
	Premenopáusicas (n=20)	Postmenopáusicas (n=20)	
Estado Hormonal			-
Edad (años)			
Rango	30-48	55-80	30-80
Media	41	65	55
Hábito tabáquico (%)			
Fumador	20	10	90
No Fumador	70	80	10
Fumador Pasivo	10	10	0
Estado de diferenciación (%)			
Pobremente diferenciado	40	30	20
Moderadamente diferenciado	40	35	65
Bien diferenciado	20	35	15
Estadio del Tumor (%)			
Estadio I	5	20	0
Estadio II	0	10	0
Estadio III	10	0	40
Estadio IV	85	70	60

5.2 Expresión de ER β en tejido pulmonar sano y en los ADC pulmonares

El receptor de estrógenos beta fue identificado con baja intensidad en los tejidos pulmonares no cancerosos tanto de hombres como de mujeres pre- y posmenopáusicas (Fig. 3A, C, E). El análisis densitométrico mostró que la densidad media de pixeles para ER β en el tejido pulmonar sano de las mujeres premenopáusicas fue de 45 pixeles, en las posmenopáusicas fue de 22.80 y en los hombres de 22.06 pixeles. No observamos diferencia significativa en la expresión de ésta proteína en el tejido sano entre los grupos (Fig. 3G).

La expresión de ER β también fue observada en los tumores tanto de hombres como mujeres. Sin embargo, la inmunoreactividad fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en los tumores comparado con el tejido pulmonar no canceroso en los tres grupos analizados (Fig. 3). Entre los tumores, la más alta intensidad fue claramente observada en los ADC de las mujeres premenopáusicas (Fig. 3B) y una menor intensidad fue identificada en los tejidos de mujeres posmenopáusicas (Fig. 3D). La expresión más baja se observó en los ADC de los hombres (Fig. 3F). El análisis semicuantitativo mostró que la densidad media de píxeles para ER β fue 176.19, 97.77, y 52.88 píxeles para los ADC de las mujeres premenopáusicas, posmenopáusicas y hombres respectivamente (Fig. 3G).

La prueba ANOVA y Tukey *post-hoc* mostraron que los tumores de las mujeres premenopáusicas exhiben la expresión más alta comparado con las mujeres posmenopáusicas ($p < 0.001$). Además las mujeres posmenopáusicas presentaron mayor intensidad con respecto a los hombres quienes exhibieron la menor expresión de la proteína ($p < 0.001$).

5.3 Expresión de CXCR4 en tejido pulmonar sano y en ADC pulmonares

La expresión de CXCR4 en el epitelio bronquial normal fue extremadamente baja y en algunos tejidos fue casi imperceptible (Fig. 4A, 2C, 2E). La densidad media de píxeles de CXCR4 en el pulmón sano de mujeres premenopáusicas, posmenopáusicas y hombres fue de 6.10, 6.88 y 5.33 píxeles respectivamente. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa en la expresión de éste receptor en los tejidos pulmonares normales en los grupos analizados ($p < 0.001$) (Fig.4G).

En contraste, la expresión de CXCR4 fue alta en los ADC pulmonares comparado con el tejido pulmonar normal en los tres grupos (Fig. 4G, $p < 0.001$). La mayor expresión fue observada en los tumores de las mujeres premenopáusicas (146.46 píxeles) ($p < 0.001$) (Fig. 4B y 4G), una menor inmunoreactividad fue observada en los tumores de las mujeres posmenopáusicas (86.88 píxeles) y la menor expresión fue detectada en los ADC de los hombres (78.04 píxeles) (Fig. 4D, 4F y 4G). El análisis estadístico mostró que los tumores de las mujeres premenopáusicas expresaron significativamente más CXCR4 ($p < 0.001$) que los tumores de las mujeres posmenopáusicas y los hombres. No se observaron diferencias significativas en la expresión de CXCR4 en los tumores de éstos dos últimos grupos (Fig. 4G). La señal de ésta proteína fue usualmente observada en el núcleo y en el citoplasma de los ADC pulmonares (Figuras 4B, 2D, 2F).

5.4 Expresión de CXCL12 en tejido pulmonar sano y en ADC pulmonares

El tejido pulmonar normal de todos los grupos analizados presentó una expresión basal de CXCL12 (Figuras 5A, 5C, 5E). La densidad media de píxeles para CXCL12 en el pulmón normal de las mujeres premenopáusicas, posmenopáusicas y hombres fue de 38, 26.47 y 26.82 píxeles respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la densidad media de píxeles en el tejido pulmonar no canceroso de los grupos analizados (Fig. 5G, $p < 0.001$).

Contrario al tejido pulmonar sano, los ADC pulmonares de los tres grupos presentaron también una alta expresión de CXCL12. Fue interesante que los ADC de las mujeres premenopáusicas expresaran también la mayor concentración de la quimiocina (164.15 píxeles) (Fig. 5B, 5G), comparado con los ADC de mujeres posmenopáusicas (119.80 píxeles) (Fig. 5D y 5G), y de los hombres (107.93 píxeles) (Fig. 5F y 5G) ($p < 0.001$). La inmunoreactividad de CXCL12 fue localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma en

la mayoría de las muestras de ADC pulmonar en los tres grupos (Figuras 5B, 5D, 5F). La media de densidad de píxeles y el rango para las tres proteínas analizadas en las mujeres premenopáusicas, posmenopáusicas y hombres se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Densidad de píxeles para ER β , CXCR4 y CXCL12 en el tejido pulmonar sano y en los ADC pulmonares de mujeres premenopáusicas (PreMP), mujeres posmenopáusicas (PostMP) y hombres.

ERβ densidad media de píxeles				
	BE		ADC	
	Rango	Media	Rango	Media
PreMP	10-80	45.70	0-400	176.19
PostMP	0-100	22.80	0-152.7	97.70
Hombres	0-50	22.06	0-159	52.88
	BE		ADC	
	Rango	Media	Rango	Media
PreMP	0-100	6.10	0-309	146.46
PostMP	0-90	6.88	0-137	86.88
Hombres	0-70	5.33	0-166	78.04
	Control		ADC	
	Rango	Media	Rango	Media
PreMP	0-82	38	0-310	164.15
PostMP	0-100	26.47	0-192	119.8
Hombres	0-200	26.82	0-163	107.93

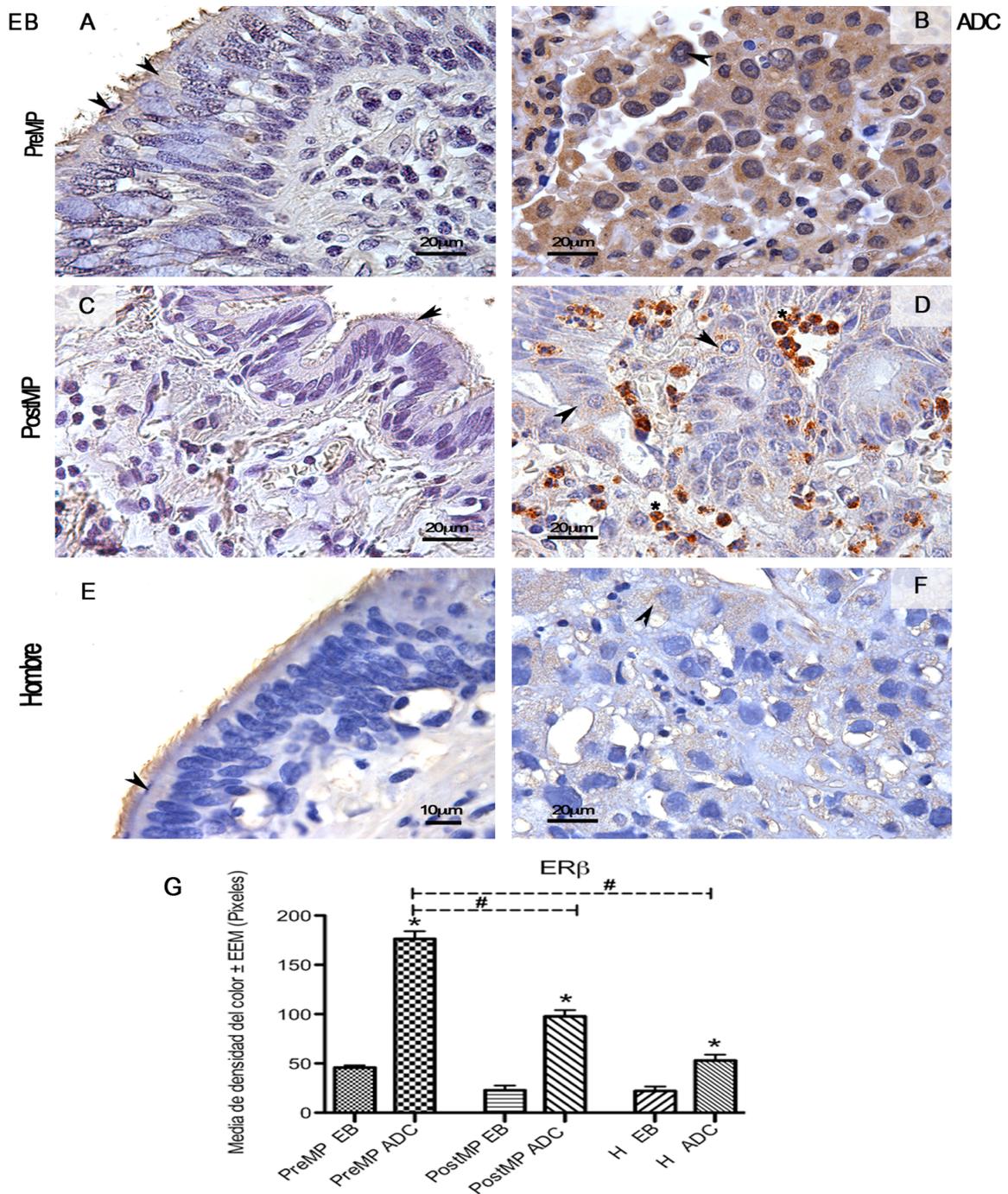


Figura 3. Expresión de ER β por sexo y estadio hormonal en tejido pulmonar sano y en ADC pulmonar. La expresión de ER β fue baja en el tejido pulmonar sano en los tres grupos analizados (A,C,E) comparado con los ADC que muestran una alta expresión (B,D,F) (cabeza de flecha). Los ADC de mujeres premenopáusicas mostraron la más alta expresión del receptor (B), comparado con los ADC de mujeres posmenopáusicas (D) y de hombres (F), la marca observada fue principalmente citoplásmica. Las células intensamente marcadas en D corresponden a infiltrado inflamatorio (asterisco). El análisis estadístico mostró que la densidad media de color para ER β fue estadísticamente alta en los ADC comparado con el epitelio bronquial (EB) en los tres grupos analizados (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test). Los ADC de mujeres premenopáusicas (PreMP ADC) mostraron significativamente mayor inmunopositividad para ER β comparado con aquellos de las mujeres posmenopáusicas (PostMP ADC) y de los hombres (# $p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test) (G).

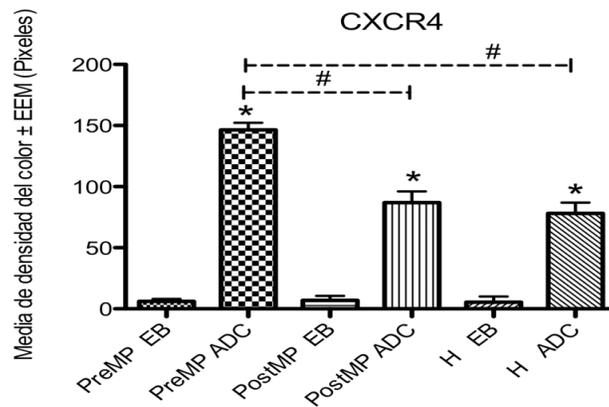
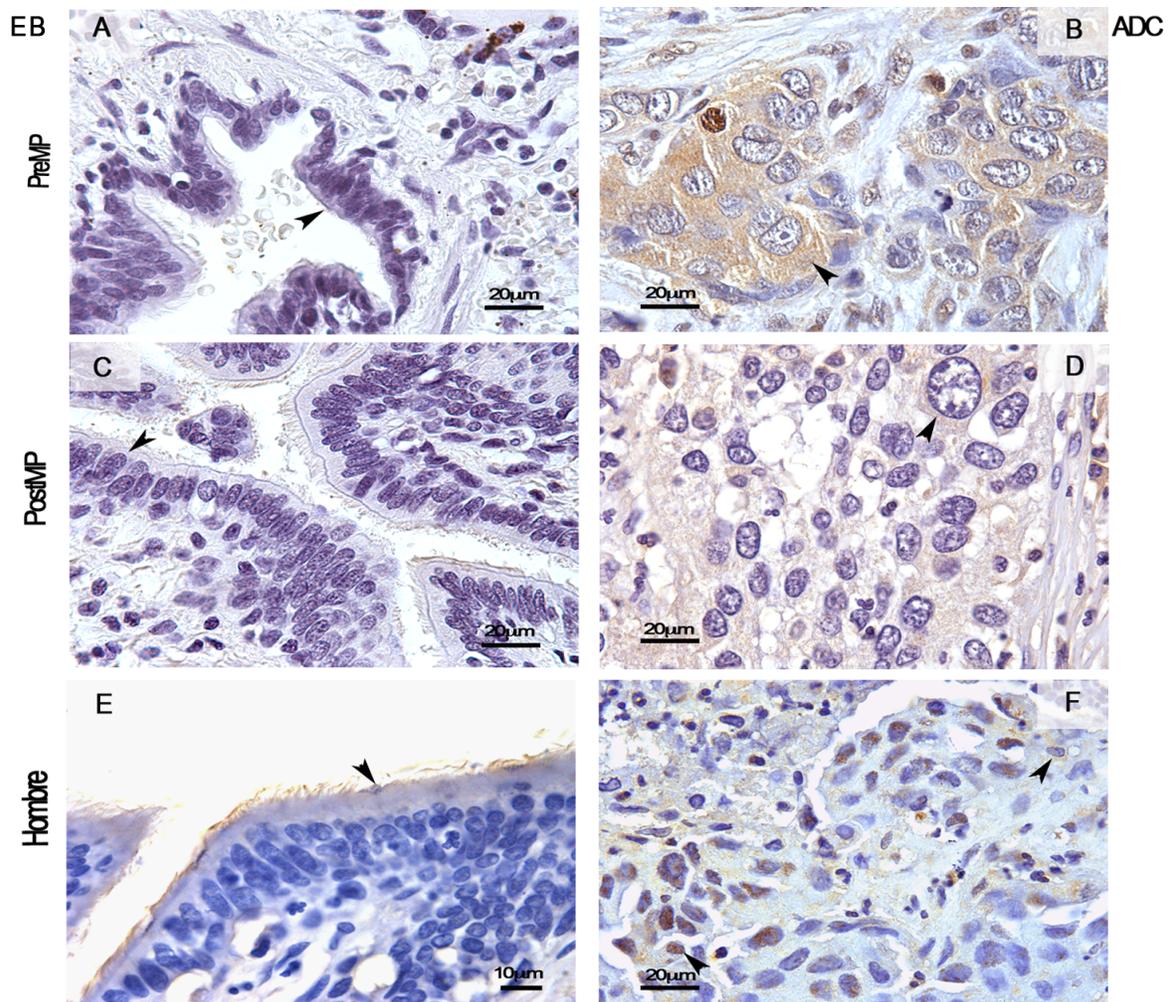


Figura 4. Expresión de CXCR4 por sexo y estadio hormonal en tejido pulmonar sano y en ADC pulmonar. Se muestra en A, C y E la expresión muy baja de CXCR4 en el tejido pulmonar sano en los tres grupos analizados, comparado con los ADC que muestran una mayor expresión (B,D,F) (cabeza de flecha). Los ADC de mujeres premenopáusicas mostraron la más alta expresión del receptor (B), comparado con los ADC de mujeres posmenopáusicas (D) y de hombres (F), la marca observada fue citoplásmica y/o nuclear. El análisis estadístico mostró que la densidad media de color para CXCR4 fue estadísticamente alta en los ADC comparado con el epitelio bronquial (EB) en los tres grupos analizados ($*p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test). Los ADC de las mujeres premenopáusicas (PreMP ADC) mostraron significativamente mayor inmunopositividad para CXCR4 comparado con los de las mujeres posmenopáusicas (PostMP ADC) y de los hombres ($\# p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test) (G).

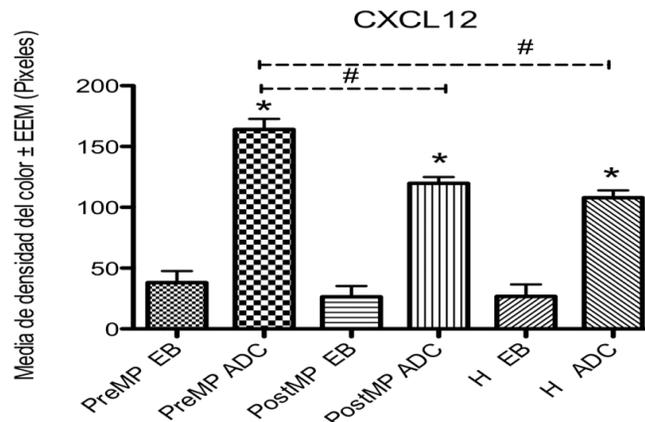
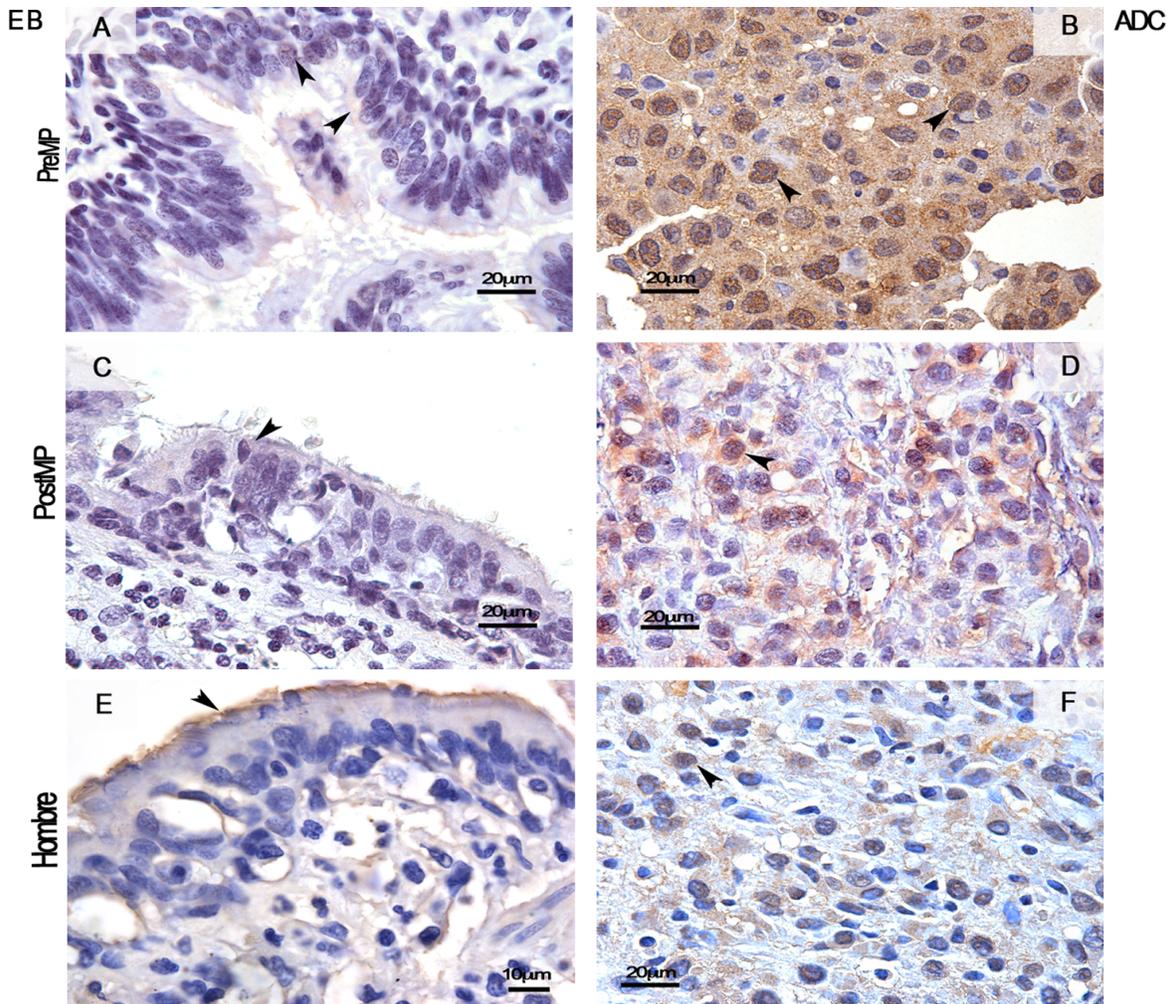


Figura 5. Expresión de CXCL12 por sexo y estadio hormonal en tejido pulmonar sano y en ADC pulmonar. La inmunopositividad para CXCL12 fue baja en el tejido pulmonar sano en los tres grupos analizados (A,C,E) comparado con los ADC que muestran una mayor expresión (B,D,F) (cabeza de flecha). Los ADC de mujeres premenopáusicas mostraron la más alta expresión de la quimiocina (B), comparado con los ADC de mujeres posmenopáusicas (D) y de hombres (F), la marca observada fue principalmente citoplásmica aunque también observamos núcleos positivos a CXCL12. El análisis estadístico mostró que la densidad media de color para CXCL12 fue estadísticamente alta en los ADC comparado con el epitelio bronquial (EB) en los tres grupos analizados (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test). Los tumores de las mujeres premenopáusicas (PreMP ADC) mostraron significativamente mayor inmunopositividad para CXCL12 comparado con los de las mujeres posmenopáusicas (PostMP ADC) y de los hombres (# $p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test) (G).

5.5 Relación entre los Niveles de Inmunoreactividad de ER β y CXCR4/CXCL12 y el Sexo, el estadio Hormonal, el Estadio del Tumor y el Hábito Tabáquico

Las 60 muestras de pacientes fueron agrupadas por sexo y estado hormonal usando las frecuencias de nivel para la inmunoreactividad de ER β , CXCR4 y CXCL12, junto con su hábito tabáquico y estadio del tumor. El análisis multivariado mostró tres grupos bien definidos que asociaron el sexo, el estadio hormonal y los niveles de inmunoreactividad de las proteínas analizadas (Fig. 6).

Cada grupo mostró un nivel de correspondencia específico y dependiente entre el sexo, el estadio hormonal y el nivel de inmunoreactividad de cada proteína. Notablemente, las mujeres premenopáusicas se asociaron fuertemente con los altos niveles de inmunoreactividad de ER β , CXCR4 y CXCL12. En contraste el análisis de correspondencia mostró una relación estrecha entre el grupo de hombres y los bajos niveles de inmunoreactividad de todas las proteínas analizadas.

Con respecto a los estadios del tumor, los estadios I y II fueron asociados con el grupo de mujeres posmenopáusicas, mientras que estadios III fueron cercanamente asociados con el grupo de los hombres. Para las mujeres posmenopáusicas la asociación con los estadios I y II pudo ser influenciada por la baja frecuencia de estos estados en los otros grupos y el pequeño número de muestras en estos estadios. Por el contrario, la alta frecuencia (40%) del estadio III en los hombres contribuye al menos en parte a la estrecha relación observada por sexo. Además debido a la alta frecuencia del estadio IV (>70%) en todos los grupos, no observamos asociación de éste estadio con algún grupo en particular, mediante el análisis de correspondencia, a pesar de que el grupo de mujeres premenopáusicas claramente presentara el mayor número de casos en éste estadio.

Además el análisis mostró una cercana correspondencia entre el grupo de los hombres y el hábito tabáquico mientras que el grupo de mujeres se asoció con la ausencia de éste hábito. Esta tendencia es resultado del alto porcentaje de hombres fumadores (90%) y el bajo porcentaje de mujeres fumadoras (20 y 10% de mujeres pre- y posmenopáusicas) (Tabla 1, Fig. 6).

Fue interesante que a pesar de las diferencias en el hábito tabáquico entre hombres y mujeres el análisis de correspondencia separó claramente al grupo de mujeres premenopáusicas, mujeres posmenopáusicas y hombres lo cual indica que la gran diferencia en los niveles de expresión de las proteínas entre éstos grupos contribuyen más a definir ésta asociación. Además ni el hábito tabáquico ni el estadio del tumor contribuyeron significativamente a la asociación entre las variables (Fig. 6).

Debido a las diferencias en el hábito tabáquico entre hombres y mujeres en nuestra muestra y dada la relación que puede tener este factor en el ADC pulmonar fue interesante estudiar si existe una asociación entre esta variable y el nivel de expresión de las proteínas analizadas en cada grupo. La prueba de X^2 y el Análisis de varianza (ANOVA) no mostraron asociación ($p < 0.05$) entre el nivel de expresión de las proteínas y el hábito tabáquico en mujeres premenopáusicas, mujeres posmenopáusicas y hombres.

Sin embargo cuando los grupos fueron separados por sexo (hombres vs mujeres), observamos una asociación significativa entre el nivel de inmunoreactividad de las proteínas analizadas y el hábito tabáquico ($p < 0.05$). El nivel alto de expresión de ER β fue asociado con las mujeres fumadoras, mientras, los niveles medio y bajos fueron asociados con los hombres fumadores (X^2 df= 18.85, 2; $p < 0.001$). Esta misma tendencia

fue observada para CXCR4 (X^2 df 10.15,2; $p<0.01$) y en menor medida para CXCL12 (X^2 df=6.01, 2; $p<0.04$).

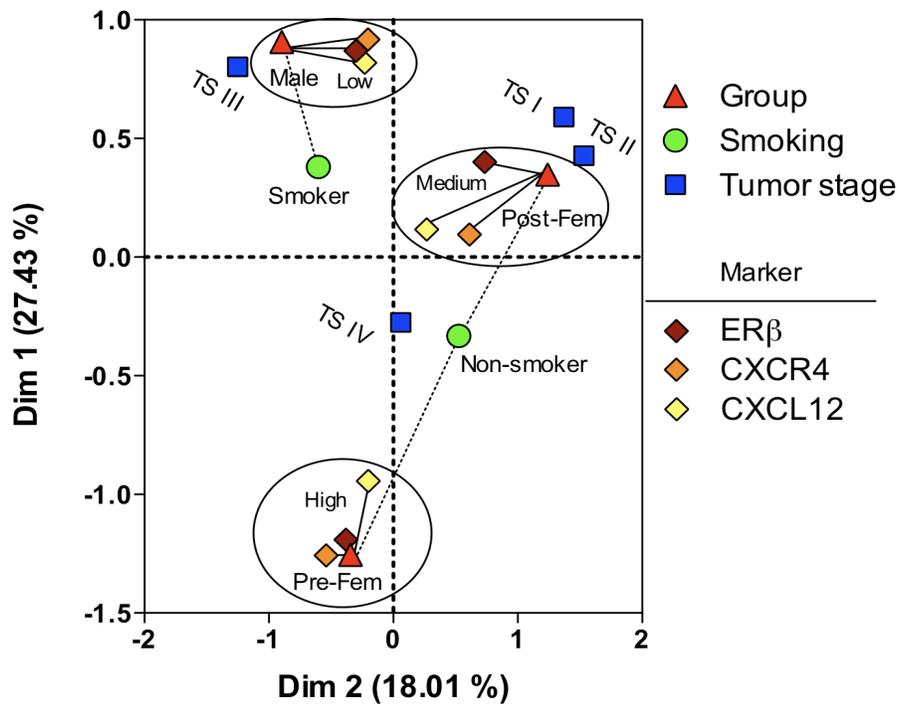


Figura 6. Análisis de correspondencia del patrón de asociación entre el sexo, el estadio hormonal, los niveles de inmunoreactividad de ERβ, CXCR4 y CXCL12 de los ADC pulmonares, el hábito tabáquico y el estadio del tumor. La estrecha asociación entre cada grupo y el nivel de inmunoreactividad junto con el hábito tabáquico y el estadio del tumor pueden ser interpretados en relación a la distancia que separa dos puntos adyacentes. A menor distancia mayor asociación existe entre un grupo específico y una variable definida. La suma de Dim 1 y Dim 2 explican el 45% del total de la variación de los datos.

5.6 Participación de los estrógenos en la expresión de CXCR4 *in vitro*.

Se estimularon las líneas celulares con estradiol a diferentes concentraciones durante 24h y 72h. Nuestros resultados mostraron que la línea celular NCI-H23 presentó una expresión basal de CXCR4, la media de fluorescencia de ésta proteína para las células que no fueron tratadas con E2 fue de 4.28 pixeles. Las células que no fueron estimuladas con estradiol fueron consideradas como el grupo control. Al estimular a células con estradiol durante 24h, la inmunoreactividad de CXCR4 incrementó al aumentar la dosis de estradiol, sin embargo éste incremento fue significativo sólo a partir de 0.5nM, donde la media de fluorescencia fue 9.35 pixeles y la máxima expresión se observó a una concentración de 3.67 y 10nM, donde las medias de fluorescencia fueron 13.22 y 12.62 pixeles respectivamente ($p < 0.001$) (Fig. 7).

La administración de Tamoxifen a la máxima dosis de estradiol empleada (10nM), disminuyó la inmunoreactividad de CXCR4 hasta 6.11 pixeles ($p < 0.001$).

Después de 72h de cultivo con estradiol, observamos el mismo patrón, en las células que no recibieron tratamiento con E2, la media de fluorescencia para CXCR4 fue de 4.19 pixeles, sin embargo el incremento fue significativo con respecto al control a partir de 0.5nM donde se observó una media de fluorescencia de 7 pixeles y la mayor expresión se observó en 10nM (20.10 pixeles). En las células tratadas con E2 y Tamoxifen la media de fluorescencia disminuyó hasta 4.8 pixeles un nivel de expresión observado en la condición control (ANOVA, Tukey $p < 0.001$) (Fig. 8). La expresión de CXCR4 fue dependiente de la dosis de estradiol y del tiempo de exposición a la hormona (Figs. 7 y 8).

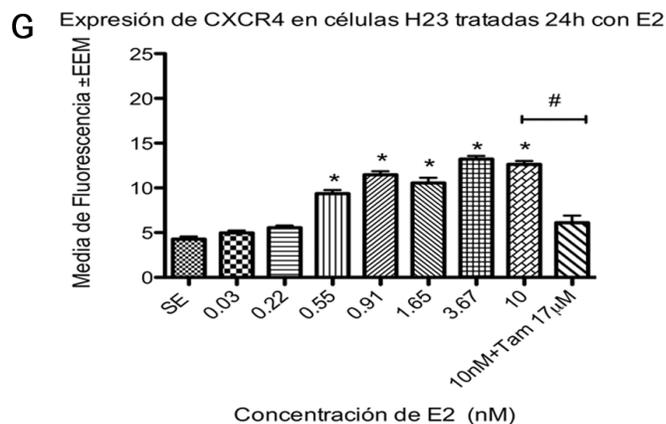
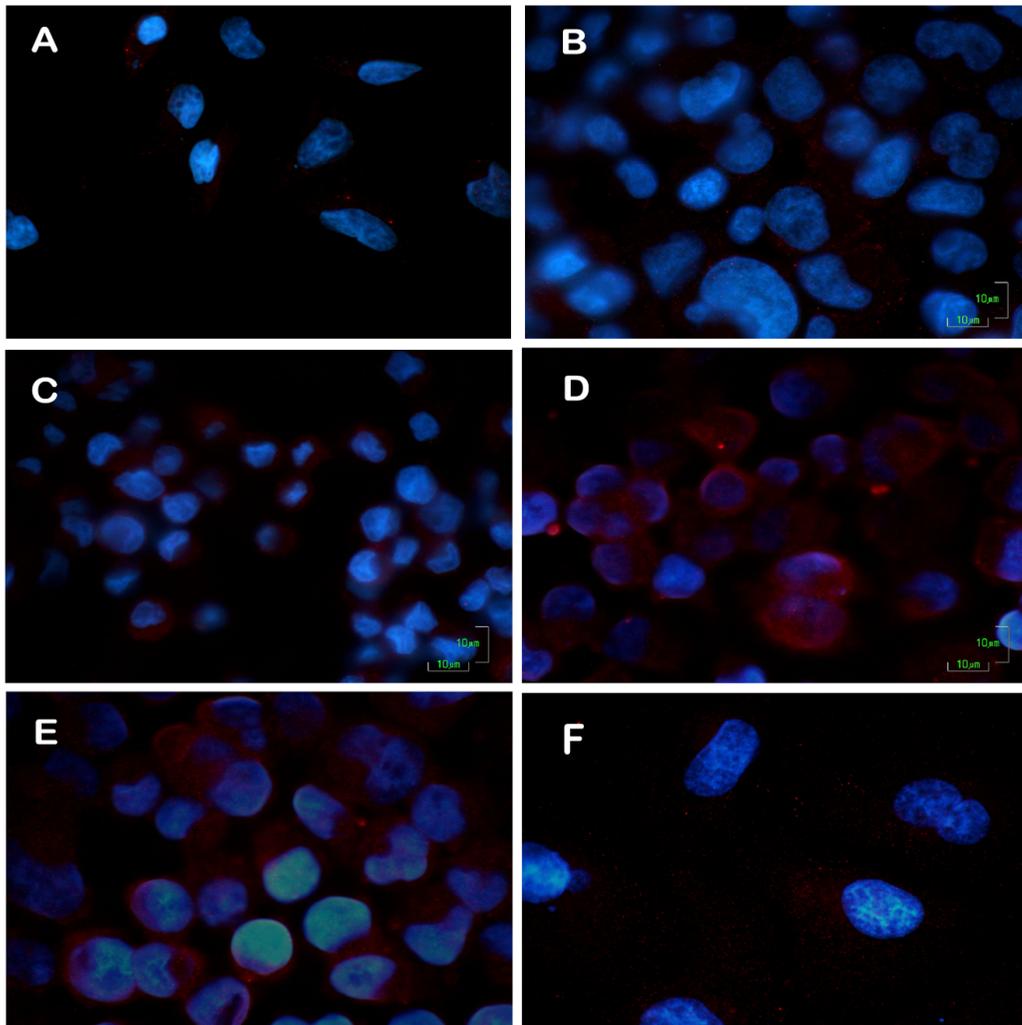
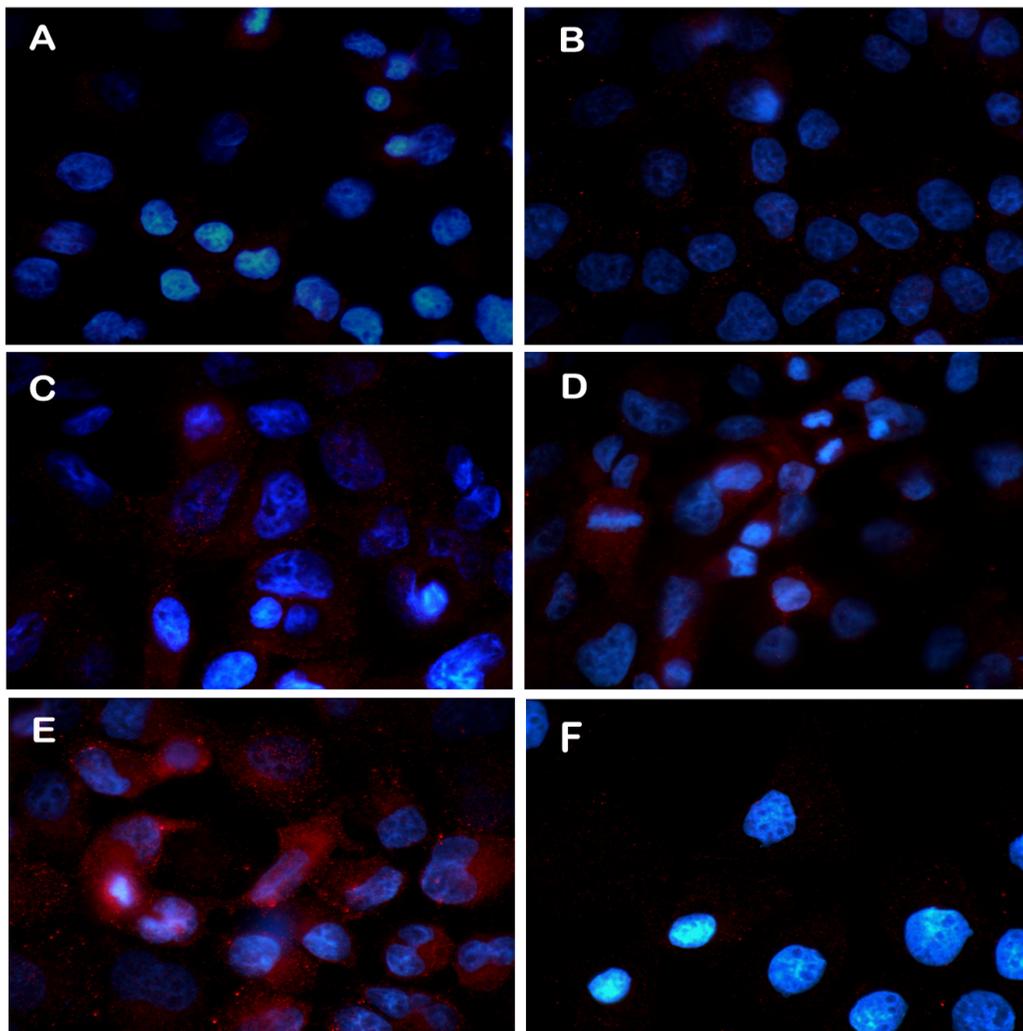


Figura 7. Expresión de CXCR4 en células H23 después del tratamiento con E2 durante 24h. Se observa la expresión de CXCR4 en el citoplasma y membrana de las células (rojo). En (A) observamos una expresión basal de CXCR4 en las células sin estradiol. La expresión del receptor incrementa al aumentar la dosis de la hormona a 0.2nM (B), 0.9nM (C), 3.6nM (D) y 10nM (E). La señal disminuye casi al nivel del grupo sin estradiol cuando se agrega Tamoxifen (F). El análisis estadístico muestra que el incremento en la expresión del receptor fue significativo a partir de 0.5nM y disminuyó significativamente al agregar Tamoxifen (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey post-hoc test) (G). En rojo se observa la señal de CXCR4 y en azul el núcleo con DAPI.



G Expresión de CXCR4 en células H23 tratadas 72h con E2

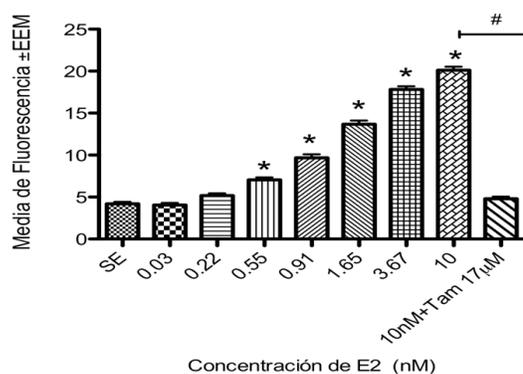
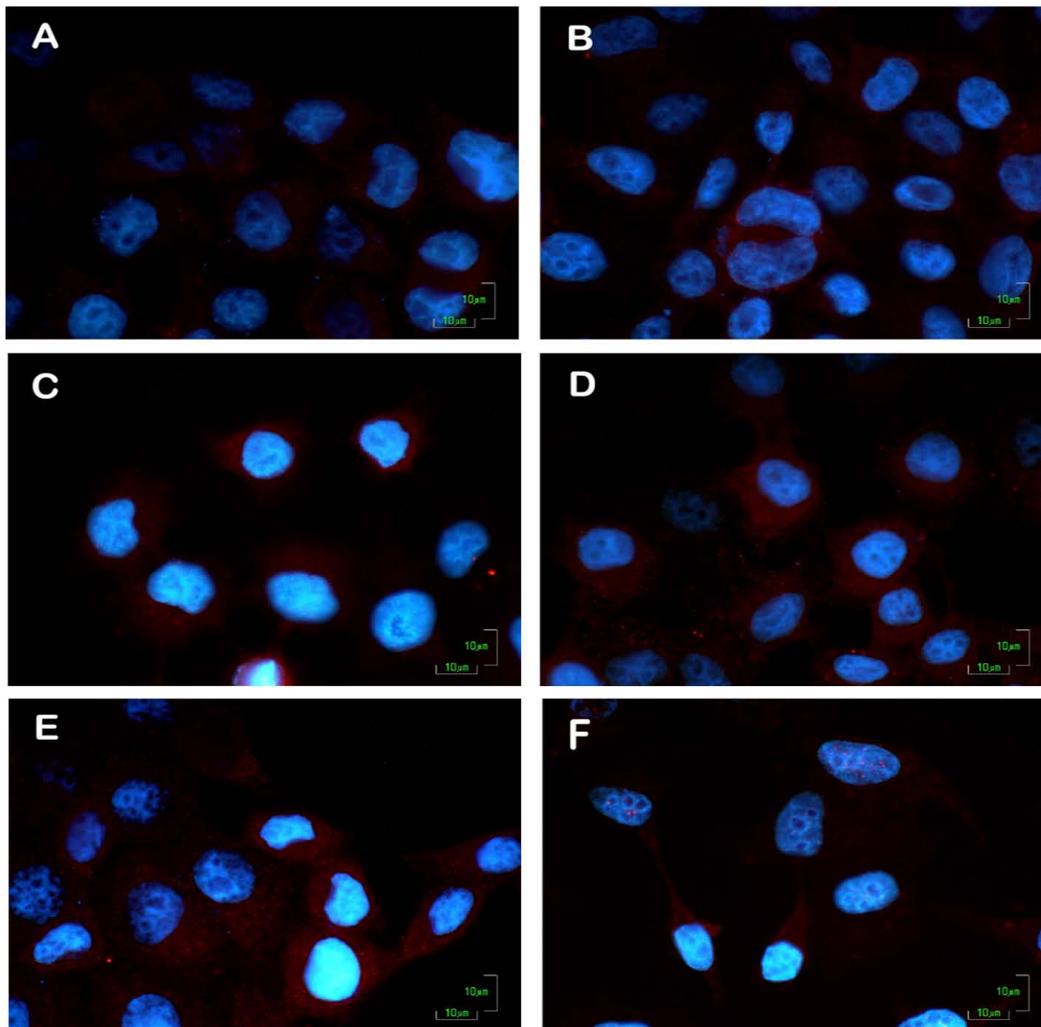


Figura 8. Expresión de CXCR4 en células H23 después del tratamiento con E2 durante 72h. Se observa la expresión basal de CXCR4 en rojo (A). La expresión del receptor incrementó al incrementar la dosis de la hormona como se observa en las células estimuladas con 0.9nM (C), 3.6nM (D) y 10nM (E). La señal disminuyó casi al nivel del grupo sin estradiol cuando se agrega Tamoxifen (F). El análisis estadístico muestra que el incremento en la expresión del receptor fue significativo a partir de 0.5nM y disminuyó significativamente al agregar Tamoxifen ($*p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test) (G). En rojo se observa la señal de CXCR4 y en azul el núcleo con DAPI.

Las células SK-LU-1 presentaron una expresión basal de CXCR4 de 8.1 pixeles a 24h de cultivo. Posterior al estímulo con estradiol, observamos un incremento en la expresión del receptor a partir de 0.22nM, sin embargo, la mayor expresión la observamos a una concentración de 10nM de estradiol (13.41 pixeles). La expresión de CXCR4 disminuyó significativamente cuando se agregó Tamoxifen (9.6 pixeles) (Fig. 9). Después de 72h de cultivo en medio con estradiol la inmunoreactividad de CXCR4 incrementó significativamente a partir de 0.22nM (11 pixeles), observándose la mayor inmunoreactividad también en 10nM (19.33 pixeles) y disminuyó al agregar Tamoxifen (10 pixeles) (Fig. 10). La respuesta de éstas células al estradiol también fue dependiente de la dosis y del tiempo. Fue interesante que éstas células presentaron mayor expresión de CXCR4 que las H23 (Figs. 7-10).

Finalmente, observamos que las células NCI-H1435 expresaron CXCR4 también de manera basal, la media de fluorescencia del grupo sin estradiol fue de 11.2 pixeles. Al incrementar la dosis de estradiol incrementó significativamente la inmunoreactividad de CXCR4 en 3.67nM y 10nM (17.81 y 19.92 pixeles respectivamente) después de 24h de cultivo. La inmunoreactividad disminuyó significativamente en las células estimuladas con estradiol 10nM y Tamoxifen (8.6 pixeles) (ANOVA, Tukey $p < 0.001$) (Fig. 11). Después de 72h de cultivo las células NCI-H1435 presentaron como basal una inmunoreactividad para CXCR4 de 12.24 pixeles en una condición libre de estradiol. La señal de CXCR4 incrementó de manera significativa en las células en cultivo con estradiol desde 0.03nM hasta 10nM donde observamos la mayor expresión (33.74 pixeles), la cual disminuyó significativamente (16.32 pixeles) al co-incubar con Tamoxifen (ANOVA, Tukey $p < 0.001$) (Fig. 12). La expresión de CXCR4 después del estímulo estrogénico en las células H1435 derivadas de una mujer premenopáusica fue mayor comparado con las H23 derivada de un hombre y las SK-LU-1 derivada de una mujer posmenopáusica (Figs. 7-12).



G Expresión de CXCR4 en células SK-LU1 tratadas 24h con E2

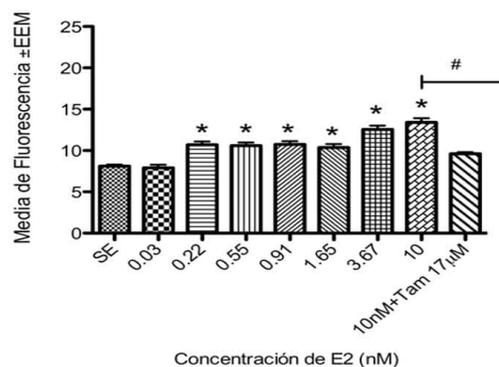
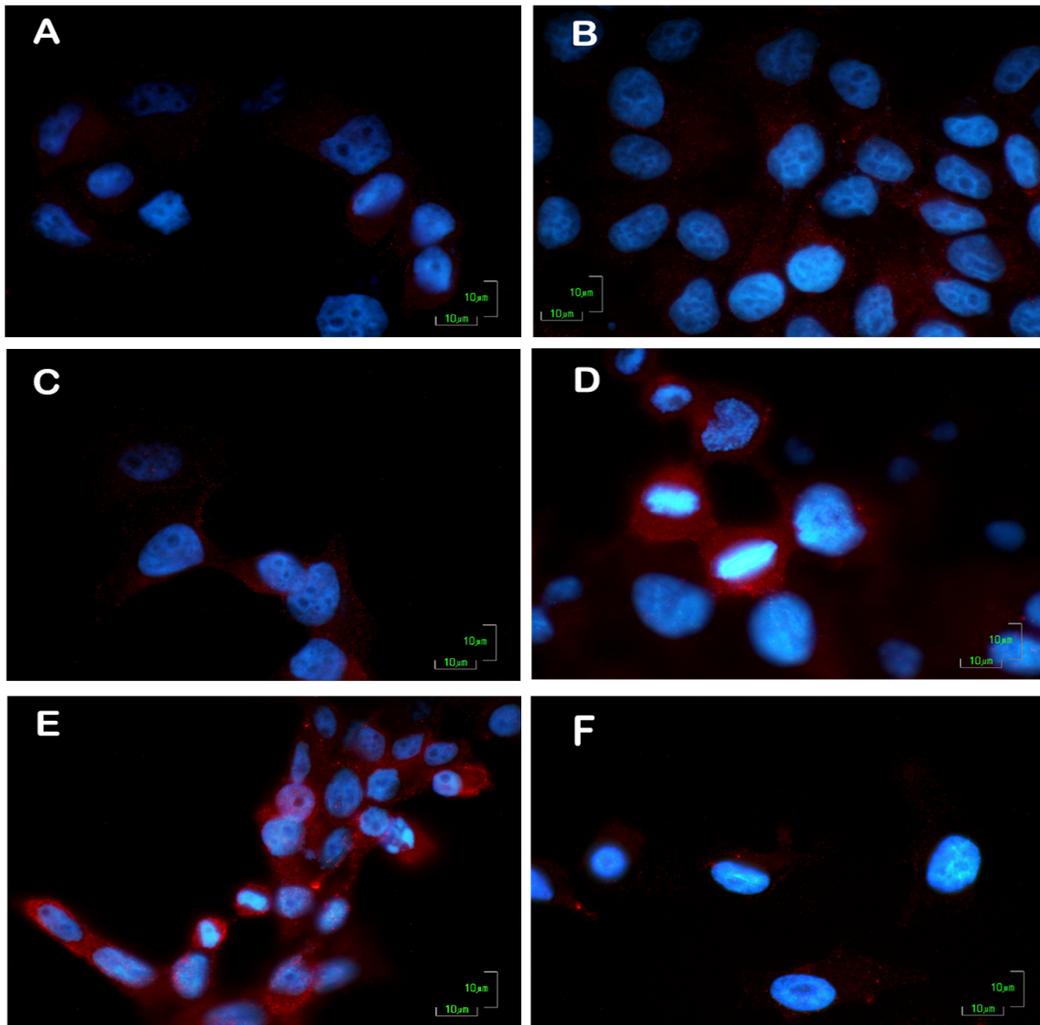


Figura 9. Tratamiento de las células SK-LU-1 con E2 durante 24h. Se observa la expresión basal de CXCR4 (A). La expresión del receptor incrementó al incrementar la dosis de la hormona como se muestra en 0.2nM (B), 0.9nM (C), 3.6nM (D) y 10nM (E). La señal disminuyó casi al nivel del grupo sin estradiol cuando se agregó Tamoxifen (F). El análisis estadístico muestra que el incremento en la expresión del receptor fue significativo a partir de 0.2nM y disminuyó significativamente al agregar Tamoxifen (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test) (G). En rojo se observa la señal de CXCR4 y en azul el núcleo con DAPI.



G Expresión de CXCR4 en células SK-LU1 tratadas 72h con E2

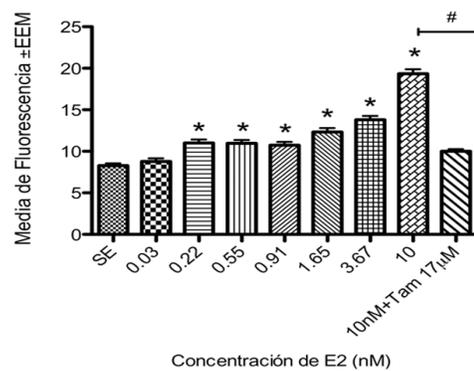
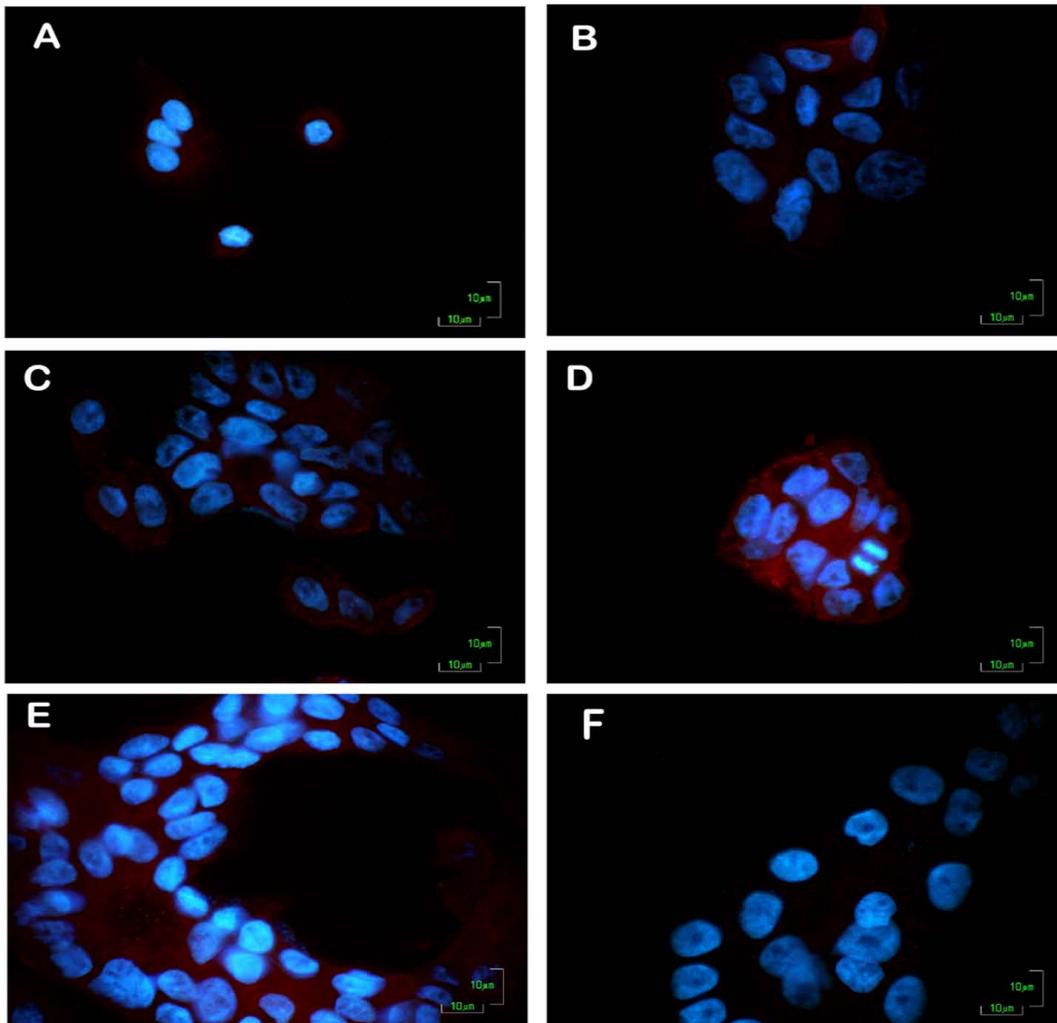


Figura 10. Tratamiento de las células SK-LU-1 con E2 durante 72h. En (A) se observa la expresión CXCR4 en células sin estradiol. La expresión del receptor incrementó al incrementar la dosis de la hormona como se observa en las células estimuladas con 0.2nM (B), 0.9nM (C), 3.6nM (D) y 10nM (E). La señal disminuyó significativamente cuando se agregó Tamoxifen (F). El análisis estadístico muestra que el incremento en la expresión del receptor fue significativo a partir de 0.2nM y disminuyó significativamente al agregar Tamoxifen. La máxima expresión se observó a 10nM (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test) (G). En rojo se observa la señal de CXCR4 y en azul el núcleo con DAPI.



G Expresión de CXCR4 en células H1435 tratadas 24h con E2

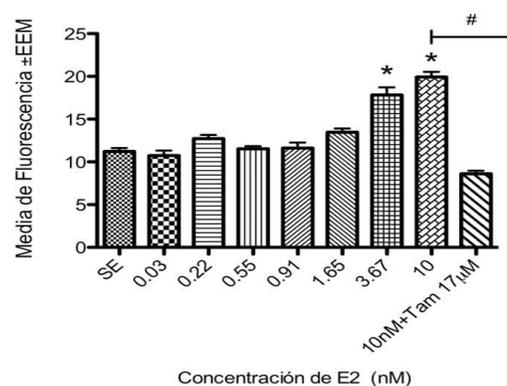
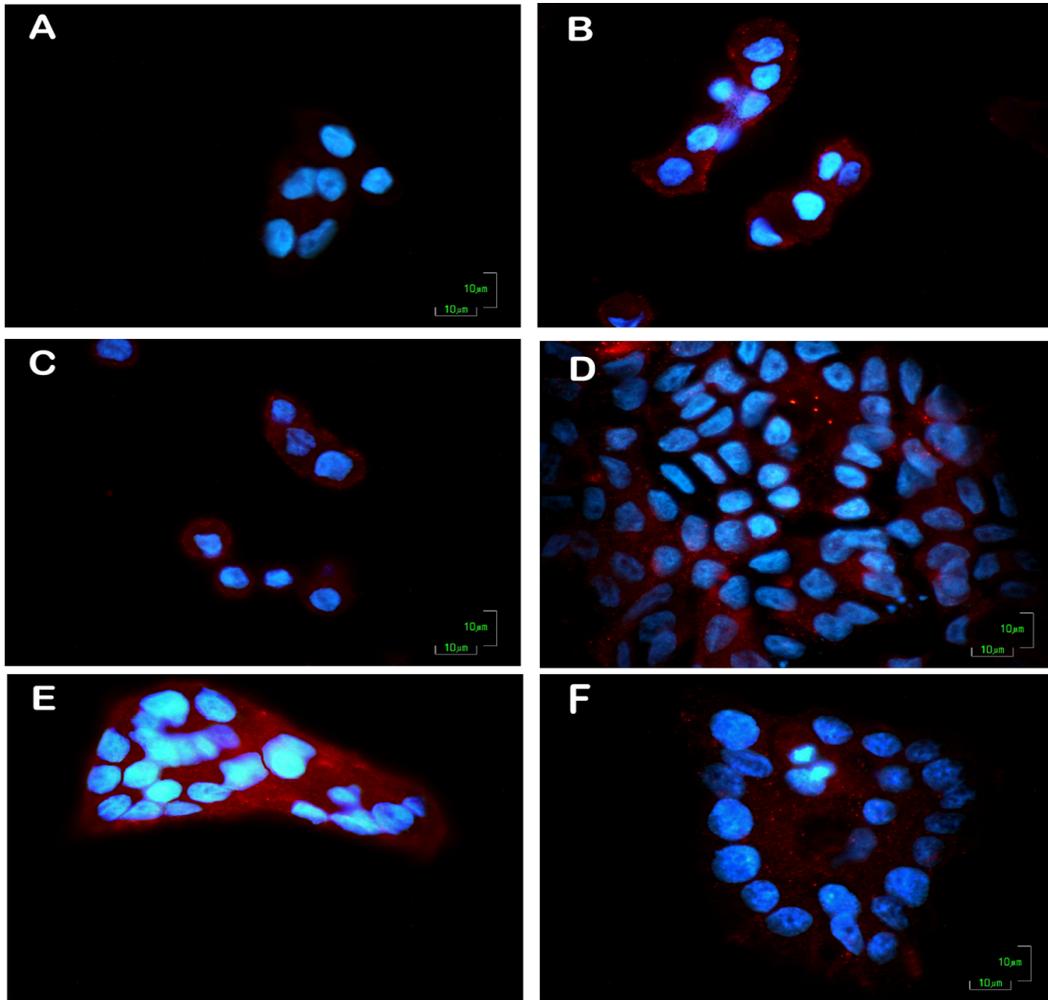


Figura 11. Tratamiento de las células H1435 con E2 durante 24h. Las células expresan un basal de CXCR4 (A). La expresión del receptor incrementó al incrementar la dosis de la hormona sin embargo este aumento es significativo hasta 3.6nM (D) y 10nM (E). La señal disminuyó por debajo de nivel del grupo sin estradiol cuando se agregó Tamoxifen (F). El análisis estadístico muestra que el incremento en la expresión del receptor fue significativo a partir de 3.6nM y disminuyó significativamente al agregar Tamoxifen ($*p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test) (G). En rojo se observa la señal de CXCR4 y en azul el núcleo con DAPI.



G Expresión de CXCR4 en células H1435 tratadas 72h con E2

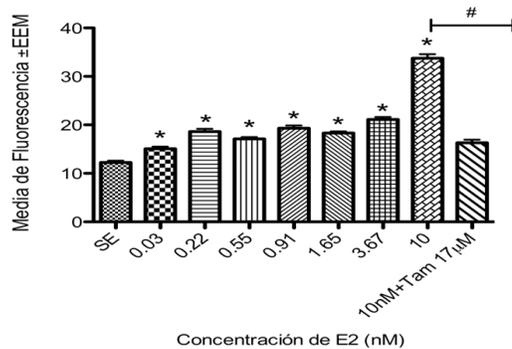


Figura 12. Tratamiento de las células H1435 con E2 durante 72h. En la condición sin estradiol (SE) las células muestran un basal de CXCR4 (A). La expresión del receptor incrementó al incrementar la dosis de la hormona como se observa en las células estimuladas con 0.2nM (B), 0.9nM (C), 3.6nM (D) y 10nM (E). La señal disminuyó significativamente cuando se agregó Tamoxifen (F). El análisis estadístico muestra que el incremento en la expresión del receptor fue significativo a partir de 0.03nM y disminuyó significativamente al agregar Tamoxifen (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey *post-hoc* test) (G) En éstas células se observó la máxima expresión de CXCR4 (33.74 pixeles) a 72h de incubación con estradiol comparado con las líneas H23 y SKLU. En rojo se observa la señal de CXCR4 y en azul el núcleo con DAPI.

DISCUSIÓN

Se ha reportado que el ADC es la forma más común de cáncer pulmonar principalmente en las mujeres y en los no fumadores (Belani et al., 2007; Devesa et al., 2005; Kadara et al., 2012; Minami et al., 2000). Las características de los pacientes en nuestra muestra confirman esta información, ya que observamos que un gran porcentaje de las mujeres con ADC fueron principalmente no fumadoras comparado con los hombres. Además encontramos que las mujeres premenopáusicas con ADC se hallaron en estadios más avanzados del cáncer al tiempo del diagnóstico y presentaron principalmente tumores pobremente diferenciados comparado con las mujeres posmenopáusicas y con los hombres (Tabla 1). Estos datos corroboran las observaciones de otros autores (Moore et al., 2003; Stabile et al., 2011).

El comportamiento del cáncer pulmonar ha sido poco estudiado en mujeres premenopáusicas y casi toda la información concerniente a ésta patología se refiere a las mujeres posmenopáusicas y a los hombres cuya condición estrogénica es similar.

Nuestros resultados indican que el comportamiento del cáncer de pulmón en las mujeres premenopáusicas puede ser diferente al observado en mujeres posmenopáusicas y en hombres, ya que las mujeres premenopáusicas mostraron los mayores niveles de expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12. El análisis de correspondencia mostró una fuerte asociación entre la condición de premenopausia y la alta inmunoreactividad de las tres proteínas, mientras que un nivel medio y bajo de expresión fue asociado con las mujeres posmenopáusicas y los hombres respectivamente. Por tanto, nuestros resultados

muestran un importante papel del sexo y el estadio hormonal en la expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 en el ADC pulmonar, un cáncer que parece fuertemente influenciado por los estrógenos.

La alta expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 en el ADC de mujeres premenopáusicas puede explicar en parte la agresividad del tumor observada en estas pacientes cuando se compara con los tumores de mujeres posmenopáusicas y de hombres como se ha reportado previamente (Albain et al., 2007; Moore et al., 2003).

Por otro lado, cuando se evaluó la asociación entre el hábito tabáquico y la expresión de las proteínas por condición hormonal, la prueba de Fisher no mostró asociación significativa como consecuencia del tamaño de los grupos tras la estratificación, pero encontramos una asociación significativa por sexo. Los altos niveles de expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 fueron asociados con mujeres fumadoras, mientras que los niveles bajos de expresión de las proteínas fueron asociados con hombres fumadores. A pesar de que el hábito tabáquico fue asociado con la expresión de las proteínas, nuestros resultados muestran que la variable más importante asociada a los niveles de expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 fue el sexo, ya que en el análisis hombres y mujeres fueron fumadores, sin embargo, las mujeres expresaron los más altos niveles de las tres proteínas comparado con los hombres. Para corroborar este resultado es importante realizar un estudio más detallado con un mayor número de pacientes, ya que en nuestra muestra la mayor parte de las mujeres fueron no fumadoras, por lo que en éste último análisis el tamaño de muestra fue muy reducido. No obstante, éstos resultados apoyan la hipótesis de que el sexo y los estrógenos pueden estar involucrados en la carcinogénesis pulmonar.

A pesar de que los estrógenos han sido asociados con el ADC pulmonar su relación con ésta patología aun es contradictoria y los mecanismos han sido poco estudiados.

Actualmente se conoce que las células del cáncer pulmonar son capaces de producir estrógenos y de responder a ellos activando las vías estrogénicas. Niikawa y cols. (Niikawa et al., 2008) reportaron que tejidos de NSCLC mostraron mayor concentración de estradiol (E2) comparado con el pulmón sano del mismo paciente; la correlación fue 1.7 veces mayor en tejido canceroso de hombres y 2.3 veces mayor en tejido canceroso de mujeres posmenopáusicas comparado con el tejido sano. La concentración intratumoral de la hormona fue correlacionada positivamente con la expresión de la aromatasa, sin embargo no fueron incluidas mujeres premenopáusicas en el estudio.

La principal vía por la cual los estrógenos ejercen su efecto en ésta patología es a través de su unión al ER β , el cual es altamente expresado por las células del tumor (Hershberger et al., 2009). Nuestros resultados muestran que la expresión de éste receptor es mayor en el ADC pulmonar comparado con el tejido pulmonar sano en todos los grupos analizados, lo cual apoya el papel de los estrógenos y el ER β en CP como previamente se ha reportado (Belperio et al., 2004; Phillips et al., 2003; Pietras et al., 2005; Zhang et al., 2009; Zhao et al., 2011). El receptor beta además se expresó en los adenocarcinomas de hombres y mujeres, pero la mayor expresión se observó en los tejidos de mujeres premenopáusicas seguido por el de las mujeres posmenopáusicas y finalmente los hombres, quienes presentaron la menor expresión. Esto demuestra que la expresión de ER β en el ADC pulmonar fue dependiente del sexo y del estadio hormonal. Lo anterior sugiere que las células neoplásicas de las mujeres premenopáusicas podrían ser más receptivas y responder mejor a los estrógenos tanto intratumorales como plasmáticos,

que aquellas células de las mujeres posmenopáusicas y de los hombres sin embargo esta hipótesis debe ser probada. Las altas concentraciones de estradiol en las mujeres premenopáusicas podrían estimular la mayor expresión de ER β en el ADC pulmonar, como se ha observado en líneas celulares de adenocarcinoma endometrial y de cáncer de mama, donde un incremento en la expresión del receptor de estrógenos fue observado después del estímulo con su ligando (Murillo-Ortiz et al., 2008; Robertson et al., 2002; Saceda et al., 1998; Vladusic et al., 2000). Esto podría explicar las diferencias en la expresión de ER β en los ADC de las mujeres premenopáusicas comparado con los de las posmenopáusicas y los hombres. Estos resultados sugieren que los niveles de estradiol pueden estar relacionados con la expresión de ER β en las células del ADC pulmonar, sin embargo se necesitan más estudios para comprobar esta relación.

Nuestros resultados también muestran que la expresión de CXCR4 y CXCL12 fue muy baja en el tejido pulmonar normal comparado con los ADC de los tres grupos analizados, lo cual apoya la participación de éste eje en la carcinogénesis pulmonar como se ha reportado previamente (Belperio et al., 2004; Phillips et al., 2003; Su et al., 2005; Suzuki et al., 2008; Wagner et al., 2009; Wald et al., 2013). No se observaron diferencias significativas en el tejido pulmonar sano entre los grupos estudiados. Sin embargo, observamos que los ADC de mujeres premenopáusicas que presentaron la mayor expresión de ER β , también mostraron la mayor expresión de CXCR4 y CXCL12. Los ADC de las mujeres posmenopáusicas quienes presentaron menor expresión de ER β comparado con las mujeres premenopáusicas, también exhibieron menor expresión de CXCL12 y CXCR4. Fue interesante además que los ADC de los hombres que mostraron la menor expresión de ER β también presentaron la menor expresión de CXCR4 y CXCL12 comparado con las mujeres pre- y posmenopáusicas.

Estos resultados fueron consistentes con el análisis de correspondencia, donde observamos una fuerte asociación entre la condición premenopausia y los niveles de expresión alta de las tres proteínas, así como el nivel medio de expresión con la condición posmenopausia y el nivel bajo con el grupo de los hombres. Estos resultados muestran que la expresión de CXCR4 y CXCL12 está relacionado con el sexo y la condición hormonal y sugiere que al menos en nuestra población, los estrógenos entre otros factores pueden estimular la expresión de éstas proteínas en el ADC pulmonar.

Para probar esta relación, nosotros tratamos tres líneas celulares de ADC pulmonar con diferentes concentraciones de 17- β -estradiol y observamos que los estrógenos son capaces de estimular la expresión de CXCR4 de manera dosis y tiempo dependiente en todas las líneas probadas, esta respuesta disminuyó significativamente al inhibir la vía E2/ER con Tamoxifen. Estos hallazgos demuestran la relación de los estrógenos con el eje CXCR4/CXCL12. La expresión y activación de éste eje por los estrógenos podría ser un nuevo mecanismo mediante el cual éstas hormonas podrían favorecer la carcinogénesis y la progresión tumoral, sin embargo se requieren otros estudios para probar esta hipótesis.

Los estrógenos podrían favorecer la expresión de CXCR4 y CXCL12 mediante diferentes vías en el cáncer pulmonar. Por ejemplo, se ha reportado que el 17- β -estradiol (E2) modula la expresión de VEGF en células de NSCLC (Jarzynka et al., 2006; Marquez-Garban et al., 2011; Siegfried et al., 2012). Siegfried y cols. (Siegfried et al., 2012) sugieren que la expresión de VEGF resulta directamente de la activación de ER β al ser un gen inducible por E2, de la activación de EGFR a través de la activación de ER β o por ambas vías. El VEGF es un conocido inductor de la expresión de CXCR4. Feng y cols.

(Feng et al., 2011) mostraron que un iRNA de VEGF-C inhibe la expresión de VEGF-C, VEGFR-3 y disminuye la expresión de CXCR4 tanto *in vitro* como *in vivo* en el NSCLC, lo cual demuestra la relación entre estas dos vías. De tal forma que el incremento en CXCR4 posterior al estímulo con estradiol observado en nuestro estudio podría resultar también de la activación de la vía dependiente de VEGF.

La expresión de CXCR4 también puede ser regulada por su ligando, Cui y cols. (CUI Li-qun, 2013) observaron que el nivel de expresión de CXCR4 se asoció significativamente con CXCL12 en una manera dosis dependiente en células de cáncer de mama. Ren y cols. (Ren et al., 2012) comprobaron esta relación en células deciduales estromales, al observar que los niveles de CXCR4 incrementaron significativamente después de la adición de CXCL12, lo cual indica que la quimiocina puede potenciar la transcripción y traducción de CXCR4. Se ha reportado también que los altos niveles de CXCL12 en el microambiente tumoral producidos por las células del estroma y el infiltrado pueden estimular la expresión de CXCR4 (Imai et al., 2010; Wald et al., 2013). Lo anterior muestra que el eje CXCL12/CXCR4 es un sistema de regulación autocrino y paracrino que podría presentarse de igual forma en el cáncer pulmonar.

CXCL12 es un gen blanco de los estrógenos en otros tipos de cáncer, Hall y cols. (Hall y Korach, 2003) mostraron que la expresión de la quimiocina incrementó notablemente en células BG-1 de cáncer de ovario y en las células MCF-7 de cáncer de mama después de la estimulación con la hormona, ésta respuesta fue bloqueada por el fármaco antiestrogénico ICI 182,780 que tiene efecto sobre ER α . La activación de la transcripción de CXCL12 por E2 se explica debido a que existen secuencias parecidas a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) 2-kb río arriba del sitio de inicio de transcripción del gen de CXCL12. En líneas celulares de adenocarcinoma endometrial E2 incrementa la

expresión de CXCL12 y CXCR4 por la desmetilación de sus promotores de islas de CpG (Kubarek y Jagodzinski, 2007). Los estrógenos también inducen la expresión de CXCR4 y CXCL12 a través de modificaciones en el estado de compactación de la cromatina en células de cáncer de mama (Boudot et al., 2011).

Es probable que en las células de ADC pulmonar, CXCL12 también sea un gen inducible por estrógenos, como se ha visto en otros tipos de cáncer hormonodependientes y que mediante esta vía se estimule la expresión de CXCR4 como lo observamos en éste estudio, sin embargo esta es una hipótesis que debe ser probada.

Por otro lado, Rhodes y cols. (Rhodes et al., 2010) mostraron que la vía de señalización de CXCR4 y la de ER están relacionadas. Las células madre mesenquimales de adulto (hMSCs) incrementan la proliferación y migración de las MCF-7 cuando se co-cultivan, y el bloqueo de ER mediante ICI 182,780 disminuye el efecto de las hMSCs sobre las MCF-7, lo cual sugiere un papel de ER en la interacción de las hMSCs y MCF-7. Las hMSCs además secretan CXCL12 y ésta quimiocina favorece la proliferación y migración de las células tumorales, es interesante que el bloqueo de ambas vías (CXCR4 y ER) separadas produce una disminución de la proliferación y migración pero el bloqueo de ambas vías reduce estos eventos al nivel basal observado en la condición control.

De igual forma otros autores han observado la relación entre las vías ER/E2 y CXCR4/CXCL12 en el cáncer de mama, donde CXCL12 que es secretado tanto por las células tumorales como por las células del estroma e infiltrado puede actuar de forma autocrina y paracrina, uniéndose a CXCR4 presente en las células tumorales. La activación de ésta vía quimiocina-receptor estimula a ER (ER α y ER β) en una forma independiente de estrógenos. La activación de ER resulta en la producción de CXCL12 por

las células tumorales, CXCL12 se une a CXCR4 completando la vía de estimulación. En resumen, en el cáncer de mama, no solo ER activa la vía de CXCR4/CXCL12 sino la activación de CXCR4 también promueve la transcripción de ER en presencia y ausencia de ligando (E2) (Rhodes et al., 2010; Saue et al., 2009).

Los estrógenos podrían estimular la expresión de CXCR4 y CXCL12 en el ADC pulmonar a través de la señalización por ER β como ha sido reportado en el cáncer de ovario y mama (Boudot et al., 2011; Hall y Korach, 2003; Rhodes et al., 2010; Saue et al., 2009) y éste podría ser un mecanismo mediante el cual los estrógenos estimulen la carcinogénesis pulmonar.

Es posible que ésta regulación autocrina y paracrina entre ambas vías de señalización E2/ER y CXCR4/CXCL12 se presente en el cáncer de pulmón, lo cual podría explicar por que los ADC de las mujeres premenopáusicas presentan más ER β , más CXCR4 y CXCL12 comparado con las mujeres posmenopáusicas y los hombres, y estos sistemas se verían favorecidos por la mayor concentración de estrógenos en las mujeres premenopáusicas. Sin embargo se requieren más estudios para determinar la relación de éstas dos vías en el cáncer pulmonar, un cáncer que muestra parecido en su comportamiento a otros tipos de cáncer hormonodependientes.

Por otro lado, la localización celular de la quimiocina y su receptor ha sido relacionada con el comportamiento del tumor y con el pronóstico del cáncer, aunque esta relación es aun controvertida (Tabla 3). CXCR4 ha sido identificada por inmunohistoquímica en el núcleo (Minamiya et al., 2010; Na et al., 2008; Spano et al., 2004; Wagner et al., 2009) y en el citoplasma de las células de NSCLC (Su et al., 2005; Wagner et al., 2009). Por otro lado, CXCL12 ha sido identificada en el citoplasma y en la membrana de células de ADC

pulmonar (Wagner et al., 2009). Nosotros identificamos a CXCR4 y CXCL12 en el núcleo y/o en el citoplasma de las células de ADC pulmonar, la inmunopositividad fue heterogénea entre las muestras en todos los grupos analizados no observamos algún patrón de expresión entre los grupos.

Tabla 3. Localización celular de CXCR4 y su asociación con el pronóstico en el cáncer pulmonar.

Receptor	Localización	Asociación con características clinicopatológicas	Referencia
CXCR4	Nuclear	Pronóstico favorable en estadios tempranos de NSCLC	Spano et al., 2004
	Nuclear	Los altos niveles de expresión nuclear en las células tumorales se correlacionan con un pronóstico favorable en pacientes con adenocarcinoma	Minamiya et al., 2010
	Nuclear	Metástasis a nodos	Na et al., 2008
	Nuclear	Buen pronóstico en pacientes con adenocarcinoma	Wagner et al., 2009
	Citomembranosa	Relacionado con estadio IV y mal pronóstico en pacientes con adenocarcinoma	
	Citomembranosa	Metástasis	Su et al., 2005

A pesar de que la localización de éstas proteínas en las células ha sido asociada con el pronóstico del cáncer, el efecto biológico de su localización, el mecanismo por el cual éstas proteínas pueden translocarse al núcleo y su potencial función en éste organelo es desconocido. No obstante Spano y cols. (Spano et al., 2004) sugieren que la presencia de CXCR4 en el núcleo bloquea su habilidad para recibir la señal de CXCL12 en la membrana plasmática, lo cual inhibe la activación de vías de proliferación y metástasis. En ratones se ha mostrado que la retención de CXCR4 en el retículo endoplásmico de células T de hibridoma reduce la metástasis e incrementa la sobrevivencia celular (Zeelenberg et al., 2001).

Kollet y cols. (Kollet et al., 2002) observaron que células madre hematopoyéticas que presentaron CXCR4 intracitoplásmico pero no transmembranal, fueron incapaces de migrar a médula ósea. Lo anterior sugiere que la retención de CXCR4 en compartimientos celulares puede asociarse con el decremento en la migración de células neoplásicas y normales, sin embargo éste es otro punto que necesita ser investigado con mayor detalle, dada la heterogeneidad de la localización de las proteínas en los diferentes grupos.

Finalmente éste trabajo apoya la participación de los estrógenos en el cáncer pulmonar, siendo la expresión de CXCR4 un mecanismo por el cual favorezcan la carcinogénesis. Es necesario fortalecer la investigación en éste campo debido a la actual controversia y a que la creciente evidencia del cáncer de pulmón como un tipo de cáncer hormonodependiente sugiere el uso de terapia antiestrogénica. Nuestro trabajo sugiere evaluar la aplicación de tratamientos más específicos que tomen en cuenta el sexo y la condición hormonal de los pacientes. La identificación de los genes inducidos por los estrógenos en células de ADC pulmonar ER β positivas podría proveer una valiosa herramienta para diseñar esquemas de tratamiento hormonal y predecir la respuesta a éste tratamiento. Asimismo, entender la asociación entre los estrógenos y el eje CXCR4/CXCL12 podría además proveer información para desarrollar nuevos tratamientos para el ADC pulmonar basados en el bloqueo de ambas vías E2/ER β y CXCR4/CXCL12. Este será un campo de suma importancia para la investigación.

CONCLUSIONES

- En nuestra población, el ADC pulmonar se presentó principalmente en mujeres no fumadoras y en hombres fumadores, lo cual demuestra que en las mujeres otros factores independientemente del hábito tabáquico son importantes en la carcinogénesis.
- Las mujeres premenopáusicas presentaron estadios más avanzados y tumores menos diferenciados al momento del diagnóstico comparado con los hombres y las mujeres posmenopáusicas, lo cual apoya el papel de los estrógenos en la progresión del tumor.
- ER β , CXCR4/CXCL12 participan en la carcinogénesis pulmonar tanto en hombres como en mujeres premenopáusicas y posmenopáusicas ya que la mayor expresión de las proteínas se observó en los tejidos de ADC pulmonares comparado con el tejido pulmonar sano.
- La expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 en el ADC pulmonar está relacionada con el sexo y la condición hormonal. La alta expresión de ER β , CXCR4 y CXCL12 en el ADC de mujeres premenopáusicas puede explicar en parte la agresividad del tumor observada en estas pacientes cuando se compara con los tumores de mujeres posmenopáusicas y de hombres como se ha reportado en otros trabajos.
- *In vitro* el 17- β - estradiol fue capaz de estimular la expresión de CXCR4 de manera tiempo y dosis dependiente, lo que demuestra su relación con el eje CXCR4/CXCL12.
- Nuestro trabajo apoya fuertemente el papel de los estrógenos en el cáncer pulmonar.

PERSPECTIVAS

- Debido a que el cáncer pulmonar se comporta diferente por sexo y condición hormonal es necesario realizar más estudios para entender con mayor claridad la biología de esta patología en las mujeres premenopáusicas.
- Investigar si los estrógenos favorecen la carcinogénesis pulmonar al estimular no solo la expresión de CXCR4, sino al activar la vía y favorecer todas las funciones derivadas de ella como la proliferación, la resistencia a la apoptosis, la angiogénesis, la migración y la metástasis.
- Conocer los posibles mecanismos por los cuales los estrógenos podrían estimular la expresión del eje CXCR4/CXCL12 en el cáncer pulmonar.
- Debido a la gran controversia sobre el efecto de los estrógenos en el cáncer pulmonar y a los pocos mecanismos descritos, sería interesante examinar otros mecanismos por los cuales éstas hormonas podrían favorecer la carcinogénesis pulmonar.
- Estudiar la participación de otros receptores de estrógenos en la carcinogénesis pulmonar y evaluar si la expresión de éstos es diferente entre sexo y condición hormonal.

- Realizar estudios clínicos para evaluar la efectividad de la terapia antiestrogénica en pacientes con ADC pulmonares ER β positivos.
- Evaluar la participación de otras hormonas sexuales como la progesterona y testosterona en el cáncer pulmonar.

9. REFERENCIAS

1. **Albain** KS, Unger JM, Gotay CC, Davies M, Edelman M, Herbst RS, Kelly K, Williamson S, Wozniak AJ, Committee SOGL (2007) Toxicity and survival by sex in patients with advance non-small cell lung carcinoma on modern Southwest Oncology Group (SWOG) trials. In: Oncology ASoc (ed) 2007 Anual Meeting Proceedings, vol 25. American Society of Clinical Oncology, p 7549
2. **Applanat** MP, Buteau-Lozano H, Herve MA, Corpet A (2008) Vascular endothelial growth factor is a target gene for estrogen receptor and contributes to breast cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 617:437-444
3. **Baik** CS, Eaton KD (2012) Estrogen signaling in lung cancer: an opportunity for novel therapy. *Cancers (Basel)* 4:969-988
4. **Baumgartner** AK, Hausler A, Seifert-Klauss V, Schuster T, Schwarz-Boeger U, Kiechle M (2011) Breast cancer after hormone replacement therapy--does prognosis differ in perimenopausal and postmenopausal women? *Breast* 20:448-454
5. **Belani** CP, Marts S, Schiller J, Socinski MA (2007) Women and lung cancer: epidemiology, tumor biology, and emerging trends in clinical research. *Lung Cancer* 55:15-23
6. **Belperio** JA, Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Keane M, Strieter R (2004) The SDF-1/CXCL12/CXCR4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Chest* 125:156S
7. **Bertolini** G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, Pratesi G, Fabbri A, Andriani F, Tinelli S, Roz E, Caserini R, Lo Vullo S, Camerini T, Mariani L, Delia D, Calabro E, Pastorino U, Sozzi G (2009) Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16281-16286
8. **Boudot** A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, Samson M, Pakdel F (2011) Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PloS one* 6:e20898
9. **Burger** JA, Stewart DJ (2009) CXCR4 chemokine receptor antagonists: perspectives in SCLC. *Expert Opin Investig Drugs* 18:481-490
10. **Burger** M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Graff A, Silberstein LE, Fujii N, Kipps TJ, Burger JA (2003) Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene* 22:8093-8101
11. **Burns** JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203:2201-2213
12. **Caltagirone** S, Ranelletti FO, Rinelli A, Maggiano N, Colasante A, Musiani P, Aiello FB, Piantelli M (1997) Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity

of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:51-59

13. **Chakraborty S**, Ganti AK, Marr A, Batra SK (2010) Lung cancer in women: role of estrogens. *Expert review of respiratory medicine* 4:509-518

14. **Chang JW**, Asamura H, Kawachi R, Watanabe S (2009) Gender difference in survival of resected non-small cell lung cancer: histology-related phenomenon? *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 137:807-812

15. **Chen F**, Jackson H, Bina WF (2009) Lung adenocarcinoma incidence rates and their relation to motor vehicle density. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18:760-764

16. **Chen Y**, Perng RP, Yang KY, Lin WC, Wu HW, Tsai CM, Whang-Peng J (2000a) Phase II study of tamoxifen, ifosfamide, epirubicin and cisplatin combination chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer failing previous chemotherapy. *Lung Cancer* 29:139-146

17. **Chen YM**, Perng RP, Yang KY, Lin WC, Wu HW, Liu JM, Tsai CM, Whang-Peng J (2000b) A phase II trial of tamoxifen, ifosfamide, epirubicin, and cisplatin combination chemotherapy for inoperable non-small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 23:13-17

18. **Chlebowski RT** (2009) Menopausal hormone therapy, hormone receptor status, and lung cancer in women. *Seminars in oncology* 36:566-571

19. **Chlebowski RT**, Schwartz AG, Wakelee H, Anderson GL, Stefanick ML, Manson JE, Rodabough RJ, Chien JW, Wactawski-Wende J, Gass M, Kotchen JM, Johnson KC, O'Sullivan MJ, Ockene JK, Chen C, Hubbell FA, Women's Health Initiative I (2009) Oestrogen plus progestin and lung cancer in postmenopausal women (Women's Health Initiative trial): a post-hoc analysis of a randomised controlled trial. *Lancet* 374:1243-1251

20. **Choi YH**, Burdick MD, Strieter BA, Mehrad B, Strieter RM (2014) CXCR4, but not CXCR7, discriminates metastatic behavior in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* 12:38-47

21. **CUI Li-qun X-rW**, Zhong-min JIANG, Ming ZHANG, Zhi-cheng YANG, Jin-gang CHEN, Rui MA, Yan-xia LI, Xiao-zhi LIU (2013) CXCL12 inducing the expression of CXCR4 in breast cancer cells and promoting bone metastases. *Tumor* 33:497-501

22. **Damelin M**, Geles KG, Follettie MT, Yuan P, Baxter M, Golas J, DiJoseph JF, Karnoub M, Huang S, Diesl V, Behrens C, Choe SE, Rios C, Gruzdas J, Sridharan L, Dougher M, Kunz A, Hamann PR, Evans D, Armellino D, Khandke K, Marquette K, Tchistiakova L, Boghaert ER, Abraham RT, Wistuba, II, Zhou BB (2011) Delineation of a cellular hierarchy in lung cancer reveals an oncofetal antigen expressed on tumor-initiating cells. *Cancer research* 71:4236-4246

23. **Devesa SS**, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM (2005) International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International journal of cancer Journal international du cancer* 117:294-299

24. **Dratva J**, Gomez Real F, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Gerbase MW, Probst-Hensch NM, Svanes C, Omenaas ER, Neukirch F, Wjst M, Morabia A, Jarvis D, Leynaert B, Zemp E

(2009) Is age at menopause increasing across Europe? Results on age at menopause and determinants from two population-based studies. *Menopause* 16:385-394

25. **Dubey** S, Siegfried JM, Traynor AM (2006) Non-small-cell lung cancer and breast carcinoma: chemotherapy and beyond. *The lancet oncology* 7:416-424

26. **Egleston** BL, Meireles SI, Flieder DB, Clapper ML (2009) Population-based trends in lung cancer incidence in women. *Seminars in oncology* 36:506-515

27. **Eilstein** D, Eshai K (2012) Lung and breast cancer mortality among women in France: future trends. *Cancer epidemiology* 36:e341-348

28. **Feng** Y, Hu J, Ma J, Feng K, Zhang X, Yang S, Wang W, Zhang J, Zhang Y (2011) RNAi-mediated silencing of VEGF-C inhibits non-small cell lung cancer progression by simultaneously down-regulating the CXCR4, CCR7, VEGFR-2 and VEGFR-3-dependent axes-induced ERK, p38 and AKT signalling pathways. *Eur J Cancer* 47:2353-2363

29. **Freedman** ND, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC (2008) Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. *The lancet oncology* 9:649-656

30. **Gangadhar** T, Nandi S, Salgia R (2010) The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer. *Cancer Biol Ther* 9:409-416

31. **Ganti** AK, Sahmoun AE, Panwalkar AW, Tendulkar KK, Potti A (2006) Hormone replacement therapy is associated with decreased survival in women with lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:59-63

32. **Globocan** (2012) Lung Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012 Summary. In: (IARC) G (ed) Section of Cancer Information, vol 2014. IARC, Lyon France

33. **Greiser** CM, Greiser EM, Doren M (2010) Menopausal hormone therapy and risk of lung cancer-Systematic review and meta-analysis. *Maturitas* 65:198-204

34. **Hall** JM, Korach KS (2003) Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Molecular endocrinology* 17:792-803

35. **Hartmann** TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M (2005) CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene* 24:4462-4471

36. **Herbst** RS, Heymach JV, Lippman SM (2008) Lung cancer. *N Engl J Med* 359:1367-1380

37. **Hernandez-Garduno** E, Brauer M, Perez-Neria J, Vedal S (2004) Wood smoke exposure and lung adenocarcinoma in non-smoking Mexican women. *Int J Tuberc Lung Dis* 8:377-383

38. **Hershberger** PA, Stabile LP, Kanterewicz B, Rothstein ME, Gubish CT, Land S, Shuai Y, Siegfried JM, Nichols M (2009) Estrogen receptor beta (ERbeta) subtype-specific ligands

increase transcription, p44/p42 mitogen activated protein kinase (MAPK) activation and growth in human non-small cell lung cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 116:102-109

39. **Hill** MO (1974) Correspondence analysis: a neglected multi- variate method. . *Appl Stat* 3:340-354

40. **Hsu** LH, Chu NM, Liu CC, Tsai SY, You DL, Ko JS, Lu MC, Feng AC (2009) Sex-associated differences in non-small cell lung cancer in the new era: is gender an independent prognostic factor? *Lung Cancer* 66:262-267

41. **Huang** YC, Hsiao YC, Chen YJ, Wei YY, Lai TH, Tang CH (2007) Stromal cell-derived factor-1 enhances motility and integrin up-regulation through CXCR4, ERK and NF-kappaB-dependent pathway in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* 74:1702-1712

42. **Ilvesaro** JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, Selander KS (2007) Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate* 67:774-781

43. **Imai** H, Sunaga N, Shimizu Y, Kakegawa S, Shimizu K, Sano T, Ishizuka T, Oyama T, Saito R, Minna JD, Mori M (2010) Clinicopathological and therapeutic significance of CXCL12 expression in lung cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23:153-164

44. **INEGI** INdEG (2013) Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos Nacionales. INEGI, México

45. **Ivanova** MM, Mazhawidza W, Dougherty SM, Klinge CM (2010) Sex differences in estrogen receptor subcellular location and activity in lung adenocarcinoma cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42:320-330

46. **Iwakiri** S, Mino N, Takahashi T, Sonobe M, Nagai S, Okubo K, Wada H, Date H, Miyahara R (2009) Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 115:2580-2593

47. **Jarzynka** MJ, Guo P, Bar-Joseph I, Hu B, Cheng SY (2006) Estradiol and nicotine exposure enhances A549 bronchioloalveolar carcinoma xenograft growth in mice through the stimulation of angiogenesis. *International journal of oncology* 28:337-344

48. **Jung** MJ, Rho JK, Kim YM, Jung JE, Jin YB, Ko YG, Lee JS, Lee SJ, Lee JC, Park MJ (2013) Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 32:209-221

49. **Kadara** H, Kabbout M, Wistuba, II (2012) Pulmonary adenocarcinoma: a renewed entity in 2011. *Respirology* 17:50-65

50. **Katcoff** H, Wenzlaff AS, Schwartz AG (2014) Survival in women with NSCLC: the role of reproductive history and hormone use. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 9:355-361

51. **Kijima** T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, Sattler M, Johnson BE, Salgia R (2002) Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer research* 62:6304-6311
52. **Kiyohara** C, Ohno Y (2010) Sex differences in lung cancer susceptibility: a review. *Gend Med* 7:381-401
53. **Kollet** O, Petit I, Kahn J, Samira S, Dar A, Peled A, Deutsch V, Gunetti M, Piacibello W, Nagler A, Lapidot T (2002) Human CD34(+)CXCR4(-) sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation. *Blood* 100:2778-2786
54. **Kubarek** L, Jagodzinski PP (2007) Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS letters* 581:1441-1448
55. **Lara** PN, Jr., Gandara DR, Longmate J, Gumerlock PH, Lau DH, Edelman MJ, Gandour-Edwards R, Mack PC, Israel V, Raschko J, Frankel P, Perez EA, Lenz HJ, Doroshow JH (2001) Activity of high-dose toremifene plus cisplatin in platinum-treated non-small-cell lung cancer: a phase II California Cancer Consortium Trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 48:22-28
56. **Lee** YL, Kuo WH, Lin CW, Chen W, Cheng WE, Chen SC, Shih CM (2011) Association of genetic polymorphisms of CXCL12/SDF1 gene and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and prognosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 73:147-152
57. **Liang** Z, Brooks J, Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, Shim H (2007) CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 359:716-722
58. **Liaw** YP, Ting TF, Ho KK, Yang CF (2008) Cell type specificity of lung cancer associated with air pollution. *Sci Total Environ* 395:23-27
59. **Liu** Y, Inoue M, Sobue T, Tsugane S (2005) Reproductive factors, hormone use and the risk of lung cancer among middle-aged never-smoking Japanese women: a large-scale population-based cohort study. *International journal of cancer Journal international du cancer* 117:662-666
60. **Luker** KE, Steele JM, Mihalko LA, Ray P, Luker GD (2010) Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene* 29:4599-4610
61. **Mah** V, Marquez D, Alavi M, Maresh EL, Zhang L, Yoon N, Horvath S, Bagryanova L, Fishbein MC, Chia D, Pietras R, Goodglick L (2011) Expression levels of estrogen receptor beta in conjunction with aromatase predict survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 74:318-325
62. **Malvezzi** M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E (2012) European cancer mortality predictions for the year 2012. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 23:1044-1052

63. **Marquez-Garban** DC, Mah V, Alavi M, Maresh EL, Chen HW, Bagryanova L, Horvath S, Chia D, Garon E, Goodglick L, Pietras RJ (2011) Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids* 76:910-920
64. **Miao** Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15735-15740
65. **Miki** Y, Abe K, Suzuki S, Suzuki T, Sasano H (2011) Suppression of estrogen actions in human lung cancer. *Molecular and cellular endocrinology* 340:168-174
66. **Minami** H, Yoshimura M, Miyamoto Y, Matsuoka H, Tsubota N (2000) Lung cancer in women: sex-associated differences in survival of patients undergoing resection for lung cancer. *Chest* 118:1603-1609
67. **Minamiya** Y, Saito H, Takahashi N, Ito M, Imai K, Ono T, Motoyama S, Ogawa J (2010) Expression of the chemokine receptor CXCR4 correlates with a favorable prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 68:466-471
68. **Mollerup** S, Jorgensen K, Berge G, Haugen A (2002) Expression of estrogen receptors alpha and beta in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer* 37:153-159
69. **Moore** KA, Mery CM, Jaklitsch MT, Estocin AP, Bueno R, Swanson SJ, Sugarbaker DJ, Lukanich JM (2003) Menopausal effects on presentation, treatment, and survival of women with non-small cell lung cancer. *The Annals of thoracic surgery* 76:1789-1795
70. **Murillo-Ortiz** B, Perez-Luque E, Malacara JM, Daza-Benitez L, Hernandez-Gonzalez M, Benitez-Bribiesca L (2008) Expression of estrogen receptor alpha and beta in breast cancers of pre- and post-menopausal women. *Pathology oncology research: POR* 14:435-442
71. **Na** IK, Scheibenbogen C, Adam C, Stroux A, Ghadjar P, Thiel E, Keilholz U, Coupland SE (2008) Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. *Human pathology* 39:1751-1755
72. **Navaratnam** S, Skliris G, Qing G, Banerji S, Badiani K, Tu D, Bradbury PA, Leighl NB, Shepherd FA, Nowatzki J, Demers A, Murphy L (2012) Differential role of estrogen receptor beta in early versus metastatic non-small cell lung cancer. *Horm Cancer* 3:93-100
73. **Niikawa** H, Suzuki T, Miki Y, Suzuki S, Nagasaki S, Akahira J, Honma S, Evans DB, Hayashi S, Kondo T, Sasano H (2008) Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:4417-4426
74. **NORMA Oficial Mexicana** NOM-035-SSA2-2002 (2003) PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES EN LA PERIMENOPAUSIA Y POSTMENOPAUSIA DE LA MUJER. CRITERIOS PARA BRINDAR LA ATENCIÓN MÉDICA. *Diario Oficial de la Federación, Mexico*, pp 13-34

75. **Novaes** FT, Cataneo DC, Ruiz Junior RL, Defaveri J, Michelin OC, Cataneo AJ (2008) Lung cancer: histology, staging, treatment and survival. *Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* 34:595-600
76. **Novello** S, Vavala T (2008) Lung cancer and women. *Future oncology* 4:705-716
O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ (2008) Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J* 409:635-649
77. **Omoto** Y, Kobayashi Y, Nishida K, Tsuchiya E, Eguchi H, Nakagawa K, Ishikawa Y, Yamori T, Iwase H, Fujii Y, Warner M, Gustafsson JA, Hayashi SI (2001) Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochemical and biophysical research communications* 285:340-347
78. **Oton** AB, Belani C, Cai C, Owonikoko T, Gooding W, Siegfried J, Ramalingam S (2006) Comparison of survival for non-small cell lung cancer (NSCLC) between premenopausal and postmenopausal women: An analysis of the National Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Database. In: *Oncology ASoc (ed) 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings*, vol 24. American Society of Clinical Oncology, p 7038
79. **Pesatori** AC, Carugno M, Consonni D, Hung RJ, Papadopoulos A, Landi MT, Brenner H, Muller H, Harris CC, Duell EJ, Andrew AS, McLaughlin JR, Schwartz AG, Wenzlaff AS, Stucker I (2013) Hormone use and risk for lung cancer: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Br J Cancer* 109:1954-1964
80. **Phillips** RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM (2003) The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *American journal of respiratory and critical care medicine* 167:1676-1686
81. **Pietras** RJ, Marquez DC, Chen HW, Tsai E, Weinberg O, Fishbein M (2005) Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and non-small cell lung cancer cells. *Steroids* 70:372-381
82. **Pitz** MW, Musto G, Navaratnam S (2013) Sex as an independent prognostic factor in a population-based non-small cell lung cancer cohort. *Can Respir J* 20:30-34
83. **Powell** HA, Iyen-Omofoman B, Hubbard RB, Baldwin DR, Tata LJ (2013) The association between smoking quantity and lung cancer in men and women. *Chest* 143:123-129
84. **Raman** D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A (2007) Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 256:137-165
85. **Rapiti** E (2009) Reduced lung cancer mortality risk among breast cancer patients treated with anti-estrogens. . 32nd CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium Abstract 35
86. **Rasband** W (2012) ImageJ,. US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,
87. **Remon** J, Molina-Montes E, Majem M, Lianes P, Isla D, Garrido P, Felip E, Vinolas N, de Castro J, Artal A, Sanchez MJ (2013) Lung cancer in women: an overview with special focus on

Spanish women. *Clinical & translational oncology* : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico

88. **Ren L**, Liu YQ, Zhou WH, Zhang YZ (2012) Trophoblast-derived chemokine CXCL12 promotes CXCR4 expression and invasion of human first-trimester decidual stromal cells. *Hum Reprod* 27:366-374

89. **Rhodes LV**, Antoon JW, Muir SE, Elliott S, Beckman BS, Burow ME (2010) Effects of human mesenchymal stem cells on ER-positive human breast carcinoma cells mediated through ER-SDF-1/CXCR4 crosstalk. *Mol Cancer* 9:295

90. **Robertson JA**, Farnell Y, Lindahl LS, Ing NH (2002) Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message. *Journal of molecular endocrinology* 29:125-135

91. **Rodriguez-Lara V**, Pena-Mirabal E, Baez-Saldana R, Esparza-Silva AL, Garcia-Zepeda E, Carbon Cervantes MA, Diaz D, Fortoul TI (2014) Estrogen Receptor Beta and CXCR4/CXCL12 Expression: Differences by Sex and Hormonal Status in Lung Adenocarcinoma. *Arch Med Res*

92. **Ross H OF**, Bandstra B, et al. (2007) Serum-free estradiol (E2) levels are prognostic in men with chemotherapy-naïve advanced non-small cell lung cancer and performance status (PS) 2. *J Clin Oncol (Meeting Abstr)* 25:7683.

93. **Saceda M**, Lindsey RK, Solomon H, Angeloni SV, Martin MB (1998) Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 66:113-120

94. **Sauve K**, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A (2009) Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer research* 69:5793-5800

95. **Schwartz AG**, Prysak GM, Murphy V, Lonardo F, Pass H, Schwartz J, Brooks S (2005) Nuclear estrogen receptor beta in lung cancer: expression and survival differences by sex. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11:7280-7287

96. **Shen H**, Yuan Y, Sun J, Gao W, Shu YQ (2010) Combined tamoxifen and gefitinib in non-small cell lung cancer shows antiproliferative effects. *Biomed Pharmacother* 64:88-92

97. **Siegfried JM**, Gubish CT, Rothstein ME, Henry C, Stabile LP (2012) Combining the multitargeted tyrosine kinase inhibitor vandetanib with the antiestrogen fulvestrant enhances its antitumor effect in non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology* : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer 7:485-495

98. **Siegfried JM**, Hershberger PA, Stabile LP (2009) Estrogen receptor signaling in lung cancer. *Seminars in oncology* 36:524-531

99. **Slatore CG**, Chien JW, Au DH, Satia JA, White E (2010) Lung cancer and hormone replacement therapy: association in the vitamins and lifestyle study. *Journal of clinical oncology* : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28:1540-1546

100. **Spano** JP, Andre F, Morat L, Sabatier L, Besse B, Combadiere C, Deterre P, Martin A, Azorin J, Valeyre D, Khayat D, Le Chevalier T, Soria JC (2004) Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 15:613-617
101. **Stabile** LP, Dacic S, Land SR, Lenzner DE, Dhir R, Acquafondata M, Landreneau RJ, Grandis JR, Siegfried JM (2011) Combined analysis of estrogen receptor beta-1 and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17:154-164
102. **Stabile** LP, Davis AL, Gubish CT, Hopkins TM, Luketich JD, Christie N, Finkelstein S, Siegfried JM (2002) Human non-small cell lung tumors and cells derived from normal lung express both estrogen receptor alpha and beta and show biological responses to estrogen. *Cancer research* 62:2141-2150
103. **Stahel** RA (2007) Adenocarcinoma, a molecular perspective. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18 Suppl 9:ix147-149
104. **Su** L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, Xiong S (2005) Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11:8273-8280
105. **Sun** X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ, Wang J (2010) CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 29:709-722
106. **Suzuki** M, Mohamed S, Nakajima T, Kubo R, Tian L, Fujiwara T, Suzuki H, Nagato K, Chiyo M, Motohashi S, Yasufuku K, Iyoda A, Yoshida S, Sekine Y, Shibuya K, Hiroshima K, Nakatani Y, Yoshino I, Fujisawa T (2008) Aberrant methylation of CXCL12 in non-small cell lung cancer is associated with an unfavorable prognosis. *International journal of oncology* 33:113-119
107. **Taioli** E, Wynder EL (1994) Re: Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J Natl Cancer Inst* 86:869-870
108. **Taylor** AH, Al-Azzawi F (2000) Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *Journal of molecular endocrinology* 24:145-155
109. **Thomas** L, Doyle LA, Edelman MJ (2005) Lung cancer in women: emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest* 128:370-381
110. **Thompson** CA, Waldhor T, Schernhammer ES, Hackl M, Vutuc C, Haidinger G (2012) Smoking and lung cancer: current trends in Austria. *Wiener klinische Wochenschrift* 124:493-499
111. **Turner** MC, Krewski D, Pope CA, 3rd, Chen Y, Gapstur SM, Thun MJ (2011) Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184:1374-1381

112. **Vladusic** EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lakins J, Lupu R (2000) Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines. *Oncology reports* 7:157-167
113. **Wagner** PL, Hyjek E, Vazquez MF, Meherally D, Liu YF, Chadwick PA, Rengifo T, Sica GL, Port JL, Lee PC, Paul S, Altorki NK, Saqi A (2009) CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 137:615-621
114. **Wakelee** HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, Holmberg L, Yong LC, Kolonel LN, Gould MK, West DW (2007) Lung cancer incidence in never smokers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25:472-478
115. **Wald** O, Izhar U, Amir G, Avniel S, Bar-Shavit Y, Wald H, Weiss ID, Galun E, Peled A (2006) CD4+CXCR4highCD69+ T cells accumulate in lung adenocarcinoma. *J Immunol* 177:6983-6990
116. **Wald** O, Izhar U, Amir G, Kirshberg S, Shlomai Z, Zamir G, Peled A, Shapira OM (2011) Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: role in non-small cell lung cancer tumor proliferation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 141:1503-1512
117. **Wald** O, Shapira OM, Izhar U (2013) CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential. *Theranostics* 3:26-33
118. **Wang** T, Nelson RA, Bogardus A, Grannis FW, Jr. (2010) Five-year lung cancer survival: which advanced stage nonsmall cell lung cancer patients attain long-term survival? *Cancer* 116:1518-1525
119. **Wang** XR, Chiu YL, Qiu H, Au JS, Yu IT (2009) The roles of smoking and cooking emissions in lung cancer risk among Chinese women in Hong Kong. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20:746-751
120. **Weiss** JM, Lacey JV, Jr., Shu XO, Ji BT, Hou L, Yang G, Li H, Rothman N, Blair A, Gao YT, Chow WH, Zheng W (2008) Menstrual and reproductive factors in association with lung cancer in female lifetime nonsmokers. *Am J Epidemiol* 168:1319-1325
121. **WHO** (1998) Guidelines for Controlling and Monitoring the Tobacco Epidemic. World Health Organization, Geneva First published
122. **Wu** CT, Chang YL, Shih JY, Lee YC (2005) The significance of estrogen receptor beta in 301 surgically treated non-small cell lung cancers. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 130:979-986
123. **Wu** W, Yin ZH, Guan P, Ren YW, Zhou BS (2014) Association of Oral Contraceptives Use and Lung Cancer Risk among Women: an Updated Meta-analysis Based on Cohort and Case-control Studies. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:1205-1210

124. **Xu** L, Zhou Y, Liu Q, Luo JM, Qing M, Tang XY, Yao XS, Wang CH, Wen ZK (2009) CXCR4/SDF-1 pathway is crucial for TLR9 agonist enhanced metastasis of human lung cancer cell. *Biochemical and biophysical research communications* 382:571-576
125. **Yang** P, Cerhan JR, Vierkant RA, Olson JE, Vachon CM, Limburg PJ, Parker AS, Anderson KE, Sellers TA (2002) Adenocarcinoma of the lung is strongly associated with cigarette smoking: further evidence from a prospective study of women. *Am J Epidemiol* 156:1114-1122
126. **Youlden** DR, Cramb SM, Baade PD (2008) The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 3:819-831
127. **Yu** IT, Chiu YL, Au JS, Wong TW, Tang JL (2006) Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women. *Cancer research* 66:4961-4967
128. **Zeelenberg** IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E (2001) Retention of CXCR4 in the endoplasmic reticulum blocks dissemination of a T cell hybridoma. *J Clin Invest* 108:269-277
129. **Zhang** G, Liu X, Farkas AM, Parwani AV, Lathrop KL, Lenzner D, Land SR, Srinivas H (2009) Estrogen receptor beta functions through nongenomic mechanisms in lung cancer cells. *Molecular endocrinology* 23:146-156
130. **Zhao** G, Zhao S, Wang T, Zhang S, Lu K, Yu L, Hou Y (2011) Estrogen receptor beta signaling regulates the progression of Chinese non-small cell lung cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 124:47-57

10. Apéndice

Artículo Aprobado por el Comité Académico:

Vianey Rodríguez-Lara, Erika Peña-Mirabal, Renata Baez-Saldaña, Ana Luisa Esparza-Silva, Eduardo García-Zepeda, Marco Antonio Cerbon Cervantes, Daniel Diaz, Teresa Imelda Fortoul. Estrogen Receptor Beta and CXCR4/CXCL12 Expression: Differences by Sex and Hormonal Status in Lung Adenocarcinoma. *Archives of Medical Research* 2014, 45 (2):158-169.

DOI: 10.1016/j.arcmed.2014.01.001 PMID: 24486245



February 2014

Volume 45, Number 2

Archives of Medical Research

Official Journal of the Instituto Mexicano del Seguro Social

IN THIS ISSUE

Review Article

Role of Calpain-10 in Diabetes Mellitus

Biomedical

1800 MHz GSM-like EMR and Fracture Healing

Clinical

Sex and Hormonal Status Affect ER β and CXCR4/CXCL12
Expression in Lung Adenocarcinoma



ISSN 0188-4409



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



ORIGINAL ARTICLE

Estrogen Receptor Beta and CXCR4/CXCL12 Expression: Differences by Sex and Hormonal Status in Lung Adenocarcinoma

Vianey Rodríguez-Lara,^a Erika Peña-Mirabal,^b Renata Baez-Saldaña,^b Ana Luisa Esparza-Silva,^c Eduardo García-Zepeda,^c Marco Antonio Cerbon Cervantes,^d Daniel Díaz,^e and Teresa Imelda Fortoul^a

^aDepartamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F., Mexico

^bInstituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", México, D.F., Mexico

^cDepartamento de Inmunología, ^dDepartamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, D.F., México

^eFacultad de Química, UNAM, Mexico

Received for publication August 19, 2013; accepted January 10, 2014 (ARCMED-D-13-00456).

Background and Aims. Studies have reported differences in lung cancer behavior between sex and hormonal status that suggest a role of estrogens and estrogen receptor beta (ER β) in lung carcinogenesis. In some types of hormone-dependent cancer, estrogens may regulate CXCL12/CXCR4 expression through ER β signaling. High expression of CXCL12/CXCR4 is associated with poor prognosis in lung cancer because it promotes tumor growth and metastasis. Therefore, in this study we investigated whether lung adenocarcinoma tissues from pre- and postmenopausal women and from men exhibit different ER β , CXCR4/CXCL12 expression and whether this expression is associated with clinicopathological features.

Methods. Sixty primary tumor samples of lung adenocarcinoma from pre- and postmenopausal women and from men were collected for this study. Thirty samples of healthy lung tissue adjacent to the tumor site were used as controls. ER β and CXCL12/CXCR4 expression was analyzed by immunohistochemistry. Expression of these proteins was measured by digital image software and compared between sex and hormonal status.

Results. Lung adenocarcinomas overexpressed ER β , CXCR4 and CXCL12 compared to normal lung. Moreover, lung adenocarcinomas from premenopausal women exhibited higher signals for ER β , CXCL12 and CXCR4 compared to postmenopausal women and to men, who showed lower signals for these proteins. A multivariate analysis revealed a strong association between the immunoreactivity level of ER β , CXCL12/CXCR4 and both sex and hormonal status, but not with tumor stage and smoking.

Conclusion. These results demonstrated that ER β and CXCL12/CXCR4 expression in lung adenocarcinoma depends on sex and hormonal status, which may partly explain the sex and hormonal differences in lung cancer behavior. © 2014 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Lung cancer, premenopausal women, estrogen, CXCL12/CXCR4, ER β .

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths among males and the second leading cause among females

worldwide (1,2). The incidence of lung cancer is increasing in women worldwide and currently represents the leading cause of cancer death among women in Europe and the U.S., surpassing breast and cervical cancer (3–12).

Lung adenocarcinoma (ADC) is currently the most common histological type of lung cancer (13,14) and is the major type of lung cancer in women, young people and non-smokers (5,10,15–22). Recently, however, smoking has been increasingly associated with adenocarcinoma (10). In addition, there is growing evidence suggesting that

Address reprint requests to: Vianey Rodríguez-Lara, Departamento de Biología Celular y Tisular, Edificio A 3er piso, Facultad de Medicina, UNAM, México City, México. CP 04510, Mexico; Phone: (+52) (55) 56232182; FAX: (+52) (55) 56232399; E-mail: vianeyrodriguezlara@yahoo.com.mx

sex and hormonal status may influence the risk and behavior of lung cancer. In this regard, among smokers and non-smokers, women appear to have a higher incidence and risk for lung cancer, especially ADC, than men (23–26). In addition, Stabile and co-workers (27) showed that premenopausal women have a higher incidence of lung ADC and poorer survival than postmenopausal women. Other studies have also shown greater survival in postmenopausal women compared to premenopausal women with lung ADC (28,29). Furthermore, it has been reported that premenopausal women frequently presented with a more advanced clinical stage, less favorable histology (adenocarcinoma), and poorly differentiated tumors compared to postmenopausal women and men (29,30). In contrast, some reports show increased survival in women compared to men (31–33), but these reports included only or mainly women who were 60 years old or older (postmenopausal) in whom the effects of sex hormones on lung cancer behavior cannot be evaluated.

On the other hand, there is evidence suggesting that estrogens play an important role in the pathogenesis of lung cancer, especially ADC in women (34); therefore, the role of these hormones is still contradictory. It is known that lung cancer cells produce estrogens (35,36) through aromatase enzyme activity, and the expression of this enzyme has been detected in both non-small cell lung cancer (NSCLC) tissues and cell lines. High aromatase expression has been related to poor prognosis in postmenopausal women (37). Lung cancer cells also express both estrogen receptors α (ERα) and β (ERβ). However, the latter is highly expressed in lung cancer (38,39) and is associated with biological functions because it mediates the genomic and non-genomic responses to estrogens which, in turn, are associated with carcinogenic process (34,35,40–42). Moreover, it has been reported that the expression of ERβ isoforms, mainly ERβ1, has a significant impact on the clinical outcome of NSCLC based on the disease stage and/or treatment (43). Estrogens promote proliferation and resistance to apoptosis (34,38,44). In breast and ovarian cancer in which the effects of estrogen have been well studied, it has been reported that ERβ signaling influences the expression of CXCL12 through ERβ signaling (45–48). In lung cancer, SDF-α or CXCL12 chemokine and its receptor CXCR4 play an important role in the migration and metastasis of neoplastic cells. NSCLC cells expressing CXCR4 migrate to the lymph nodes, liver, contralateral lung, brain and bone marrow, all of which express high levels of CXCL12 (45–47,49). In addition, CXCL12 and CXCR4 promote cell proliferation, tumor growth and angiogenesis (48,49); CXCR4 also appears to play a critical role in the biology of cancer stem cells in NSCLC (48). As a consequence, high expression of CXCL12 and CXCR4 is correlated with poor prognosis in NSCLC (50).

Because there are data suggesting that women, mainly premenopausal women, may have a poorer prognosis with

less differentiated and more advanced stages in lung cancer and given the importance of CXCL12/CXCR4 in this process, the aim of this study was to determine whether there are differences in the expression of CXCL12 and CXCR4 in a series of primary adenocarcinomas from premenopausal women, postmenopausal women and men. Additionally, we analyzed ERβ expression in these groups because of the importance of estrogen and ERβ signaling on the expression of this chemokine and its receptor. Finally, we investigated whether there is an association between the clinicopathological features of patients and expression of these proteins.

Materials and Methods

Patients and Tissue Sample Selection

A series of 60 primary lung adenocarcinoma tumor samples derived from biopsies was obtained from the Pathology Unit of the National Institute of Respiratory Diseases “Ismael Cosío Villegas” (Mexico City, Mexico). The tissue sections from selected patients were diagnosed and reviewed by at least two pathologists to confirm the diagnosis. Medical records were consulted to obtain the following information about each patient: sex, age, menopausal status, cancer stage (according to TNM stage of lung cancer), smoking history, residence, occupation and previous exposure to other toxins. Patients with other lung pathologies in addition to lung cancer were excluded. All patients included in the study were Mexicans and had no history of previous cancer treatment (Table 1).

Lung adenocarcinoma samples from 20 premenopausal, 20 postmenopausal women and 20 samples from men were

Table 1. Clinicopathological features of patients

Total patients (60)			
Sex	Female		Male
	Premenopausal (n = 20)	Postmenopausal (n = 20)	- (n = 20)
Hormonal status			
Age (years)			
Range	30–48	55–80	30–80
Mean	41	65	55
Smoking history (%)			
Smoker	20	10	90
Nonsmoker	70	80	10
Passive smoker	10	10	0
Differentiation status (%)			
Poorly differentiated	40	30	20
Moderately differentiated	40	35	65
Well differentiated	20	35	15
Tumor stage (%)			
Stage I	5	20	0
Stage II	0	10	0
Stage III	10	0	40
Stage IV	85	70	60

selected to identify whether the expression of the CXCL12/CXCR4 axis and ER β is different in tumors and whether they are affected by sex and hormonal status.

Women with lung adenocarcinoma were between 30 and 80 years old. The patients were defined as postmenopausal when they have naturally experienced 12 consecutive months without menstruation. Patients were defined as premenopausal if they showed normal menstrual periods at the time of diagnosis (51–53). Patients who had undergone ovariectomy or experienced hormonal dysfunctions were excluded from this study as well as postmenopausal patients with record of hormone replacement therapy. On the other hand, men with lung adenocarcinoma were between 30 and 80 years old. Postmenopausal women and men were utilized in this study to compare the effects of estrogen on CXCL12/CXCR4 and ER β expression (Table 1).

According to standardized guidelines for smoking measurement (54), we defined any patient who smoked 100 or more cigarettes in his or her lifetime and currently smokes as a smoker. A person was defined as a non-smoker if he or she had either never smoked at all or had never been a daily smoker and had smoked less than 100 cigarettes in his or her lifetime. Non-smoking women and men who lived with smokers and reported being exposed to secondhand smoke were defined as passive smokers (Table 1).

Thirty samples of healthy lung tissue adjacent to the tumor sites were used as controls. Ten of these samples corresponded to lung tissue from premenopausal women, ten samples were from postmenopausal women and ten samples were from men. We used the above criteria to classify the control women as pre- or postmenopausal.

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Research and Ethics Committee from the National Institute of Respiratory Diseases of Mexico and the Faculty of Medicine, UNAM Mexico. Clinicopathological data from the 60 lung cancer patients are summarized in Table 1.

Immunohistochemical Staining

The expression of ER β , CXCR4 and CXCL12 in normal lung tissue and primary lung cancer samples was assessed by immunohistochemistry. The samples were fixed in formalin and embedded in paraffin. For immunostaining, 5- μ m tissue sections were cut from the paraffin blocks and placed on poly-L-lysine (Sigma, St Louis, MO) coated slides. Tissue sections were dewaxed in xylene, rehydrated through graded alcohol to water, and subjected to pressure (120 lb) and heat-induced epitope retrieval methods. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) for 20 min prior to incubation with the appropriate antibodies. Anti-human ER β polyclonal antibody (Ab; 1:500 dilution, ab3577 Abcam, Cambridge, MA), anti-human CXCR4 polyclonal antibody (Ab; 1:100 dilution, ab2074 Abcam) and anti-human

CXCL12 polyclonal antibody (Ab; 1:200 dilution, ab80118 Abcam) were incubated for 30 min at 37°C. Secondary antibody (biotinylated goat-anti-rabbit, sc-2053 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and HRP-streptavidin complex (sc-2053 Santa Cruz Biotechnology) were used. The sections were washed in phosphate-buffered saline (PBS) after being treated with each reagent and antibody. The color was developed with diaminobenzidine (Zymed Laboratories, San Francisco, CA). The sections were counterstained with hematoxylin and mounted. The negative controls were obtained by replacing the primary antibody with PBS.

Evaluation of Immunostaining

Two observers independently performed immunoreactivity analysis of ER β , CXCR4 and CXCL12. Immunoreactivity was assessed on the tissue sections by color densitometry with an image analyzer using Image-Pro-Plus software (v. 6.0 Media Cybernetics, Silver Spring, MD) coupled to a digital camera (Evolution MP Color, Media Cybernetics, Canada) on a light microscope (Olympus BX51, Tokyo, Japan). From each sample, five randomly selected tissue areas (76.241 mm²) at 100x magnification were evaluated for color density; positive staining was defined as the presence of an ochre color. Digital image software measures the total of ochre color that exists in the tissue area, whether the staining is in the nucleus or the cytoplasm. The color intensity was reported in pixel units (55).

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was conducted to determine differences in protein expression between groups (Prism 6.0, GraphPad Software). Tukey's post-hoc test was applied to determine if the protein expression in lung cancer tissue was different from that of normal lung tissue in each group. This statistical test was also used to determine whether the protein expression was different between lung cancer tissues from premenopausal women, postmenopausal women and men. In all cases, $p < 0.001$ was considered as significant.

In addition, a correspondence analysis (56) was used to determine the pattern of association between sex and hormonal status, tumor stage, smoking habit, and the level of ER β , CXCR4 and CXCL12 immunoreactivity (low, medium or high) revealed by densitometry of immunohistochemical staining of lung ADC samples. For each protein, the level of immunoreactivity was obtained from the frequency distribution of the color densitometry values of all samples. For this, cut-off values were set at 33% and 66%. Thus, densitometry values <33% percentile were defined as low immunoreactivity. Meanwhile densitometry values >33 and <66% percentile were defined as medium immunoreactivity and, finally, densitometry values >66% were categorized as high immunoreactivity.

Correspondence analysis is a reliable descriptive method to determine the relationship between specific groups and level of immunoreactivity of proteins. The analysis was applied using the frequency of incidence of each sex and hormonal status group with respect to the level of immunoreactivity of each protein together with the respective association of smoking habits and tumor stage. The analysis uses a χ^2 -calculated distance to assess the association between the groups and the level of protein immunoreactivity. Based on these distances, the correspondence analysis registers two sets of immunoreactivity combinations from which a score was calculated for each group. The first combination (first factor or Dim 1) defined a scale of variation that allowed the highest discrimination between groups. The second combination (second factor or Dim 2) defined the maximum dispersion between uncorrelated groups and the level of immunoreactivity. Each combination helped explain a percentage of the total variance displayed in the data set. The result is displayed in an X-Y plot that represents the second and first factors, respectively. The graph's coordinates are the calculated scores for both factors and represent the sex and hormonal status groups and levels of immunoreactivity. There is a direct correspondence or a greater association between two adjacent positions (56).

Results

Clinicopathological Features of Patients

Sixty patients diagnosed with lung ADC were included in the present study. The average age of premenopausal women was 41 years (range: 30–48 years), the average age of the postmenopausal women was 65 years (range: 55–80 years) and the average age of the male patients was 55 years (Table 1). Our results show that both pre- and postmenopausal women with lung ADC were predominantly nonsmokers (70% and 80%, respectively). On the contrary, only 10% of men with lung ADC were nonsmokers. In addition, it was observed that a higher percentage of premenopausal women with ADC were in stage IV at the time of diagnosis (85%) compared to postmenopausal women (70%) and male patients (60%). In addition, premenopausal women frequently (40%) displayed poorly differentiated adenocarcinomas compared to the other groups (Table 1).

Differential ER β Expression in Normal Lung and Lung Adenocarcinomas

A basal expression of ER β was observed in normal lung tissue in all analyzed groups (Figures 1A, 1C, 1E). Densitometric analysis showed that the average pixel density for ER β in normal premenopausal lung was 45.73 pixels, whereas for postmenopausal it was 22.80 and 22.06 for

men, but no significant differences between groups were observed (Figure 1G).

ER β expression in lung ADC cells was also present in samples from both women and men. The immunoreactivity of this protein was higher ($p < 0.001$) in tumor samples than in normal lung samples (Figure 1). Additionally, among the tumors, the highest staining intensity was clearly observed in the adenocarcinoma samples from premenopausal women (Figure 1B), whereas a lower positivity was observed in the neoplastic cells from postmenopausal women (Figure 1D). The lowest receptor staining was found in lung adenocarcinoma cells from men (Figure 1F). A semiquantitative analysis revealed that the average pixel density of ER β expression in ADC from pre- and postmenopausal women and from men was 176.19, 97.77, and 52.88 pixels, respectively (Figure 1G). ANOVA and Tukey's post-hoc test analyses showed that the tumors from premenopausal women exhibited the highest ER β expression ($p < 0.001$) compared to postmenopausal women and men. Moreover, samples from postmenopausal women exhibited higher receptor expression than those from men ($p < 0.001$).

CXCR4 Expression in Normal Lung and Adenocarcinoma Lung Tissue Samples

Results exhibited that the expression of CXCR4 in bronchial epithelial cells was extremely low and in some samples, its expression was negligible (Figures 2A, 2C, 2E). The mean pixel densities of CXCR4 expression in the normal lung tissue of premenopausal women, postmenopausal women and men were 6.10 pixels, 6.88 pixels, and 5.30 pixels respectively. Statistical analysis showed no significant differences in the expression of CXCR4 between these groups in normal lung tissues (Figure 2G, $p > 0.001$).

In contrast, the expression of CXCR4 was highly detected in ADC cells from both women and men compared to controls (Figure 2G, $p > 0.001$). The highest intensity was found in lung ADC tissue from premenopausal women (146.46 pixels) ($p < 0.001$) (Figures 2B and 2G). On the opposite, lower immunoreactivity was observed in ADC from postmenopausal women (86.88 pixels) and men (78.04 pixels) (Figure 2D, 2F and 2G). Statistical analysis showed that the tumors from premenopausal women expressed significantly more CXCR4 ($p > 0.001$) than the tumors from postmenopausal women and men. However, we found no statistically significant differences between pixel average density between men and postmenopausal women as shown in Figure 2G. The protein signal was usually present in the nucleus and cytoplasm (Figures 2B, 2D, 2F).

CXCL12 Expression in Adenocarcinoma Lung Tissue Samples

The noncancerous lung tissues of all the analyzed groups had low expression of CXCL12 (Figures 3A, 3C, 3E).

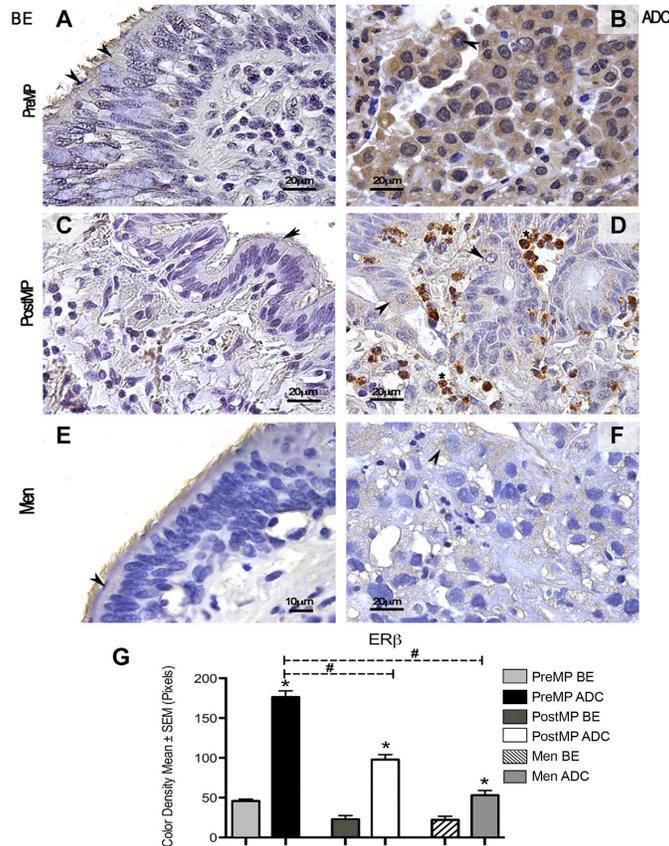


Figure 1. ER β expression by sex and hormonal status in normal lung tissue and lung ADC. Immunohistochemical staining showed the low expression of ER β in normal bronchial epithelium (BE) in all analyzed groups (A,C,E) compared to lung adenocarcinoma (ADC), which exhibit a higher expression (B,D,F) (arrowhead). Lung ADC samples from premenopausal women exhibit higher ER β cytoplasmic expression (B) than those of postmenopausal women (D) and men (F). The intensely labeled cells in Figure D correspond to adjacent inflammatory infiltrate (asterisk). In Figure 1G, a statistical analysis showed that the color density mean for ER β was statistically higher in ADC than in healthy bronchial epithelium (BE) in all three analyzed groups (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey's post-hoc test). Neoplastic cells from premenopausal women (PreMP ADC) showed significantly higher signal for the estrogen receptor than those of postmenopausal women (PostMP ADC) and men (# $p < 0.001$ ANOVA, Tukey's post-hoc test).

The average pixel densities of CXCL12 in normal lung tissues from premenopausal women, postmenopausal women and men were: 38 pixels, 26.47 pixels and 26.82 pixels, respectively. No significant differences were found between the average pixel densities in normal bronchial epithelium from the analyzed groups (Figure 3G; $p > 0.001$).

Opposite to the normal lung tissues, the immunopositivity of CXCL12 was higher in lung ADC from both women and men. ADC cells from premenopausal women also showed significantly the highest positive signal intensity

for the chemokine compared to the other two groups (164.15) ($p < 0.001$) (Figures 3B and 3G). The ADC tissues from postmenopausal women showed lower signal intensity (119.80) than those from premenopausal women (Figures 3D and 3G). Men display the lowest intensity of CXCL12 (107.93) staining among the samples evaluated (Figures 3F and 3G). Positive nuclear and cytoplasmic staining for CXCL12 was usually found in most of the samples (Figures 3B, 3D, 3F). The range of the pixel density and the average for each protein for each group is shown in Table 2.

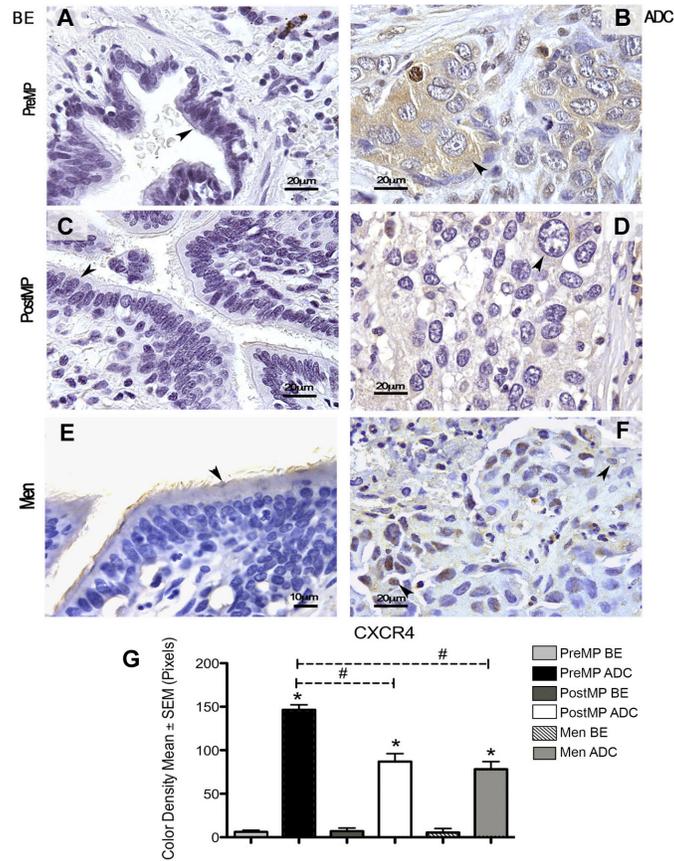


Figure 2. CXCR4 expression by sex and hormonal status in normal lung tissue and lung ADC. Normal bronchial epithelium (BE) from premenopausal (A), postmenopausal women (C) and men (E) showed low or no immunoreactivity for CXCR4 (arrowhead). In contrast, lung adenocarcinomas (ADC) showed a higher signal for this protein in all groups as shown in panels B, D and F (arrowhead). ADC samples from premenopausal women exhibit higher expression of CXCR4 (B) compared to those from postmenopausal women (D) and men (F). The signal was observed in both the nucleus and cytoplasm of tissues from women and men. Statistical analysis showed that CXCR4 was statistically higher in adenocarcinomas (ADC) than in normal lung (BE) in all the analyzed groups (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey's post-hoc test) and ADC from premenopausal (PreMP ADC) exhibited significantly higher expression of CXCR4 compared to postmenopausal (PostMP ADC) and men (# $p < 0.001$ ANOVA, Tukey's post-hoc test).

Relationships Between Levels of Immunoreactivity of ER β and CXCR4/CXCL12 and Sex, Hormonal Status, Smoking Habits and Tumor Stage

From the categorical information of the 60 ADC samples, sex and hormonal status grouping was performed using frequencies of the level of ER β , CXCR4/CXCL12 immunoreactivity was shown by each patient sample together with its smoking habits, and tumor stage. A multivariate analysis showed three well-defined groups that associated sex, hormonal status and the immunoreactivity levels of the

molecular markers analyzed (Figure 4). Each group showed a specific and level-dependent correspondence between sex, hormonal status and the immunoreactivity level of each marker. Notably, premenopausal women patients were strongly associated with higher levels of ER β , and CXCR4/CXCL12 immunoreactivity. In contrast, correspondence analysis showed a tight association between male patients and the lowest levels of immunoreactivity for the analyzed proteins. With respect to tumor stage, stages II and I were associated with postmenopausal women. Meanwhile, stage

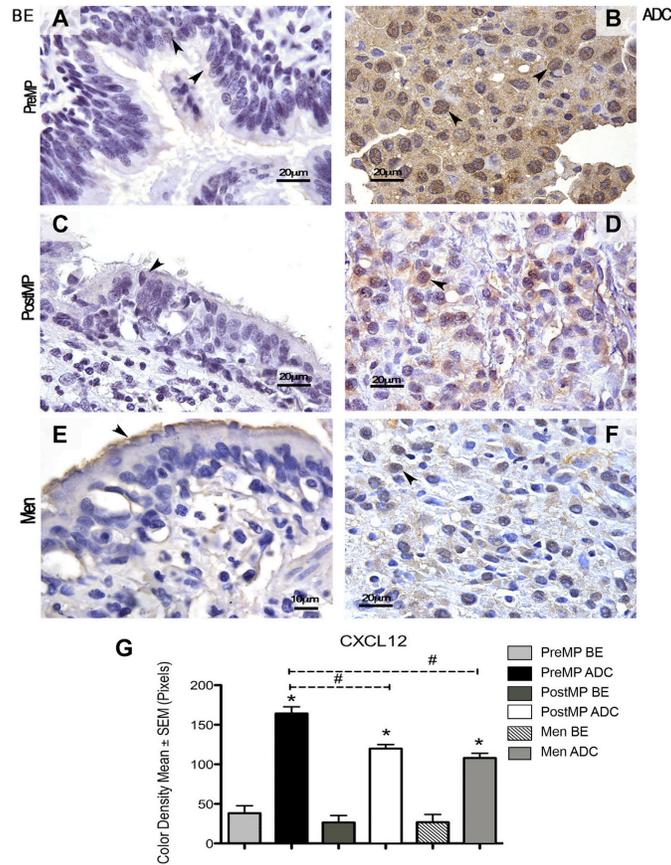


Figure 3. CXCL12 expression by sex and hormonal status in normal lung tissue and lung ADC. Low CXCL12 signal was observed in normal bronchial epithelium samples (BE) from premenopausal women (A), postmenopausal women (C) and men (E) (arrowhead). The highest signal is observed in adenocarcinomas (ADC) in all the analyzed groups (B, D, F) (arrowhead). Adenocarcinomas from premenopausal women exhibit the highest expression of CXCL12 (B). In contrast, malignant cells from postmenopausal women (D) and men (F) show lower intensity of CXCL12 staining. The expression of CXCL12 is observed in the nucleus and cytoplasm of tissue samples from both women and men (arrowhead). Figure 3G shows that CXCL12 was statistically higher in lung adenocarcinomas (ADC) than in normal lung tissues (BE) (* $p < 0.001$ ANOVA, Tukey's post-hoc test). Furthermore, malignant cells from premenopausal women (PreMP ADC), exhibit the highest signal for CXCL12, whereas postmenopausal women (PostMP ADC) and men showed lower intensity (# $p < 0.001$ ANOVA, Tukey's post-hoc test).

III was closely associated with the male group. For postmenopausal women, the association with tumor stages II and I may be influenced by the lower frequency of these stages in the other groups and the small number of samples in these stages. On the contrary, the higher frequency (40%) of stage III lung ADC samples obtained from men contributed, at least in part, to the close relationship displayed by sex. In addition, due to the higher frequency of tumor stage IV (>70%) in all the groups, no association was evident

between this tumor stage and any particular group defined by correspondence analysis.

Moreover, analysis showed a close correspondence between the male patients and smoking, meanwhile pre- and postmenopausal women were more closely related with a non-smoking history. This tendency resulted as a consequence of the higher percentage (90%) of male that smoked, together with the lower frequency of women exhibiting this habit (20 and 10% of pre- and postmenopausal

Table 2. Range and mean of pixel density for ERβ, CXCR4 and CXCL12 from bronchial epithelium (BE) and lung adenocarcinoma (ADC)

	BE		ADC	
	Range	Mean	Range	Mean
ERβ pixel density				
PreMP	10–80	45.70	0–400	176.19
PostMP	0–100	22.80	0–152.7	97.70
Men	0–50	22.06	0–159	52.88
CXCR4 pixel density				
PreMP	0–100	6.10	0–309	146.46
PostMP	0–90	6.88	0–137	86.88
Men	0–70	5.33	0–166	78.04
CXCL12 pixel density				
	Control		ADC	
	Range	Mean	Range	Mean
PreMP	0–82	38	0–310	164.15
PostMP	0–100	26.47	0–192	119.8
Men	0–200	26.82	0–163	107.93

women, respectively) (Table 1, Figure 4). Interestingly, despite the differences in smoking habits between men and women, the correspondence analysis more clearly separated the male, postmenopausal and premenopausal women groups indicating that the higher difference in protein expression levels among these groups (and therefore the hormonal status), contributed more to define this association. Therefore, neither smoking habit nor tumor stage contributed significantly to the association among the evaluated variables (Figure 4).

Due to differences in smoking history between women and men, it was interesting to examine whether there was an association between this variable and the level of protein expression determined in each analyzed group using a two-tailed χ^2 or Fisher's exact test. In addition to using a two-way ANOVA, we also looked for any significant differences in the mean positive immunoreactivity of each marker according to the smoking record (smoker vs. nonsmoker); if the ANOVA result was significant, a Bonferroni's *post-hoc* multiple comparison test was performed.

χ^2 and two-way ANOVA analysis revealed no association ($p < 0.05$) between the protein expression levels and smoking habits in premenopausal women, postmenopausal women, and men. However, when the groups were separated by sex (female vs. male), a significant association was observed between the level of protein immunoreactivity and smoking behavior ($p < 0.05$). For instance, high levels of ERβ positive expression were associated with smoker females, whereas medium and low levels were associated with smoker males (χ^2 , $df = 18.85$, 2 ; $p < 0.001$). This same tendency was also observed with CXCR4 expression (χ^2 , $df = 10.15$, 2 ; $p < 0.01$) and to a lesser degree with CXCL12 expression (χ^2 , $df = 6.01$, 2 ; $p = 0.04$).

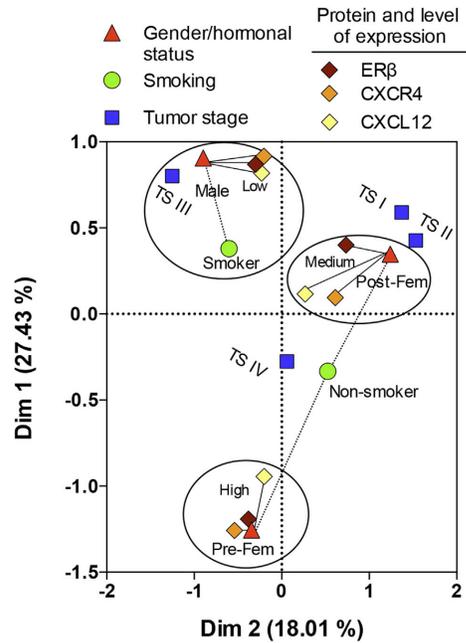


Figure 4. Correspondence analysis of the pattern of association between sex and hormonal status, levels of ERβ and CXCR4/CXCL12 immunoreactivity of lung ADC tissue samples, smoking habit, and tumor stage. The strength of association between each group and the level of immunoreactivity together with the smoking habit and tumor stage can easily be interpreted in relation to the distance separating two adjacent points. The less the distance, the greater association there is between any specific group and the other defined variables. The sum of Dim 1 and Dim 2 accounted for explanation of 45% of the total variation exhibited by the data. (A color figure can be found in the online version of this article.)

Discussion

It has been reported that ADC is the most common variety of lung cancer mainly in women and nonsmokers (5,14,17–20). The characteristics of our patient samples confirms this information; we observed that a greater percentage of women with ADC were nonsmokers compared to men. Additionally, we noted that the highest percentage of premenopausal women with lung ADC were in advanced clinical stages at the time of diagnosis and presented mainly with poorly differentiated tumors compared to postmenopausal women and men. Our data are consistent with the observations of other authors (27,30) who reported that premenopausal women were diagnosed at a more advanced clinical stage with a less favorable histology type of lung cancer (adenocarcinoma), poorly differentiated tumors, and more often underwent pneumonectomy compared to postmenopausal women and men.

Lung cancer behavior has been poorly investigated in premenopausal women, and almost all the information reported on lung cancer concerns postmenopausal women and men. Our results indicate that the behavior of this pathology in premenopausal women may differ from that of postmenopausal women and men because premenopausal women exhibited the highest levels of ER β CXCR4 and CXCL12 expression. Indeed, correspondence analysis also showed a strong association between the premenopausal condition and high immunoreactivity to these proteins. On the other hand, men and postmenopausal status were associated with low- and medium-level immunoreactivity, respectively.

In addition, when the association between smoking habits and protein expression levels was evaluated by hormonal status, Fisher's test did not demonstrate any significant association as a consequence of the groups' size after stratification, but a significant association was found with sex. The highest levels of ER β and CXCR4/CXCL12 expression were associated with women who were smokers, whereas lowest levels were associated with men who were smokers. Although smoking habits were associated with the expression of these proteins, our results show that both sex and hormonal status are the most relevant variables in the expression levels of ER β , CXCR4 and CXCL12. Despite men and women who were smokers, women expressed the highest levels of all the proteins compared with men. However, further analysis with a larger sample would be important to assess our findings with more detail. Our results support the hypothesis that sex and estrogens may be involved in lung carcinogenesis.

Although estrogens have been associated with lung ADC, information is needed to fully understand how these hormones are involved in lung carcinogenesis; this relationship is still controversial and is a relevant discussion topic in the field. Currently, it is known that lung cancer cells respond to and may produce estrogens. Niikawa and co-workers (36) reported that NSCLC tissues showed a higher concentration of estradiol (E2) than the corresponding non-neoplastic lung tissue from the same patient; the correlation was 1.7-fold higher in NSCLC tissue from men and 2.3-fold higher in NSCLC tissues from postmenopausal women compared to non-neoplastic lung. The intratumoral concentration of the hormone was positively correlated with aromatase expression, but no information regarding premenopausal women was included.

The main pathway by which estrogens exert their influence on lung cancer cells is through its binding to ER β , which is highly expressed in lung cancer cells (38). Our results showed that lung ADC had higher expression of ER β than normal lung tissue in all the analyzed groups, supporting the involvement of estrogens and the estrogen receptor in this pathology as previously reported (34,35,44,45,49). Furthermore, ER β was expressed in adenocarcinomas from both women and men, but a higher signal of this protein

was observed in the malignant cells from premenopausal women than those from postmenopausal women and men. Thus, ER β expression in lung adenocarcinoma was dependent on sex and hormonal status. This result may suggest that neoplastic cells from premenopausal women may be more receptive to and respond better to estrogens (intratumoral and plasmatic) than those from postmenopausal women and men, but this hypothesis should be tested. A higher serum estrogen concentration in premenopausal women could stimulate a higher ER β expression in lung ADC as was observed in human endometrial adenocarcinoma cell line and in breast cancer where an increased expression of estrogen receptor was observed after the stimulus with the ligand (57–60). This could explain the differences in ER β expression in adenocarcinomas from premenopausal women compared to postmenopausal and men. These results suggest that estradiol levels may be related to ER β expression in lung adenocarcinoma cells, nevertheless further studies are needed to investigate this fact.

Our findings also showed that the expression of CXCL12 and CXCR4 was almost undetectable in normal lung epithelium, indicating that these proteins are involved in lung carcinogenesis as described previously (45–47,49,50,61). No statistically significant differences were observed between the control groups. In addition, we observed that lung ADC tissue from premenopausal women that had the greatest immunohistochemical signal for ER β also expressed the highest concentrations of CXCL12 and its receptor CXCR4. ADC tissues from postmenopausal woman with lower expression of ER β compared to premenopausal tissues also have lower expression of CXCL12 and CXCR4. This result is of interest because men, who exhibit the slightest signal for estrogen receptor, showed the lowest signal to the chemokine and its receptor. Moreover, we observed a strong association between the premenopausal group and higher expression of all the proteins as well as a medium level of expression with postmenopausal group and low level of expression with the group of men. These results show that CXCL12 and CXCR4 expression may be related to sex and hormonal status and suggests that, at least in our population, estrogens among other factors may stimulate the expression of these proteins under pathological conditions such as lung cancer.

Estrogens may stimulate the expression of CXCL12 and CXCR4 in lung ADC cells through the ER β signaling pathway as has been reported in breast and ovarian cancer (62,63). The effects of estrogens have also been observed in endometrial adenocarcinoma cell lines where hormone increases the expression of CXCL12 and CXCR4 by the demethylation of CpG islands of promoters (64). Estrogen also induces the upregulation of CXCR4 and CXCL12 expression through modifications in the compaction state of chromatin at their promoters in breast cancer cells (63). Not only ERs activate the CXCR4/SDF-1 pathway, Sauv e and co-workers (65) reported that CXCR4 signaling

also promotes ER transcriptional activation, thereby establishing a complete autocrine loop for breast cancer cell growth. This type of stimulation may also exist in lung adenocarcinoma, which would explain the relationship between the higher concentration of estrogen and the higher ER β , CXCL12 and CXCR4 expression in premenopausal compared to postmenopausal women and men. However, further studies are needed to explore in detail whether estrogen binding to ER β could induce the expression of CXCR4/CXCL12, which may be a mechanism by which estrogens promote lung carcinogenesis.

The cellular localization of the chemokine and its receptor has been reported to correlate with the biological behavior of the tumor. CXCR4 has been identified by immunohistochemistry in both the nucleus (47,66–68) and cytoplasm of NSCLC cells (46,47). Wagner and co-workers (47) observed CXCL12 signal in the membrane and cytoplasm of ADC cells. Here we analyzed CXCR4 and CXCL12 expression and observed these proteins in the nucleus and cytoplasm. However, the immunopositivity was heterogeneous between the samples from all the analyzed groups. Despite the fact that the cellular location of these proteins has been related to the prognosis of NSCLC, the biological effects of this localization, the mechanisms by which these proteins can translocate into the nucleus and its potential role in this organelle is still unknown.

Finally, our results support the necessity of performing future studies on this pathology in premenopausal women and evaluate the effects of estrogen and its role in lung carcinogenesis. One limitation in the present study was the sample size. Most patients in the three groups studied were in stage IV and no strong association was found between premenopausal women and this condition, although the highest percentages of these patients were in stage IV. In addition, it would be of interest to associate the estrogen concentration in patients with ER β and CXCL12/CXCR4 expression level. It was not possible to perform a hormonal profile simultaneously with the lung biopsy because the study was conducted by selecting lung biopsies that existed at that time in the hospital and the patients had been referred to another health center for treatment; nevertheless, this will be investigated in future studies.

In conclusion, our findings suggest a significant role of sex and hormonal condition in ER β , CXCR4 and CXCL12 expression in lung adenocarcinoma, a cancer that appears to be strongly influenced by estrogen. Higher ER β , CXCL12 and CXCR4 expression in adenocarcinoma from premenopausal women may partly explain the tumor aggressiveness observed in these patients compared to postmenopausal and men reported previously (29,30). Finally, understanding the association between estrogens and the CXCR4-CXCL12 axis would also provide information for developing new alternative treatments for lung adenocarcinoma based on blocking the E2/ER β and CXCL12/CXCR4 pathways.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

V. Rodriguez-Lara is a PhD student of Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) and acknowledges the support given by this postgraduate program. E. Garcia-Zepeda acknowledges support from DGAPA-PAPIIT INS224807, UNAM. The authors also thank Dr. Ma. Eugenia Vázquez Manríquez for providing tissue samples and to Veronica Rodriguez Mata and Raquel Guerrero Alquicira for their technical support in histological process of our work.

References

1. Novaes FT, Cataneo DC, Ruiz Junior RL, et al. Lung cancer: histology, staging, treatment and survival. *J Bras Pneumol* 2008;34:595–600.
2. Lung Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 Summary. IARC, 2008. (Accessed 2008 at <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/lung.asp>).
3. Thomas L, Doyle LA, Edelman MJ. Lung cancer in women: emerging differences in epidemiology, biology, and therapy. *Chest* 2005;128:370–381.
4. Novello S, Vavala T. Lung cancer and women. *Future Oncol* 2008;4:705–716.
5. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, et al. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 2005;117:294–299.
6. Egleston BL, Meireles SI, Flieder DB, et al. Population-based trends in lung cancer incidence in women. *Semin Oncol* 2009;36:506–515.
7. Ondrusova M, Muzik J, Hunakova L, et al. Trends in the lung cancer incidence and mortality in the Slovak and Czech Republics in the contexts of an international comparison. *Clin Transl Oncol* 2012;14:659–666.
8. Eilstein D, Eshai K. Lung and breast cancer mortality among women in France: future trends. *Cancer Epidemiol* 2012;36:e341–e348.
9. Thompson CA, Waldhor T, Schernhammer ES, et al. Smoking and lung cancer: current trends in Austria. *Wien Klin Wochenschr* 2012;124:493–499.
10. Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The international epidemiology of lung cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol* 2008;3:819–831.
11. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, et al. European cancer mortality predictions for the year 2012. *Ann Oncol* 2012;23:1044–1052.
12. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2006*. Atlanta: American Cancer Society; 2006.
13. Stahel RA. Adenocarcinoma, a molecular perspective. *Ann Oncol* 2007;18(suppl 9):ix147–ix149.
14. Kadara H, Kabbout M, Wistuba II. Pulmonary adenocarcinoma: a renewed entity in 2011. *Respirology* 2012;17:50–65.
15. Marquez-Garban DC, Mah V, Alavi M, et al. Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids* 2011;76:910–920.
16. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. *Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines* (2nd ed.). *Chest* 2007;132:29S–55S.
17. Minami H, Yoshimura M, Miyamoto Y, et al. Lung cancer in women: sex-associated differences in survival of patients undergoing resection for lung cancer. *Chest* 2000;118:1603–1609.
18. Radzikowska E, Glaz P, Roszkowski K. Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and

- survival. Population-based study of 20 561 cases. *Ann Oncol* 2002; 13:1087–1093.
19. Fu JB, Kau TY, Severson RK, et al. Lung cancer in women: analysis of the national Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Chest* 2005;127:768–777.
 20. Belani CP, Marts S, Schiller J, et al. Women and lung cancer: epidemiology, tumor biology, and emerging trends in clinical research. *Lung Cancer* 2007;55:15–23.
 21. Etzel CJ, Lu M, Merriman K, et al. An epidemiologic study of early onset lung cancer. *Lung Cancer* 2006;52:129–134.
 22. Liam CK, Pang YK, Leow CH, et al. Changes in the distribution of lung cancer cell types and patient demography in a developing multiracial Asian country: experience of a university teaching hospital. *Lung Cancer* 2006;53:23–30.
 23. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, et al. Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol* 2007;25:472–478.
 24. Freedman ND, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, et al. Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. *Lancet Oncol* 2008;9:649–656.
 25. Siegfried JM, Hershberger PA, Stabile LP. Estrogen receptor signaling in lung cancer. *Semin Oncol* 2009;36:524–531.
 26. Powell HA, Iyen-Omofoman B, Hubbard RB, et al. The association between smoking quantity and lung cancer in men and women. *Chest* 2013;143:123–129.
 27. Stabile LP, Dacic S, Land SR, et al. Combined analysis of estrogen receptor beta-1 and progesterone receptor expression identified lung cancer patients with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2011;17:154–164.
 28. Oton AB, Belani C, Cai C, et al. Comparison of survival for non-small cell lung cancer (NSCLC) between premenopausal and postmenopausal women: An analysis of the National Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Database. In: *Oncology ASOC, ed. 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings: American Society of Clinical Oncology*; 2006:7038.
 29. Albain KS, Unger JM, Gotay CC, et al. Toxicity and survival by sex in patients with advance non-small cell lung carcinoma on modern Southwest Oncology Group (SWOG) trials. In: *Oncology ASOC, ed. 2007 Annual Meeting Proceedings: American Society of Clinical Oncology*; 2007:7549.
 30. Moore KA, Mery CM, Jaklitsch MT, et al. Menopausal effects on presentation, treatment, and survival of women with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2003;76:1789–1795.
 31. Hsu LH, Chu NM, Liu CC, et al. Sex-associated differences in non-small cell lung cancer in the new era: is gender an independent prognostic factor? *Lung Cancer* 2009;66:262–267.
 32. Chang JW, Asamura H, Kawachi R, et al. Gender difference in survival of resected non-small cell lung cancer: histology-related phenomenon? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:807–812.
 33. Pitz MW, Musto G, Navaratnam S. Sex as an independent prognostic factor in a population-based non-small cell lung cancer cohort. *Can Respir J* 2013;20:30–34.
 34. Zhao G, Zhao S, Wang T, et al. Estrogen receptor beta signaling regulates the progression of Chinese non-small cell lung cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;124:47–57.
 35. Pietras RJ, Marquez DC, Chen HW, et al. Estrogen and growth factor receptor interactions in human breast and non-small cell lung cancer cells. *Steroids* 2005;70:372–381.
 36. Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, et al. Intratumoral estrogens and estrogen receptors in human non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:4417–4426.
 37. Mah V, Marquez D, Alavi M, et al. Expression levels of estrogen receptor beta in conjunction with aromatase predict survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2011;74:318–325.
 38. Hershberger PA, Stabile LP, Kanterewicz B, et al. Estrogen receptor beta (ERbeta) subtype-specific ligands increase transcription, p44/p42 mitogen activated protein kinase (MAPK) activation and growth in human non-small cell lung cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;116:102–109.
 39. Chakraborty S, Ganti AK, Marr A, et al. Lung cancer in women: role of estrogens. *Expert Rev Respir Med* 2010;4:509–518.
 40. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 2000;24:145–155.
 41. Omoto Y, Kobayashi Y, Nishida K, et al. Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:340–347.
 42. Miki Y, Abe K, Suzuki S, et al. Suppression of estrogen actions in human lung cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2011;340:168–174.
 43. Navaratnam S, Skliris G, Qing G, et al. Differential role of estrogen receptor beta in early versus metastatic non-small cell lung cancer. *Horm Cancer* 2012;3:93–100.
 44. Zhang G, Liu X, Farkas AM, et al. Estrogen receptor beta functions through nongenomic mechanisms in lung cancer cells. *Mol Endocrinol* 2009;23:146–156.
 45. Belperio JA, Phillips RJ, Burdick MD, et al. The SDF-1/CXCL12/CXCR4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Chest* 2004;125:1565.
 46. Su L, Zhang J, Xu H, et al. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:8273–8280.
 47. Wagner PL, Hyjek E, Vazquez MF, et al. CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:615–621.
 48. Wald O, Izhar U, Amir G, et al. Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: role in non-small cell lung cancer tumor proliferation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;141:1503–1512.
 49. Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, et al. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1676–1686.
 50. Suzuki M, Mohamed S, Nakajima T, et al. Aberrant methylation of CXCL12 in non-small cell lung cancer is associated with an unfavorable prognosis. *Int J Oncol* 2008;33:113–119.
 51. Baumgartner AK, Hausler A, Seifert-Klaus V, et al. Breast cancer after hormone replacement therapy—does prognosis differ in perimenopausal and postmenopausal women? *Breast* 2011;20:448–454.
 52. Dratva J, Gomez Real F, Schindler C, et al. Is age at menopause increasing across Europe? Results on age at menopause and determinants from two population-based studies. *Menopause* 2009;16:385–394.
 53. NORMA Oficial Mexicana NOM-035-SSA2-2002. Prevencion Y Control De Enfermedades En La Perimenopausia Y Postmenopausia De La Mujer. Criterios Para Brindar La Atencion Medica. Mexico: Diario Oficial de la Federacion; 2003. pp. 13–34.
 54. WHO. Guidelines for Controlling and Monitoring the Tobacco Epidemic. Geneva: World Health Organization; 1998.
 55. Fortoul TI, Rojas-Lemus M, Avila-Casado MC, et al. Endogenous antioxidants and nasal human epithelium response to air pollutants: genotoxic and immuno-cytochemical evaluation. *J Appl Toxicol* 2010;30:661–665.
 56. Hill MO. Correspondence analysis: a neglected multivariate method. *Appl Stat* 1974;3:340–354.
 57. Saceda M, Lindsey RK, Solomon H, et al. Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;66:113–120.
 58. Robertson JA, Farnell Y, Lindahl LS, et al. Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message. *J Mol Endocrinol* 2002; 29:125–135.
 59. Murillo-Ortiz B, Perez-Luque E, Malacara JM, et al. Expression of estrogen receptor alpha and beta in breast cancers of pre- and postmenopausal women. *Pathol Oncol Res* 2008;14:435–442.

60. Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, et al. Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines. *Oncol Rep* 2000;7:157–167.
61. Wald O, Shapira OM, Izhar U. CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential. *Theranostics* 2013;3:26–33.
62. Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2003;17:792–803.
63. Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, et al. Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *Plos One* 2011;6:e20898.
64. Kubarek L, Jagodzinski PP. Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2007;581:1441–1448.
65. Sauve K, Lepage J, Sanchez M, et al. Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res* 2009;69:5793–5800.
66. Spano JP, Andre F, Morat L, et al. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol* 2004;15:613–617.
67. Na IK, Scheibenbogen C, Adam C, et al. Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. *Hum Pathol* 2008;39:1751–1755.
68. Minamiya Y, Saito H, Takahashi N, et al. Expression of the chemokine receptor CXCR4 correlates with a favorable prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2010;68:466–471.