



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto de los estrógenos en la migración de células de  
adenocarcinoma pulmonar mediante la activación del eje  
CXCL12/CXCR4

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGA

PRESENTA  
ANDREA VARGAS OSORIO



Ciudad Universitaria, Cd. MX 2016.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

1. Datos del alumno:

Vargas

Osorio

Andrea

5521283458 - 68316942

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

308331378

2. Datos del Asesor.

Rodríguez

Lara

Vianey

3. Datos de la tesis.

Efecto de los estrógenos en la migración de células de Adenocarcinoma pulmonar mediante la activación del eje CXCL12/CXCR4.

77p

2016

4. Palabras clave (temas principales que trata la tesis):

Cáncer, adenocarcinoma pulmonar, estrógenos, estradiol, quimiocinas, migración celular, metástasis.

**JURADO REVISOR**

Dra. Vianey Rodríguez Lara

Dra. Teresa Imelda Fortoul Vander Goes

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Dra. Tania Valentina López Pérez

## DEDICATORIA

*A mi mamá*, una guerrera, una campeona, una luz, alguien que da todo para cumplir su objetivo y los de su familia, el gran ejemplo de mi vida, porque me ha ayudado a construir cada peldaño que he escalado y éste gran paso de concluir mi hermosa carrera, mis palabras no bastarán para expresar el gran amor y admiración que te tengo mami, es un orgullo de ser parte de tu ser, *te amo mamá muchas gracias siempre...*

*A mi papá*, por ser el hombre de mi vida, un soñador, humilde, solidario, trabajador y el mejor de todos. Gracias por darme la oportunidad de creer en el amor en cualquiera de sus formas y tener tu apoyo siempre en las situaciones más difíciles, igual gracias por esa inyección de emprendedores que nos diste desde siempre, creé en nuestras ideas nosotros creemos en ti, a tu lado aprendemos mucho, *te adoro te amo, gracias papá..*

*A mis hermanos* con muchísimo amor les dedico ésta tesis que me ha costado mucho como símbolo de que soy una de ustedes, son un orgullo para mí y para el país, por todo el conocimiento y entrega que demuestran y que me enseñan a mí y a los demás, siempre he sentido la presión de destacarme en algo como cada uno de ustedes lo hace a la perfección, *los amo, los quiero siempre a mi lado, ya nos encontramos en el mismo camino del éxito, gracias por impulsarme, esto es para ustedes Zule y Dan.*

*A mi maní, Ashy*, como a todos en esta hoja quisiera decirte tanto pero no cabe, contigo he conocido el amor verdadero, a alguien que no es de tu sangre pero que es de ti, que se llevan a todos lados aunque no estén juntas, eres una persona súper especial, un impulso, una luz, una sonrisa, eres todo lo bueno de mi vida cuando hay algo malo, gracias te amo desde el primer día hasta hoy, has caminado conmigo hasta aquí, y lo que falta.

*A Mara y Manuel* que son para mí unos segundos padres y siempre me siento en casa cuando estoy con ustedes, gracias por su apoyo incondicional, su amor y sus enseñanzas, son muy especiales, los amo.

*A Guada* mi amiga, mi hermana, gracias por crecer conmigo en todos los sentidos siempre cuentas conmigo, es un gusto y un orgullo tenerte a mi lado, siempre me haces sentir bien y de alguna forma nuestras fuertes experiencias me han forjado para llegar a ésta y otras metas, te amo.

*A toda la familia completa*, mis tío(a)s, primo(a)s, en especial a mis tías Yola, Cristi, Tere las amo son un apoyo más para mí; a mis abuelito Fede que me inspira a aferrarme tanto a la imaginación, como a la lucidez; a mis abuelitas Josefina y Angelina, a mis primitos Sami, Ale, Ali, Chofi y Pau me gustaría verlos llegar hasta aquí y más, los quiero mucho.

*Al amor* que es un motor en mi vida para hacer cada cosa con entusiasmo, pasión y entrega, y que me ha permitido tener personas tan especiales que apoyan todos mis proyectos, como tu *Guu*, te amo, gracias por todas las enseñanzas y el apoyo personal y económico para hacer lo que quiero.

*A todos mis amigos* que son tanta(o)s que haría otras cuartillas sólo por mencionarlos y decirles todo lo que representan en mi vida, pero ya me cansé después de mil años de tesis jejeje, son una parte fundamental de mi ser, es más, *vital*, mi familia sabe lo amados que son mis amigos, sobre todo los(as) más cercanos *mi Gen 10, Pam, Pelon, Emo, Carlos, Muetli, Zaid, Charly, Robert, Rafiki, Peque, Marianita, Angy*, etc. y todos los que no caben en esta hoja muchas gracias por compartir tanto conmigo, nunca me dejen, sigamos haciendo de las nuestras...

## **AGRADECIMIENTOS**

A la *Dra. Vianey* por toda su comprensión, su apoyo, su tiempo y su rigidez, para que éste trabajo fuera puliéndose cada vez más, muchas gracias.

A la *Dra. Tere* por su apoyo, consejos y preguntas, que fomentaron la curiosidad de saber un poco más de éste trabajo.

Al *Dr. Ignacio Sánchez (Nacho)*, por su apoyo y enseñanzas para cubrir todas mis dudas y por ser un oído y hombro en mis frustraciones y hacerme pasar un rato ameno siempre en el laboratorio.

Al *Dr. Cerbón y a todo el equipo* por permitir el desarrollo de éste proyecto en su laboratorio, brindándome siempre las herramientas y la confianza para desarrollarme.

Al jurado revisor de esta tesis, por sus críticas constructivas y sugerencias para enriquecer éste trabajo.

A los excelentes profesores de la facultad de Ciencias, que me forjaron profesionalmente para obtener el título de bióloga.

A ésta gran y hermosa UNAM que me permitió crecer física, emocional e intelectualmente a su lado.

# ÍNDICE

## Capítulo 1.

1.1 Cáncer de Pulmón

1.2 Epidemiología

1.3 Etiología

1.4 Clasificación

1.5 Adenocarcinoma pulmonar.

1.6 ADC y Estrógenos.

- \* Estrógenos y su relación con la expresión de la quimiocina CXCL12 y el receptor CXCR4.

1.7 Migración celular y ADC pulmonar.

- \* CXCL12/CXCR4 en la migración de células de adenocarcinoma pulmonar.

## Capítulo 2.

2.1 Justificación.

## Capítulo 3.

3.1 Hipótesis y Objetivos

Objetivo general.

Objetivos particulares.

## Capítulo 4.

4.1 Material y método.

## Capítulo 5.

5.1 Resultados.

## **Capítulo 6.**

6.1 Discusión.

## **Capítulo 7.**

7.1 Conclusiones.

7.2 Perspectivas.

## **Capítulo 8.**

8.1 Referencias.

### Introducción.

#### 1.1 Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón (CP) presenta el primer lugar de mortalidad en el mundo. Es una enfermedad multifactorial generada por la acumulación de numerosas mutaciones que los sistemas de reparación molecular no pudieron restaurar. En general el cáncer comienza con la aparición de mutaciones en protooncogenes (KRAS, EGFR/HER-1, HER-2, MYC) que favorecen un incremento en la proliferación celular. Además, se caracteriza por mantener una alta inestabilidad genética debido a las alteraciones en los sistemas de reparación del ADN y mutaciones en la telomerasa que favorecen la inmortalidad de las células o una alta tasa replicativa. Asimismo existen alteraciones en la función de los genes supresores de tumores como P53, por lo que las células neoplásicas evaden las señales apoptóticas. La evasión del sistema inmune para la destrucción de las células cancerosas es un evento importante, aunado a la inflamación crónica que favorece un microambiente para la progresión tumoral. También se presentan alteraciones en el metabolismo celular e inducción de angiogénesis. Finalmente se activa la migración y la invasión tumoral (Hanahan D, 2011). Aunado a estos factores, recientemente se ha observado que las hormonas estrogénicas pueden influenciar la carcinogénesis en el CP (Rodríguez et-al, 2014; Albain, et al,2007; Gorlova, et al.,2007; Mah,et al.,2011).

El CP suele originarse a partir de células epiteliales y derivar en metástasis e invasión a órganos y tejidos como cerebro, mamas, hueso y al pulmón adyacente (Toh C., 2009; WHO, 2013).

Los pacientes con CP, no presentan síntomas hasta que se encuentran en estadios avanzados, debido a ello no es posible detectarlo de manera temprana, lo cual favorece su alta tasa de mortalidad y la pobre sobrevivencia (5 años) de estos

---



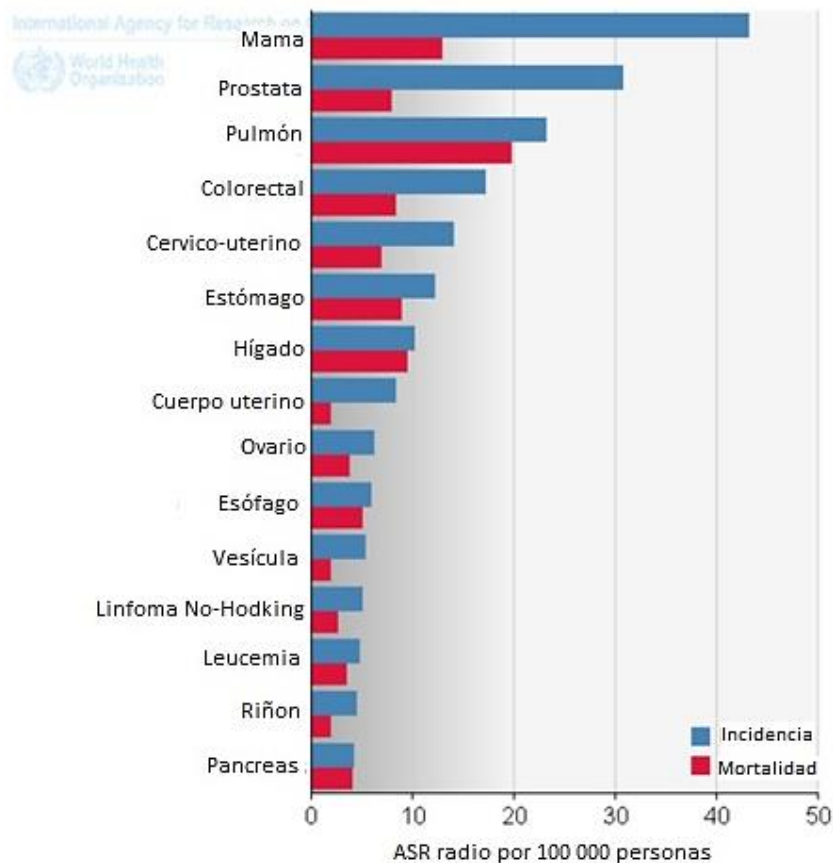
pacientes. Entre los síntomas que reportan los pacientes se encuentran: tos, disfonía, dolor torácico, disnea (dificultad para respirar), hemoptisis (tos con flemas con sangre), inflamación del esófago, pérdida de peso, y edema del cuello y cara (WHO, 2013).

## **1.2 Epidemiología del cáncer pulmonar.**

El cáncer pulmonar ha sido durante algunas décadas un problema grave de salud pública. Cada año mueren más personas por CP que por otros tipos de cáncer (71% casos de muerte) incluso más que la suma de los casos por cáncer de mama, colon y próstata (WHO, 2013).

Con base en las últimas estadísticas de la Organización Mundial de la Salud realizadas cada 6 años, se observa en la Figura 1, la incidencia y mortalidad del cáncer pulmonar respecto a los demás tipos de cáncer que ocupan los primeros 15 lugares a nivel mundial en 2012. Cabe mencionar que aunque la incidencia del CP es menor comparado con la del cáncer de mama y próstata, que tienen el 1º. y 2º lugar respectivamente, el CP llegó a tener en 2012, cerca de 25 mil casos nuevos de cada 100,000, mientras que la cantidad de muertes debidas al cáncer pulmonar en la población mundial ejemplificada con la barra de color rojo, tuvo el 1er. lugar en mortalidad con casi 20,000 casos de muerte es ese mismo año, manteniéndose en la misma posición hasta la actualidad, por lo cual es un cáncer importante debido a la alta tasa de mortalidad en ambos sexos (IARC, 2012).

Si comparamos la incidencia y mortalidad del CP por sexos a nivel mundial, se muestra que esta patología ocupa el primer lugar en incidencia y mortalidad en los hombres y en las mujeres ocupa el cuarto lugar en incidencia y el segundo en mortalidad (Figura 2) (IARC, 2012).

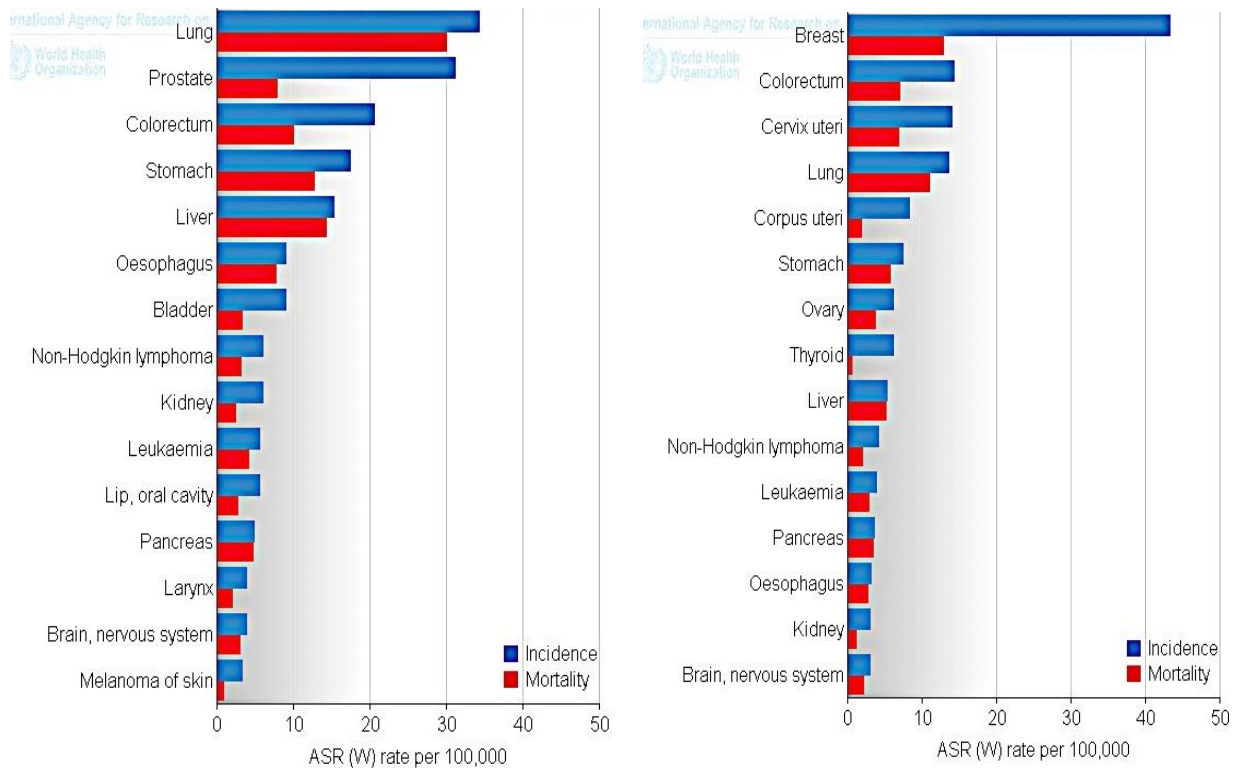


**Figura 1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD DEL CÁNCER A NIVEL MUNDIAL.** Incidencia (Barras color azul) y mortalidad (barras color rojo), por tipos de cáncer en ambos sexos a nivel mundial. El cáncer pulmonar sigue manteniendo el lugar n° 1 en casos de muerte, como se observa en la tercer barra de color rojo de arriba hacia abajo, en cuanto a la incidencia presenta el 3er. Lugar como se observa en la tercer barra color azul (Tomada y modificada de IARC, 2012).

A principios del siglo XXI la incidencia del cáncer de pulmón, en países del primer mundo como Estados Unidos, Inglaterra, Francia y España disminuyó, principalmente por las medidas preventivas contra el tabaquismo en los años 90's, derivadas de las investigaciones donde se relacionó al consumo de tabaco como la principal causa del CP. En contraste, en países en vías de desarrollo la incidencia ha aumentado notablemente en los últimos años especialmente en China, India y México (OMS, 2004; Toh C., 2009; Behera D., 2013).

La cifra de nuevos casos va en aumento como se observa en la figura 3 según las predicciones del 2012 a 2015 aumentó la cifra un 20% (GLOBOCAN, 2012). Es

importante resaltar que en las últimas décadas el CP en las mujeres ha incrementado de forma considerable, mientras que en los hombres la incidencia ha disminuido. Aunque el incremento en el hábito tabáquico explica en parte el incremento del CP en las mujeres existen otros factores importantes ya que un porcentaje considerable de mujeres con CP son no fumadoras.



**Figura 2. INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LOS 15 TIPOS DE CÁNCER MÁS FRECUENTES EN HOMBRES Y MUJERES A NIVEL MUNDIAL. El cáncer de pulmón presenta la mayor incidencia y mortalidad en los hombres (izquierda) y en mujeres se encuentra en el cuarto sitio en incidencia y el segundo en mortalidad (derecha) (Tomado de Globocan 2012).**

| Año  | Estimación de nuevos casos con CP (todas las edades) | Hombres | Mujeres | Ambos Sexos |
|------|--|---------|---------|-------------|
| 2012 |  | 5471    | 2978    | 8439        |
|      | <65 años   | 1790    | 1150    | 2940        |
|      | >=65 años  | 3681    | 1818    | 5499        |
| 2015 |  | 5844    | 3408    | 9252        |
|      | <65 años   | 1900    | 1362    | 3262        |
|      | >=65 años  | 3944    | 2046    | 5990        |
|      | Cambio demográfico                                   | 373     | 440     | 813         |
|      | <65 años   | 110     | 212     | 322         |
|      | >=65 años  | 263     | 228     | 491         |

**Figura 3. TABLA DE PREDICCIONES DEL 2012 EN NUEVOS CASOS DE CÁNCER PULMONAR EN LA POBLACIÓN MUNDIAL AL 2015. Proyecciones poblacionales. Tomado de la Organización de las Naciones Unidas (Últimos registros, tomado y modificado de GLOBOCAN, 2012 (IARC)).**

### **Incidencia y Mortalidad de CP en México**

En México el aumento en la incidencia se atribuye particularmente al incremento en el número de nuevos fumadores y fumadoras. Aunque el CP ha incrementado también en población no fumadora como se mencionó anteriormente, a esta población se les suma recientemente el efecto de diversos factores de riesgo como la predisposición genética y otros relacionados con el género, la exposición a hormonas sexuales endógenas y exógenas a través de anticonceptivos y/o terapia de reemplazo hormonal (TRH) y cambios moleculares vinculadas a las características epidemiológicas y clínicas del cáncer de pulmón principalmente en las mujeres, así como a factores como la contaminación atmosférica y la exposición

al humo de leña (Tovar, G et al., 2002; Remon et al., 2013; NCHS, 2010; Rubin, P et al, 2003).

Con base en las estadísticas de la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), en el 2012, se posicionó al cáncer de pulmón en el 2do. lugar en incidencia y mortalidad en hombres en México, y el 3º en prevalencia durante cinco años (figura 4). Mientras que en mujeres se sabe que ocupa el 6to.- en incidencia, 5to. lugar en mortalidad y 8vo. en prevalencia (ver figura 5) (IARC, 2012; Remon et al., 2013). 3º así no se abrevia lugar Andie ahí dice 3 grados!!! Ojo cambia eso

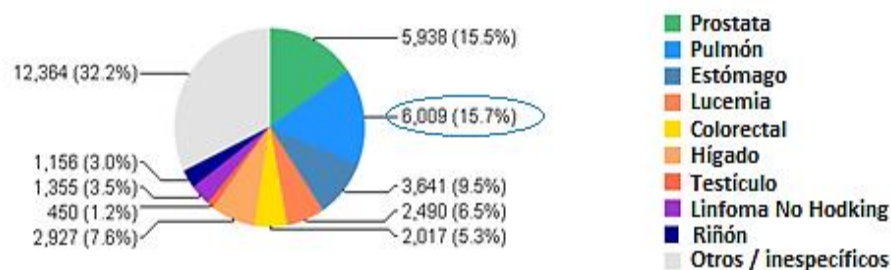
En la Figura 6 se ejemplifica como fluctuó la incidencia del CP en hombres y mujeres mexicanos del 2012 al 2015 según las predicciones realizadas por la OMS en 2012.

| Cáncer de Pulmón | Incidencia |      |         | Mortalidad |      |         | 5 años de prevalencia |     |       |
|------------------|------------|------|---------|------------|------|---------|-----------------------|-----|-------|
|                  | Número     | (%)  | ASR (W) | Número     | (%)  | ASR (W) | Número                | (%) | Prop. |
|                  | 6,297      | 10.2 | 14.0    | 6,009      | 15.7 | 13.4    | 6,042                 | 4.7 | 16.1  |

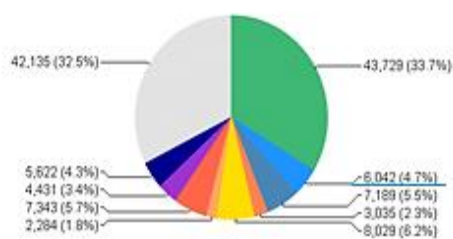
International Agency for Research on Cancer



### MORTALIDAD



### Prevalencia-5 años



### Incidencia

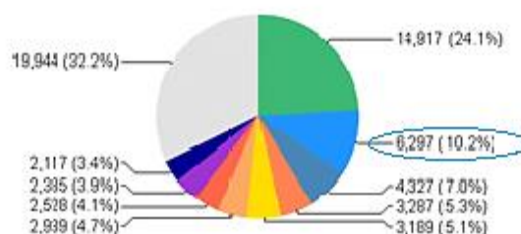


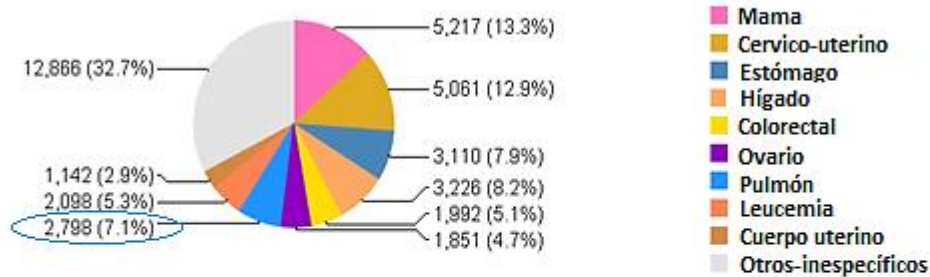
Figura 4. TABLA Y GRÁFICA DE PASTEL MOSTRANDO LA INCIDENCIA, PREVALENCIA Y MORTALIDAD DE CÁNCER DE PULMÓN EN HOMBRES MEXICANOS. Se observa que el cáncer pulmonar (azul cielo) tiene mayor mortalidad he incidencia comparado con otros tumores (tomado y modificado de IARC, 2012).

| Cáncer de Pulmón | Incidencia |     |         | Mortalidad |     |         | 5 años de prevalencia |     |       |
|------------------|------------|-----|---------|------------|-----|---------|-----------------------|-----|-------|
|                  | Número     | (%) | ASR (W) | Número     | (%) | ASR (W) | Número                | (%) | Prop. |
|                  | 2,851      | 4.3 | 5.4     | 2,798      | 7.1 | 5.3     | 2,738                 | 1.6 | 6.9   |

International Agency for Research on Cancer

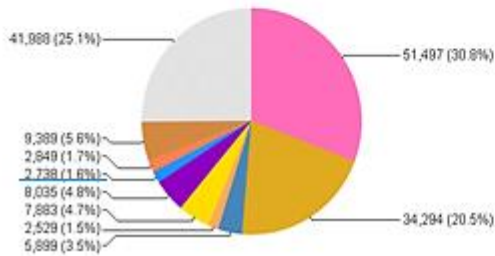


### MORTALIDAD



International Agency for Research on Cancer

### Prevalencia-5 años



### Incidencia

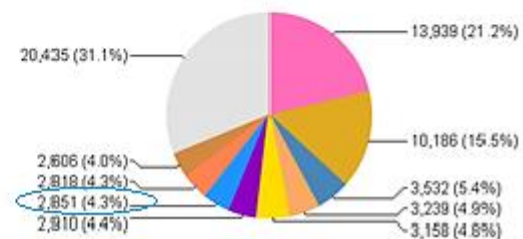


Figura 5. TABLA Y GRÁFICA DE PASTEL MOSTRANDOSE LA INCIDENCIA, PREVALENCIA Y MORTALIDAD DEL CÁNCER DE PULMÓN EN MUJERES EN MÉXICO. La incidencia y mortalidad de cáncer pulmonar en las mujeres mexicanas es menor comparado con cáncer de mama y cervico uterino (tomado y modificado de IARC, 2012).



Figura 6. PREDICIONES HECHAS EN 2012 A 2015 SOBRE EL NÚMERO DE NUEVOS CASOS CON CP EN HOMBRES Y MUJERES MEXICANOS durante ese periodo, y el efecto demográfico en cada género. Tomado y modificado de GLOBOCAN, 2012.

### 1.3 Etiología.

Los factores etiológicos asociados al cáncer pulmonar son variados y de esto depende el tipo histopatológico que se desarrolle. La exposición a agentes carcinogénicos provoca progresivamente alteraciones genéticas y epigenéticas, cambios celulares y moleculares que transforman el epitelio que reviste al pulmón provocando la transformación de sus células (Kumar et al, 2008).

Entre las principales causas para desarrollar cáncer de pulmón se encuentran:

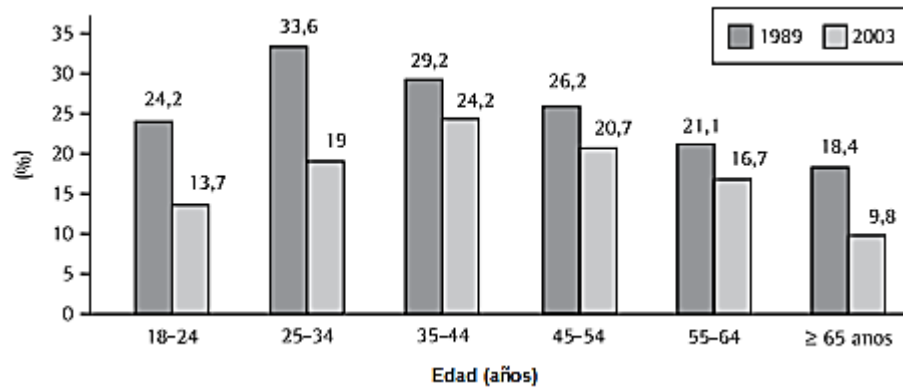
1. Tabaquismo y/o exposición al humo del tabaco.

El tabaco es parte importante en la estructura cultural de muchos países del mundo y fue usado durante siglos sin ninguna limitante para su consumo.



Antes se acostumbraba solo masticarlo para evitar el mareo por cambios de presión, también comenzó a fumarse en pipas, pero con las fabricación de los cigarrillos este recurso se volvió ampliamente accesible para toda la comunidad interesada en su uso, previo a presentarse la nombrada "epidemia del cáncer pulmonar, después de la Primera Guerra mundial, el promedio de cigarrillos fumado por persona en los años 50's aumento más de 40 veces. Para mediados de los 60's en Estados Unidos se realizaban las primeras investigaciones acerca de los efectos del tabaco sobre la salud, donde se le adjudicó al consumo de tabaco el 70% del incremento en las tasas de mortalidad por enfisema pulmonar y CP, sobre todo en hombres y en menor porcentaje en mujeres ya que éstas lo consumían en menor grado (De la Cruz C. et al., 2011). Sin embargo, actualmente el consumo de tabaco en las mujeres cada vez se va acercando más al de los hombres, esto impulsado principalmente por el marketing y el sistema de vida acelerado que se tiene en las ciudades principalmente (Siqueira, et al., 2011). Un ejemplo es un estudio comparativo realizado en mujeres de diferentes localidades de Brasil donde el aumento del tabaquismo, desde 1989 y catorce años después, es influenciado por estos factores, y es más notorio en mujeres de 25 a 34 años (Fig. 7), incluso en los países donde se ha observado una disminución en su consumo, en las mujeres ese decremento es menos notorio (Siqueira, et al., 2011; Prado, G, et al., 2011).

Aunque la posibilidad para superar la adicción al tabaquismo es igual en ambos sexos, la cantidad de receptores nicotínicos y de los neurotransmisores como dopamina y serotonina producidas al fumar un cigarrillo, son mayores en las mujeres, y también otros factores fisiológicos, y psicológicos que hacen que sean un grupo con mayor vulnerabilidad a padecer cáncer pulmonar como resultado del tabaquismo (Prado, Faibischew G, et al., 2011; Alberg, et al, 2013)



**Figura 7. PREVALENCIA DE HÁBITO TABÁQUICO EN MUJERES BRASILEÑAS.** Estudio comparativo, se muestra el porcentaje de prevalencia del tabaquismo en mujeres según la edad en 1989 y 2003 en Brasil (Tomado de Prado, G, et al., 2011).

Durante la combustión del cigarro se crean y se liberan más de 4 mil compuestos químicos cancerígenos, entre los cuales se encuentran: el benceno, nitrosaminas, nitrosornicotina, alquitrán, óxido de nitrógeno, ácido cianhídrico, amoníaco, metales pesados (cromo, plomo, cadmio), acetona y fosfatos provenientes de agroquímicos adicionados a la planta del tabaco, etc. Estos compuestos provocan daño (mutaciones) e inflamación pulmonar al igual que a otros tejidos relacionados al tracto respiratorio y otros como el esófago, el estómago y la boca. Además, la exposición a estos compuestos produce alteraciones en el ciclo celular y la activación de oncogenes (KRAS) en las células bronquioloalveolares causando la transformación celular y posteriormente la aparición de cáncer de pulmón y cánceres asociados como el de esófago, de boca y de estómago (Siqueira, et al., 2011).

2. Factores genéticos: mutación y predisposición genética.

Es conocido que el cáncer es una enfermedad relacionada directamente a la alteración de genes implicados en la regulación del ciclo celular, la mayoría ligados en un gran porcentaje a mutaciones en el gen supresor tumoral *p53* (Zilfou J T & Lowe S W, 2009; Herbst, R S et al., 2008). En el cáncer de mama y ovario se ha comprobado que al menos el 10% de los casos son generados casi en su totalidad por una predisposición genética y se ha observado que estas alteraciones pueden ser heredadas incrementando la susceptibilidad a desarrollar tumores, cuando los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2 están mutados (Cascón S A, 2011).

En el caso del CP se ha observado que 30% de las alteraciones en KRAS 4A y KRAS 4B se asocian principalmente a los fumadores y son heredables, provocando cáncer pulmonar broncogénico y algunos casos de adenocarcinoma, provocando tumores muy heterogéneos (Gold, et al., 2011). Por otra parte en el adenocarcinoma de no fumadores se ha visto un patrón de alteraciones como mutaciones puntuales y/o deleciones en los genes ALK, HER2, ROS y en el dominio EGFR cinasa generalmente durante la primer fase del desarrollo del tumor que favorecen la carcinogénesis (Herbst, R S et al., 2008; Gold, et al., 2011), al igual que alteraciones en factores de transcripción ligados a PD-1 (programador de muerte celular) y su ligando PDL-1 (Sarah B & Goldberg MD, 2015).

3. Estrés oxidante y radicales libres:

Otro posible factor etiológico es el exceso de antioxidantes provenientes de la dieta o de suplementos:

Las vitaminas A ( $\beta$ - caroteno), C y E, son las más comercializadas a nivel mundial y son utilizadas sin algún tipo de control.

Éstas vitaminas protegen la mucosa bronquial por su capacidad de inactivar los radicales libres de los carcinógenos de contaminantes

suspendidos en el aire o provenientes del tabaco, actuando como antioxidantes, sin embargo un exceso de ellos puede inducir un efecto pro-oxidante, favoreciendo la carcinogénesis (Rodríguez P, et al., 2001).

#### 4. Factores ocupacionales y exposición de contaminantes en interiores.

La inhalación de contaminantes es un factor importante en el padecimiento de CP (NCHS, 2010).

Entre los principales contaminantes ocupacionales se encuentran: las fibras de asbesto, el cromo y el arsénico, gas radón (OMS, 2016).

Por otra parte una cifra alta de casos de CP se atribuye al aire contaminado de interiores, debido al uso común de combustibles sólidos como la leña, el carbón vegetal o mineral que se emplea para cocinar y calentar los hogares. Las partículas y el metano desprendido a partir de estos materiales pueden llegar a provocar en viviendas mal ventiladas, la acumulación de 100 veces más partículas suspendidas, esta exposición afecta sobre todo a mujeres y niños; estas condiciones suelen presentarse más en los estados del interior de la República Mexicana donde la población es de bajos recursos (OMS, 2016).

Por otra parte, el uso de gran cantidad de aceite en la cocina, en la cultura oriental, se volatiliza a altas temperaturas por lo que también se ha descrito como otro factor de riesgo, provocando estrés oxidante y peroxidación lipídica en las células del pulmón (Samet, et al., 2009; Kim, et al., 2015).

#### 5. Contaminación atmosférica

Hay una cercana asociación entre la exposición aguda y subaguda de partículas suspendidas, y diferentes tóxicos (como se presentan en el recuadro) con la

---

morbi-mortalidad por enfermedades cardiovasculares o CP. Actualmente es un factor de gran importancia en los nuevos casos de cáncer pulmonar en personas no fumadoras (Borja, et al., 1997; Lomis, et al., 1999; IARC, 2012).

Las partículas suspendidas o llamadas también aerosoles son una mezcla de materiales sólidos y líquidos de diversos tamaños, forma y composición que como su nombre lo dice se encuentran suspendidas en el aire y tienen repercusiones sobre la salud y el medio ambiente (HEI, 2002).

No se ha podido establecer la secuencia exacta de eventos que ocurren posterior a que las partículas son inhaladas y depositadas en las vías respiratorias, pero inducen una respuesta inflamatoria y vascular sistémica, sobre todo en individuos susceptibles como los asmáticos, lo cual puede predisponer a estos individuos a desarrollar CP (HEI, 2002).

Las partículas suspendidas se han clasificado de acuerdo con su tamaño y su habilidad de depositarse en los pulmones. Aquellas con diámetros mayores de  $10\mu\text{m}$  se depositan casi exclusivamente en la nariz y garganta, denominadas también como torácicas o inhalables, capaces de penetrar por sedimentación. Mientras que las finas y ultrafinas  $0.005\mu\text{m}$ , llegan por difusión a bronquiolos respiratorios y la región alveolar, pero también son capaces de depositarse a lo largo del tracto respiratorio causando alteraciones en estos epitelios (HEI, 2002; Hinds, 1982). Estas partículas, se forman por reacciones químicas en la atmósfera, como el dióxido de azufre, amonio, nitrato, formaldehído que se clasifican en los diferentes grupos de contaminantes atmosféricos de la IARC (Figura 8) y son de este tipo de sustancias las que se asocian predominantemente al desarrollo de adenocarcinoma de pulmón.

## CLASIFICACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN DE LA IARC

**Grupo 1.** Sustancias cancerígenas. En la lista hay 111 elementos. Entre ellos, amianto, benceno, la radiación y el formaldehído.

**Grupo 2A.** Probables carcinógenos. 66 sustancias, como el glicidol.

**Grupo 2B.** Posibles carcinógenos. 285 sustancias. Entre ellas, cloroformo, DDT.

**Grupo 3.** No clasificable. 505 sustancias: aciclovir, diazepam, sulfitos, etc.

**Grupo 4.** Probablemente no cancerígeno: caprolactam.

**Figura 8. CUADRO DE CLASIFICACIÓN DE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS.** Se mencionan algunos contaminantes y características de cada grupo de contaminantes determinados por la IARC. Los pertenecientes al Grupo 1 son los más asociados al CP (Tomado y modificado de IARC, 2015).

Aunque los niveles de partículas suspendidas que encontramos en el aire y los contaminantes contenidos pueden variar de una zona a otra, el número de nuevos casos de CP en zonas muy contaminadas hacen que este factor etiológico cada vez sea más significativo (IARC 2012).

Estudios en China han reportado 10 veces más muertes por cáncer pulmonar en no fumadoras residentes de las ciudades, comparado con las de provincia. Lo que demuestra la importancia de la contaminación del aire como un factor de riesgo en el CP (Samet, et al., 2009). Por otro lado, en el Valle de México los estudios y análisis estadísticos estiman un incremento en enfermedades respiratorias y cáncer y por tanto en la mortalidad diaria de 1.4% por un aumento de  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$  en las concentraciones de  $\text{PM}_{10}$  (Evans, et al., 2002).

## 6. Estado hormonal

Como en otros tipos de cáncer, el estado hormonal tiene un papel sumamente importante en el CP y actualmente hay información que sustenta esta relación (Albani, et al., 2007; Gorlova, et al., 2007; Mah, et al., 2011; Rodríguez, et al., 2014; Zhang, et al., 2009).

Similar al cáncer de mama, en el cáncer pulmonar una desregulación hormonal puede favorecer la fisiopatología del tumor, sobre todo por la sobreexpresión de los receptores esteroideos como los receptores de estrógenos (ER), ER- $\beta$  y ER- $\alpha$ . Se ha reportado que en el cáncer de mamá y cervicouterino la presencia del receptor ER- $\alpha$  favorece la evolución de ese tipo de tumores (Craig V J, 2015).

En el caso del cáncer pulmonar, el papel de las hormonas se relaciona principalmente con el adenocarcinoma pulmonar (ADC), sin embargo aún es controversial y los mecanismos son poco conocidos (Mah, et al., 2011; Albani, et al., 2007; Zhang, et al., 2009; Wakelee, et al., 2007). Recientemente se reportó que la expresión del receptor de estrógenos beta parece estar influenciada por los estrógenos ya que los ADC pulmonares de mujeres premenopáusicas sobreexpresaron mayoritariamente este receptor comparado con las postmenopáusicas y los hombres (Rodríguez, et al., 2014).

Existe controversia en cuanto a cómo la terapia de remplazo hormonal (TRH) favorece o no la carcinogénesis en el cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC por su siglas en inglés *Non small cell Lung cancer*), al igual que el uso de anticonceptivos como fuente exógena de estrógenos (Márquez, et al., 2009).

### **1.4 Clasificación**

El CP engloba un grupo muy heterogéneo de tumores con diferencias en su histología, localización dentro del pulmón y etiopatogenia.

De acuerdo con su histología el CP se clasifica en dos grupos:

El **Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas** (SCLC por sus siglas en inglés *Small cell Lung cancer*) o también conocido como microcítico y el **Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas** (NSCLC por sus siglas en inglés, *Non Small Cell Lung Cancer*). También existen casos excepcionales que presentan una combinación de ambos tipos al que se le llama *Cáncer pulmonar mixto* (WHO, 2013).

El SCLC representa el 15% de los casos de cáncer pulmonar, se caracteriza por presentarse en las zonas respiratorias media y alta (de tráquea a bronquios), y es el más asociado al hábito tabáquico y generalmente es tratado con quimioterapia y radioterapia. El NSCLC se desarrolla generalmente en zonas más profundas como la alveolar.

La mayoría de los pacientes se presentan en estado avanzado inoperable, en estadios 3 y 4 de la enfermedad, los cuales sólo son candidatos a la quimioterapia paliativa y algunas terapias dirigidas (WHO, 2013).

El NSCLC representa el 85% de todos los tipos de cáncer pulmonar y a su vez se divide en tres subtipos histológicos: *el cáncer de células grandes*, *el epidermoide o broncogénico* y *el adenocarcinoma* (Herbst, R S et al., 2008). Según los tipos celulares que conforman cada tumor y su localización en el pulmón el adenocarcinoma es uno de los más heterogéneos y con la mayor incidencia dentro de todos los tipos de cáncer de pulmón (Espinoza, et al., 1984; Gold, et al., 2011).

### **1.5 Adenocarcinoma Pulmonar**

El ADC Pulmonar es una entidad histopatológica conformada por diferentes estirpes celulares (Pavlova, et al, 2012). Estos tumores pueden conformarse por neumocitos de tipo I y/o II, células bronquiolares y células de Clara en diferentes combinaciones; aunque se ha visto una tendencia a que presenten mayoritariamente neumocitos de tipo II y células de Clara, importantes en la modulación de la respuesta metabólica e inmune tienden a presentar mayor grado de malignidad (William DT, et al, 2011; Espinoza, et al., 1984).



Este tipo de NSCLC, es considerado el más frecuente de todos tipos de CP y ha aumentado considerablemente en la última década, teniendo una alta incidencia comparada con la de los casos de SCLC y con el epidermoide o broncogénico, los cuales están mayormente asociados al consumo de tabaco (De la Cruz, et al., 2011). Este incremento ha sido diferencial en la población mundial, pues el grupo más afectado es el de mujeres premenopáusicas ( $\leq 35$  años), generalmente sin hábito tabáquico, lo que ha sido centro de atención para la investigación en este rubro y ha generado interés sobre los factores que están provocando estas diferencias respecto al sexo, y la relación de este tipo de cáncer pulmonar con los estrógenos (Gorlova, et al., 2007; Zhang, et al., 2009; Márquez, et al., 2009).

### **1.6 Adenocarcinoma pulmonar y su relación con los estrógenos**

A pesar de que durante varias décadas se ha asociado al hábito tabáquico como el único o el factor causal más importante para padecer CP, este paradigma ha cambiado en los últimos años, debido a que las evidencias indican que cada vez son más factores los que cobran importancia y juegan un papel específico para desarrollar CP. Además como se mencionó anteriormente el CP más frecuente actualmente es el ADC y éste es de todos el menos asociado al tabaquismo. Y la incidencia de ADC ha incrementado principalmente en mujeres jóvenes no fumadoras y también en fumadoras pasivas (Paris C. et al, 2010). Por lo anterior, el factor hormonal cobra cada vez mayor interés en ésta patología.

Las hormonas sexuales participan en la fisiología pulmonar normal principalmente durante el desarrollo embrionario propiciando la formación y buen funcionamiento del pulmón y ese mecanismo se mantiene en menor proporción en la vida adulta ayudando a su regeneración (Toh, et al., 2009; Márquez, et al., 2009).

Se ha sugerido a los estrógenos en el CP, como un factor de riesgo, sin embargo su participación en la patología y los mecanismos que activan en la carcinogénesis, aún no son claros (Márquez, et al., 2009). En cuanto a los estrógenos exógenos algunos estudios han demostrado que la terapia de remplazo hormonal (TRH) incrementa la incidencia de cáncer pulmonar (Liu, et al., 2005; Ganti, et al., 2006), mientras que otros mencionan que dependiendo de cada caso pueden tener un efecto protector en el pulmón (Schabath, et al., 2004; Schwartz, et al., 2007).

Además, el papel de los receptores de estrógenos en el ADC pulmonar es muy similar al que se ha descrito en el cáncer de mama propiciado así la carcinogénesis (Li X, et al, 2004; Wakelee, et al. 2007; Zhao et al, 2011).

Con estas observaciones se ha propuesto estudiar a los estrógenos como un parteaguas en el desarrollo de la patología y en el diseño de nuevos tratamientos contra este tipo de cáncer.

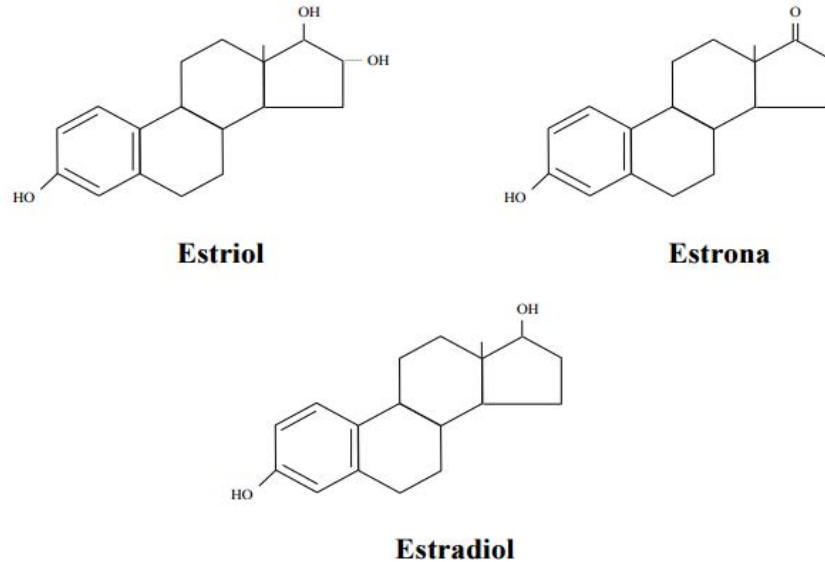
### **Estrógenos**

Los estrógenos son sintetizados a partir de la aromatización de la testosterona principalmente en el ovario, también en menor concentración en las glándulas suprarrenales. Una biosíntesis de estas hormonas se ha visto en tejidos extraglandulares como el pulmón (Marino M, et al., 2006; Águila, Verdecia & Cué., 1999; Ropero L A, 2001).

Existen tres tipos de hormonas estrogénicas de acuerdo con su potencia de acción biológica se dividen en: estriol, estrona y estradiol. Su concentración varía dependiendo del tejido y el sexo del individuo, su estructura se presenta en la figura 8, todas se sintetizan a partir del colesterol (Ropero L. Ana, 2001).

El estriol se sintetiza a partir de la estrona, ambas hormonas tienen menor concentración en sangre que el estradiol, sin embargo se sabe que por la vía oral el estriol es el más activo (Águila, Verdecia & Cué., 1999).

El estradiol, por su parte se encuentra en mayor concentración en las mujeres jóvenes, tiene un papel central en la regulación del comportamiento sexual y el desarrollo, en la diferenciación de los órganos y tejidos durante la embriogénesis, así como en funciones de reproducción, y la aparición de caracteres sexuales secundarios femeninos (Águila, Verdecia & Cué, 1999).

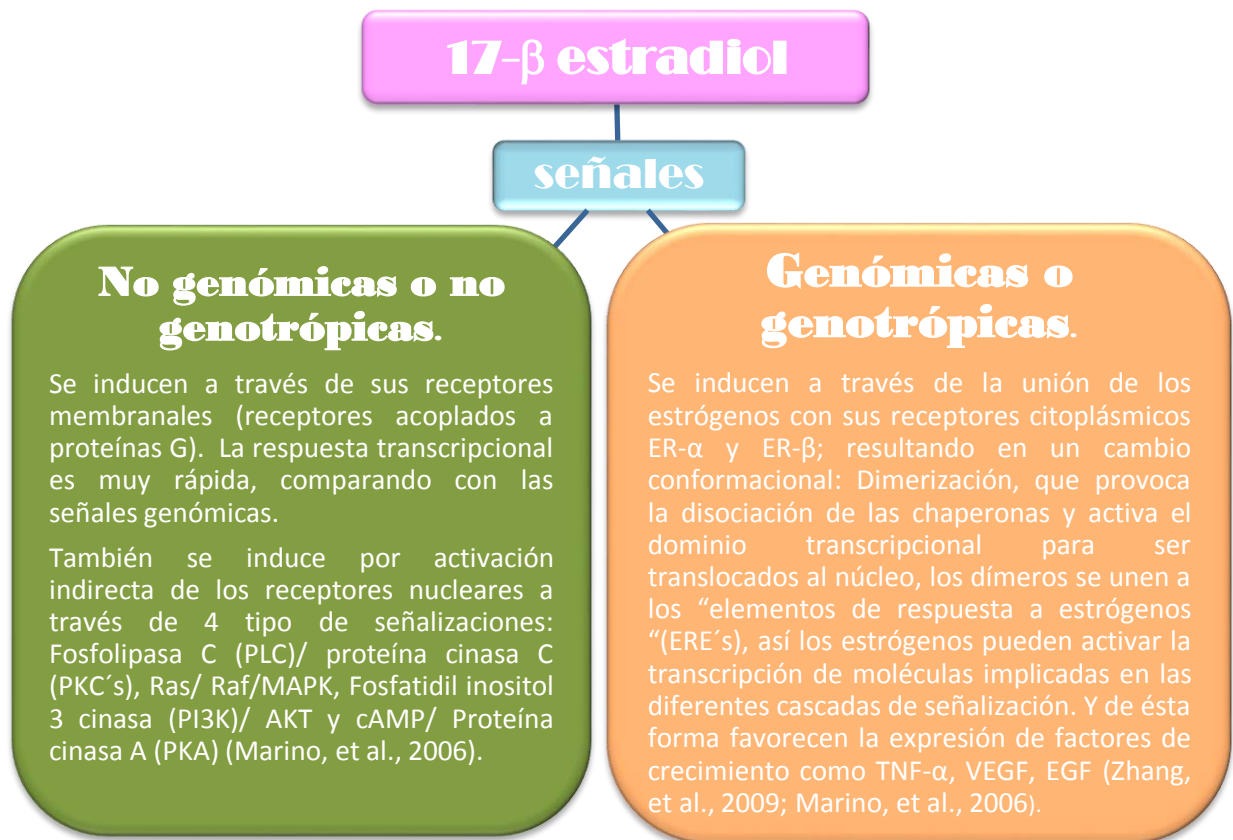


**Figura 9. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS TRES MOLÉCULAS ESTROGÉNICAS PRINCIPALES.** Todas mantienen una estructura básica esteroidea, sólo varían en los radicales y enlaces (Tomado de Roperó L, A, 2001).

**Estrógenos y carcinogénesis pulmonar.**

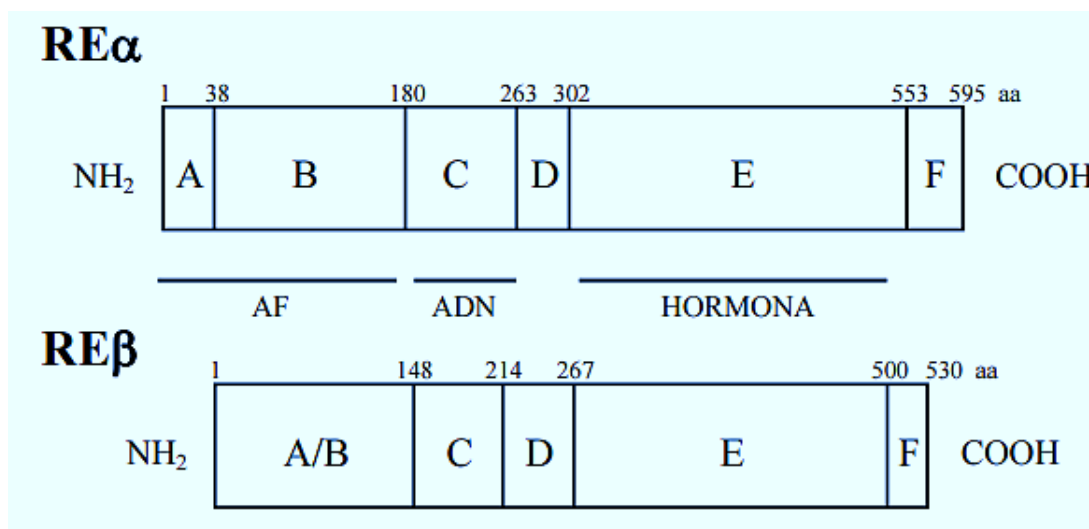
Además de la función que tienen los estrógenos en condiciones normales, estas hormonas son capaces de regular numerosas vías de señalización como lo son la proliferación y la migración, las cuáles se ven generalmente aumentadas en patologías como el cáncer, sin embargo los mecanismos por los cuáles lo hacen es un campo de investigación emergente y depende del tejido o tipo celular donde estén actuando (Marino, et al., 2006).

Los estrógenos pueden activar diversas vías de señalización a través de la vía *genómica* y la *no genómica* (Marino M, et al., 2006) como se presenta en el siguiente diagrama, mediante la unión a GPR30 el receptor membranar acoplado a proteínas G y/o a la unión a sus receptores nucleares ER- $\beta$  y ER- $\alpha$  que se encuentran en el citoplasma y son capaces de translocarse al núcleo.



Los genes que codifican a los receptores de estrógenos alfa y beta (ER-α) y (ER-β) se encuentran en distintos cromosomas y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido. El ER-α predomina en los órganos reproductivos como el útero, mama, ovarios, así como en el sistema nervioso central (SNC) e hígado, mientras que el ER-β es mayor en endotelio, hueso, pulmones, tracto urogenital, sistema nervioso central y ovarios (Noriega & Langley, 2008).

El receptor de estrógenos está formado por 6 dominios (A/B, C, D, y E/F) (Figura 10) a nivel proteína. El dominio A/B se encarga de la activación de la transcripción genética (Activation Function 1 ó AF1), el sitio C es el sitio de unión al ADN, el dominio D es el sitio de unión a la chaperona hsp90 que permanece unida al receptor mientras está inactivo, el sitio E/F es el dominio de unión al ligando (Marino, et al., 2006; Marquez DC y RJ 2001).



**Figura 10. ESQUEMA DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS DOMINIOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS  $\alpha$  Y  $\beta$  EN EL HUMANO, ASÍ COMO LA LOCALIZACIÓN DE LAS REGIONES PRINCIPALES PARA SU FUNCIONAMIENTO.** Se muestra en número de aminoácido con los que están formados y en cuales comienza y termina cada uno de los dominios. AF es la zona de transactivación y donde se marca ADN, es la zona de interacción con éste, y hormona la zona de interacción con el estrógeno (Tomado y modificado de Ropero L, A, 2001).

El ER- $\beta$  es sobre-expresado en alrededor del 80% de los adenocarcinomas pulmonares, referidos como "ER positivos" (Hershberger et al., 2009), esto se atribuye a las condiciones de hipoxia principalmente, lo cual tiene un transfondo en los cambios epigenéticos, como la sobreexpresión de la metiltransferasa GA9 y H3K9me2 las cuales se relacionan con la aceleración de los procesos de invasión y metástasis en el CP (Minamiya, et al., 2010), por otra parte el aumento de ER- $\beta$  puede deberse al aumento la expresión de la aromatasa, enzima que cataliza la producción de estrógenos, así, se propone que el tumor produce sus propios estrógenos y propicia la síntesis del receptor beta; como resultado los altos niveles de aromatasa en pacientes con NSCLC se relacionan con un peor pronóstico y menor esperanza de vida (Márquez, et al., 2009).

El extremo carboxilo-terminal del receptor que constituye el dominio de unión al ligando (LBD) reconoce a los estrógenos endógenos como el 17- $\beta$ -estradiol pero también a los ligandos sintéticos que pueden actuar como antagonistas puros o como moduladores selectivos del ER y pueden activarlo o inhibirlo dependiendo de la célula y del promotor (Noriega & Langley, 2008). Existen varios fármacos antiestrogénicos que actúan a distintos niveles y se han empleado en la quimioterapia contra el cáncer

de mama u ovario. Entre estos el más conocido es el **Tamoxifen**, que actúa inhibiendo a los receptores de estrógenos, ya que su afinidad hacia estos es mayor que la que tienen los mismos estrógenos (Song, et al., 2002), de esta forma evita la dimerización del receptor y la activación de la transcripción propiciada por la vía E2/ER.

Otro fármaco muy utilizado es el *Fulvestrant*, el cual actúa inhibiendo a los receptores de estrógeno y también dificulta el papel de la aromatasa, es un antagonista puro de E2 (Garon, Pietras, Finn, et al, 2013; Stabile, et al., 2002).

### **Estrógenos y su relación con la expresión de la quimiocina CXCL12 y el receptor CXCR4.**

Los receptores de estrógenos pueden asociarse indirectamente a promotores de genes involucrados en el ciclo celular y la regulación de numerosas vías de señalización, esto ocurre a través de uniones proteína-proteína y otros factores transcripcionales (Marino, et al., 2006). La activación directa de la vía de las MAPquinas, después de la fosforilación de éstos receptores con actividad cinasa de residuos de tirosina y la acción de moléculas co-reguladoras que actúan en conjunto con los factores de transcripción, facilitan el relajamiento de la cromatina y la regulación de la transcripción de genes que favorecen la progresión del tumor; de esta manera los estrógenos podrían estar propiciando la carcinogénesis en el adenocarcinoma pulmonar, provocando la síntesis de diversas proteínas entre ellas algunas que propician el infiltrado inflamatorio como las quimiocinas (Marino M, Galluzo P. Ascenzi P, 2006; Ropero L, A, 2001; Picatoste & Claro, 2008; Noriega R, MY & Langley M E, 2008).

Recientemente se reportó que el sexo y el estado hormonal pueden estar relacionados con la expresión de un eje de quimiocina/receptor (CXCR4/CXCL12) lo cual se dedujo a partir de lo observado en biopsias de adenocarcinomas pulmonares derivados de mujeres premenopáusicas que sobreexpresaron estas proteínas comparado con los tumores de mujeres posmenopáusicas y hombres (Rodríguez et al, 2014). Algunos autores mencionan que este evento, puede deberse a alteraciones en oncogenes o a la activación de vías de señalización relacionadas con los ER's, como ha sido observado en células de cáncer de mama por Yan Li y cols., que vieron que el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER 2) provocaba la

sobreexpresión de CXCR4, recepto que regula la vía PI-3K/Akt/mTOR favoreciendo la progresión de los tumores de máma ya que la vía está implicada en procesos de invasión y metástasis (Yan, Li, et al., 2004).

### **Quimiocinas en el CP**

Las quimiocinas, son una familia de 48 citocinas quimiotácticas que interactúan con 7 receptores transmembranales acoplados a proteínas G para guiar principalmente la migración de células del sistema inmune entre otras, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, a través de un gradiente de concentración de menor a mayor (Zlotnic A. a Homey B., 2011); también tienen un papel importante durante la embriogénesis determinando la ubicación de cada tipo celular, la diferenciación y la distribución de los distintos tejidos.

Se dividen en cuatro familias, según la posición de sus residuos de cisteína CXC, CC, C y CX3C; las CXC son las quimiocinas homeostáticas que tienen mayor participación en la migración celular. Por otra parte, se conoce que las células tumorales, expresan un repertorio relativamente limitado de quimiocinas y sus receptores, los cuales utilizan y manipulan de manera que se favorece el crecimiento local del tumor y posteriormente la diseminación a distancia o la metástasis, por su capacidad quimioatrayente actuando a través de un gradiente de concentración, las quimiocinas al ser secretadas se unen a proteoglicanos y otras proteínas de la matriz extracelular, creando un gradiente sólido por el cual las células van migrando hacia otro tejido blanco. El papel de las quimiocinas en la migración celular es un paso inicial de la metástasis y se ha visto que los tumores que expresan receptores de quimiocinas son más agresivos y la esperanza de vida de los pacientes se ve disminuida (Su, et al., 2005; Suárez, et al., 2003; Zlotnic, et al., 2011).

En el microambiente del tumor se secretan quimiocinas que actúan de manera autocrina y paracrina activando sus respectivos receptores que interactúan para promover la supervivencia de células tumorales, su crecimiento, y también para mejorar la neo-angiogénesis del tumor (Sunaga, et al., 2010).

Los tumores de NSCLC tienden a migrar a nódulos linfáticos, hígado, cerebro y al pulmón contralateral debido a que son atraídos por un gradiente de quimiocinas que se unen a receptores de quimiocinas expresados en la membrana de las células tumorales (Su, et al., 2005).

Entre las principales quimiocinas y receptores que expresan las células tumorales se encuentran:

CXCR4, CXCL12, CCR7, CCL21, CCR10 los cuáles están implicados en procesos de inflamación y control de metástasis.

CXCL12 o SDF-1 es una quimiocina que tiene un papel central en la migración, con una distribución en prácticamente todos los tejidos, además de ser el único ligando de CXCR4 y éste, a su vez es un receptor ampliamente expresado por los tumores malignos incluido el CP (Mantovani A, 2004; Zlotnic A. a Homey B., 2011).

En procesos fisiológicos normales, CXCL12 es fundamental en el reclutamiento y dirección de las células formadas durante la hematopoyesis, mientras que en el tumor participan en procesos proinflamatorios y de metástasis junto con su receptor CXCR4 (Cai, et al., 2013) y han sido centro de múltiples investigaciones para entender el progreso de diferentes tipos de cáncer.

Se ha visto que las células del estroma mantienen la producción continua de CXCL12 aumentando la concentración hasta llegar al tejido blanco (Aerts, et al., 2013).

Por otra parte, su receptor CXCR4, formado por 7 dominios transmembranales acoplados a una proteína G, ha sido estudiado en el NSCLC en tumores con invasión local y en metastásis distantes, donde la expresión de CXCR4 en tejido pulmonar normal fue realmente baja, mientras que en las muestras de tejidos metastásicos fue alta, por lo que el eje CXCL12-CXCR4 está relacionado con un mal pronóstico (Su, et al., 2005).

En estudios previos realizados en células A549 y SKLU1, se encontró que al estimularlas con CXCL12 se provocaba la formación de agregados celulares por la sobreactivación de la proliferación, los cuáles, al usar un fármaco inhibidor específico de CXCR4 conocido como **Pleraxifor o AMD3100** así como también el uso de *siRNA*'s contra la quimiocina y *anticuerpos monoclonales anti-CXCL12*, se



desintegran y se detiene la proliferación (Wald, O, et al., 2011; Sunaga, et al., 2010). Lo que sugiere que la activación del eje CXCR4/CXCL12 propicia la progresión tumoral. El pleraxifor es un agente que recientemente fue aprobado por la Unión Europea para su uso en la obtención de células troncales hematopoyéticas destinadas al trasplante autólogo de sangre en pacientes con linfoma, mieloma y melanoma. Es una molécula pequeña antagonista del CXCR4 que inhibe de manera reversible la interacción con CXCL12 (Aerts, et al., 2013).

La sobreexpresión del receptor CXCR4 hace que las células tumorales sensibles a la señalización inducida por CXCL12, sobrevivan, proliferen, induzcan angiogénesis, migren e invadan tejidos distantes (Wald O., Shapira M. & IzharUzi, 2013)

### **1.7 Migración celular y ADC pulmonar.**

La migración celular se considera en general un proceso cíclico comenzando con la adquisición de una polaridad celular es decir, se genera una asimetría espacial entre los dominios de la célula; la *actina* una importante molécula del citoesqueleto, se polimeriza, causando cambios en la conformación de las células y generando proyecciones citoplasmáticas conocidas como filopodios y lamelipodios, mientras que las señales externas, estímulos quimiotácticos como CXCL12- CXCR4, factores de crecimiento o proteínas de la matriz extracelular determinan la dirección de la migración. Estos lamelipodios y filopodios se anclan a la matriz extracelular (MEC) ó a células adyacentes para avanzar hacia su meta final, los puntos de adhesión conocidos como “adhesiones focales”, permiten que el movimiento sea dinámico de tal modo) que, se deben desestabilizar en la parte lateral y trasera de la célula (retracción y contracción para permitir un movimiento celular ameboide (Huertas-Fernández, Cecilia, 2013).

La migración es un proceso celular muy complejo el cuál es mediado por distintas moléculas implicadas en la dirección, adhesión celulares y transformación del citoesqueleto, moléculas como las quimiocinas homeostáticas tal como CXCL12, que está implicada en procesos de migración de células cancerosas de manera semejante a cómo funciona para la movilización de los leucocitos en condiciones normales (Wald, et al., 2013).

Este tipo de quimiocinas activan a linfocitos T y provocan la secreción de más citocinas proinflamatorias que inducen la expresión de MMP's en los macrófagos y moléculas de adhesión que regulan la migración celular (Hartmann, et al., 2005; Zlotnic A. a Homey B., 2011).

En NSCLC, la quimiocina CXCL12 se ha visto implicada en la fosforilación de ERK promoviendo la síntesis de metaloproteasas, en especial de MMP-9 y también la activación de GTPasas de la familia Rho, encargadas de los cambios de filamentos de actina en el citoesqueleto celular, las más estudiadas por su relación con el proceso de migración son RhoA, Rac1 (genera lamelipodios y ondulaciones en la membrana) y Cdc42 (involucrada en la formación de filopodios) éstas cinasas trabajan en conjunto con distintos receptores tirosina cinasa (EGFR, PDGF, VEGF), facilitando la movilidad y migración de las células (Burger et al., 2003; Hartman et al., 2005; Ridley et al., 1992; Wald et al., 2011).

### **CXCL12/CXCR4 en la migración de células de adenocarcinoma pulmonar.**

El mecanismo más estudiado en el ADC pulmonar mediado por CXCL12/CXCR4, al igual que en otros tipos de cáncer, es la *metástasis*, donde la migración local es el primer paso para la diseminación a distancia.

Como ya se mencionó, las células de ADC que tienen CXCR4 sobreexpresado, avanzarán atraídas hacia los tejidos asociados que estén secretando mayor cantidad de CXCL12, por lo que presentan un alto potencial metastásico (Su, et al., 2005; Márquez, et al., 2009).

Estudios realizados en SCLC debido a su rápida progresión y metástasis revelaron que el eje CXCL12-CXCR4 favorece también la síntesis de moléculas de adhesión como las integrinas ( $\beta$ -integrina 4 y 5 y VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular) y facilita su desplazamiento a través de la interacción con las fibras de colágeno y fibronectina de la matriz extracelular este fenómeno se ha visto relacionado con la resistencia a algunos fármacos; empleando antagonistas de CXCR4 como T140 o pleraxifor, y anticuerpos anti-VCAM-1 se comprobó la importancia que tiene éste eje en la migración celular y metástasis en SCLC y NSCLC (Hartmann, et al. 2005; Burger, et al, 2003 b).

---

Como ya se explicó la principal función de esta quimiocina se obtiene mediante la formación de un circuito autocrino con su receptor *CXCR4*, que desempeña un papel esencial en el crecimiento, estimulando la proliferación y la migración que favorece la invasión y diseminación metastásica de las células tumorales. Existe cada vez más evidencia de que la quimiocina *CXCL12* y su receptor *CXCR4* contribuyen en el ADC mayoritariamente a la progresión de la metástasis e inmunosupresión del tumor (Robledo, et al., 2001).

Es interesante la reciente relación de éste eje quimiocina receptor con los estrógenos en el ADC pulmonar, donde Rodríguez-Lara y cols. (2014) encontraron una mayor expresión de *CXCR4/CXCL12* en mujeres premenopáusicas comparado con los ADC de mujeres postmenopáusicas y hombres. En otro estudio *in vitro* de éstos investigadores, se estimularon células adenocarcinoma pulmonar de mujeres premenopáusicas (H1435), de mujeres postmenopáusicas (SK-LU1) y células de hombres (H23) con 17- $\beta$ -estradiol para analizar la relación de los E2 en la expresión de *CXCR4*; por inmunofluorescencia se observó que la expresión del receptor de quimiocina dependiente de la dosis y del tiempo de estímulo con estradiol, además se observó la mayor expresión de *CXCR4* en la línea celular H1435 correspondiente a mujeres premenopáusicas.

Relacionando el aumento en los casos de NSCLC específicamente de adenocarcinoma en mujeres premenopáusicas y las distintas evidencias de las diversas implicaciones que pueden tener los estrógenos en el adenocarcinoma pulmonar aunado a la importante participación del eje *CXCL12/CXCR4* en la migración y metástasis, es interesante investigar la posible relación de ambas vías (E2/ER y *CXCR4/CXCL12*) y la búsqueda de otros mecanismos por los cuáles éste tipo de tumores progresa y de ésta manera dar nuevas alternativas de diagnóstico y terapia.

### 2.1 Justificación.

Distintos estudios muestran un aumento del ADC pulmonar en mujeres premenopáusicas, que presentan un peor pronóstico comparado con mujeres posmenopáusicas y hombres, lo que ha sugerido que los estrógenos tienen un papel importante en la carcinogénesis pulmonar.

Por otra parte, la vía de la quimiocina CXCL12 y su receptor CXCR4 es muy importante en la migración celular tumoral y la subsecuente metástasis, y se ha reportado que el 17- $\beta$ -estradiol favorece la expresión de CXCR4 en el adenocarcinoma pulmonar, sin embargo los mecanismos de acción de estas vías han sido pobremente estudiados.

Por lo anterior en el presente estudio se busca conocer si el 17- $\beta$  estradiol, favorece el proceso de migración estimulando la activación de esta vía receptor/quimiocina, lo cual podría tener un importante papel en la agresividad del tumor y el pronóstico de la(o)s pacientes con ADC pulmonar.

**3.1 Hipótesis.**

Los estrógenos (17- $\beta$ -estradiol) incrementarán la migración de las células de ADC pulmonar al favorecer la activación del eje CXCL12 / CXCR4.

**3.2 Objetivos.**

**General.**

Evaluar el papel del 17- $\beta$ -estradiol en la migración de las células de adenocarcinoma de pulmón, a través de la activación de la vía CXCL12 / CXCR4.

**Particulares.**

- 1.- Evaluar el papel del 17- $\beta$ -estradiol en la migración de las células SKLU-1 y A549 de ADC pulmonar mediante la activación del eje CXCL12 / CXCR4 por medio de la Prueba de Cierre de herida.
- 2.- Evaluar el efecto inhibitor de los fármacos antineoplásicos AMD3100 (Pleraxifor) y Tamoxifen, en el proceso de migración celular.

### 4.1 Método.

#### 1. Líneas celulares y cultivo celular

Se obtuvieron las líneas celulares de ADC pulmonar A549 y SKLU-1 de la American Type Culture Collection. La línea SK-LU1 fue cultivada en medio DMEM (Dulbecco's Eagle Medium) con suero fetal bovino (SBF) al 10% (Gibco) y penicilina/estreptomicina 1%. La línea A549 fue cultivada en medio DMEM F12, 10% de SBF y 1% penicilina/estreptomicina. Ambas líneas celulares fueron cultivadas a 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire y humedad a 37°C. Las líneas fueron cultivadas en éstas condiciones hasta obtener una confluencia mínima del 80%. Se cultivaron aproximadamente 8 mil células por pozo en cajas de 12 pozos y se llevaron a cabo subcultivos para mantener las líneas celulares.

#### Características de las líneas celulares:

La línea celular SK-LU1 se deriva de adenocarcinoma de pulmón de una mujer postmenopáusica caucásica de 60 años de edad. Mientras que la línea celular A549 se desarrolló en 1972 a través de la remoción y cultivo de tejido canceroso de un hombre de 58 años de edad. Ambas líneas celulares, pertenecen al epitelio alveolar humano, *in vitro* se comportan como células adherentes que crecen en monocapa e *in vivo* pueden inducir tumores en ratones atímicos. Ambas líneas celulares son ER+ por lo que son capaces de responder a estímulos estrogénicos externos (Garon, et al., 2013; Márquez, et al., 2009).

#### 2. Estandarización de la concentración del fármaco Pleraxifor o AMD3100.

En placas de 96 pozos se sembraron de 3 a 4 mil células por pozo incubadas por 24 horas y tratadas con Pleraxifor (AMD3100) para determinar la dosis no letal de éste fármaco, se probaron las siguientes concentraciones: [1nM], [10nM], [25nM], [50nM],

[100nM], [250nM], [500nM], [1000nM], con las que se tuvo un amplio rango para observar su efecto citotóxico.

Se realizaron curvas dosis-respuesta de las réplicas en la línea SKLU y el efecto de cada una de las concentraciones del fármaco sobre la viabilidad celular, fue medido mediante el ensayo de MTT. Los resultados de viabilidad fueron obtenidos de tres experimentos independientes y en réplicas.

Por otra parte, la concentración de Tamoxifen empleada fue [17 $\mu$ M] se basó en nuestro antecedente directo (Rodríguez-Lara, 2014).

### 3. Condiciones del cultivo y Prueba de Cierre de herida.

Posterior a la estandarización de las concentraciones de cada compuesto se realizaron los tratamientos, como se explica en la en la tabla 1 y se prosiguió con la prueba de migración mediante el ensayo de “Cierre de herida”.

El ensayo de Cierre de herida es una prueba básica de migración que consiste crear una herida y observar el índice de cierre a través del tiempo.

Las células fueron cultivadas hasta alcanzar un 80% de confluencia, posteriormente las condiciones de cultivo en las que crecieron las células (DMEM y DMEM-F12, 10% SBF, 1% penicilina/estreptomicina), cambiaron por medio de ayuno DMEM libre de fenol rojo y SBF sin hormonas, para asegurar un ambiente libre de hormonas y poder probar el efecto de los estrógenos. Las células se mantuvieron en estas condiciones 24 horas previas a la aplicación de los diferentes tratamientos.

Pasado este tiempo, con la punta de una micropipeta de de 2-20 $\mu$ se realizó una brecha en línea recta que atravesó cada pozo por la mitad (Figura 10), una vez hecha la “herida” se hicieron 2 - 3 lavados con PBS para quitar las células desprendidas en el área de la brecha, inmediatamente se puso en cada pozo el tratamiento correspondiente como se explica en la tabla 1 y en la figura 10.

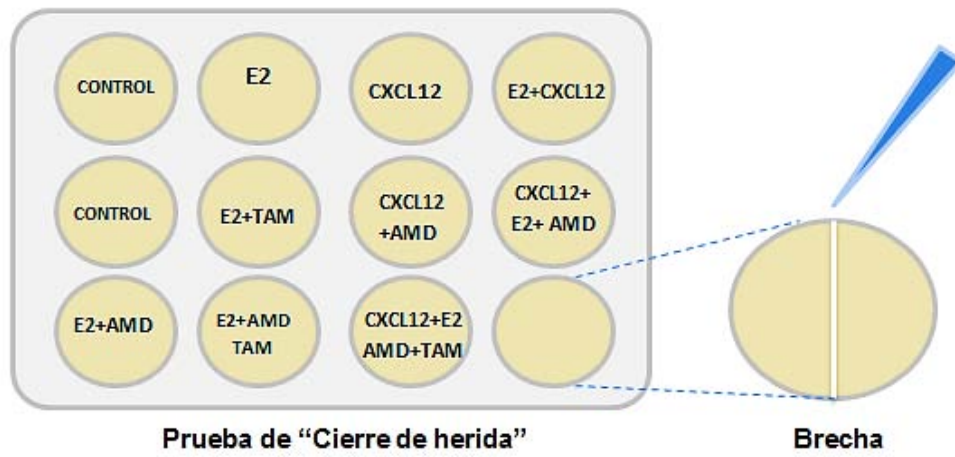
**Tabla 1. Condiciones de cultivo por tratamiento.**

| Grupo   | Condiciones del cultivo  |
|---|--|
| Control (CTRL)  | Se mantuvieron en 1ml de DMEM sin fenol rojo y con SBF sin hormonas (1%) esta condición de cultivo se aplicó a todos los grupos en los cuales se aplicaron tratamientos. |
| Estímulo de Estrógenos (17- $\beta$ -estradiol)(E2)                                 | 17- $\beta$ estradiol [10nM].  |
| Estrógenos + Inhibidor de CXCR4(Pleraxifor) (E2+AMD)                                | 17- $\beta$ estradiol [10nM] + Pleraxifor (AMD3100) [50nM].  |
| Estrógenos + Tamoxifen (E2+TAM)   | 17- $\beta$ estradiol [10 nM] + Tamoxifen [17 $\mu$ M].  |
| Estrógenos + Pleraxifor (Inhibidor de CXCR4) + Tamoxifen E2+AMD+TAM.                | 17- $\beta$ estradiol [10 nM] + Pleraxifor (AMD3100) [50nM] + Tamoxifen [17 $\mu$ M].  |
| Quimiocina CXCL12   | Quimiocina CXCL12 [250nM].   |
| Quimiocina CXCL12 + 17- $\beta$ -estradiol (CXCL12+E2)                              | Quimiocina [250nM] + 17- $\beta$ -estradiol [10nM].  |
| Quimiocina CXCL12+ Inhibidor del receptor CXCR4 (CXCL12 + AMD) (+)(-)               | Quimiocina CXCL12 [250 nM] + Pleraxifor (AMD3100) [50nM].  |
| Quimiocina + Tamoxifen (CXCL12 + TAM)   | Quimiocina CXCL12 [250nM] + Tamoxifen [17Mm]   |
| Quimiocina+ 17- $\beta$ -estradiol+ Pleraxifor+ Tamoxifen (CXCL12 + E2 + AMD + TAM) | Quimiocina CXCL12 [250 nM] + 17- $\beta$ estradiol [10 nM] + Pleraxifor (AMD3100) [50nM] + Tamoxifen [17Mm]  |



Con las condiciones mencionadas en la tabla 1, la organización de los grupos en la caja de 12 pozos fue:

- Dos pozos con condiciones de grupo control (CONTROL).
- Tres pozos tendrían sólo factores de migración (E2, CXCL12, E2+CXCL12).
- Siete serían una combinación de “inhibidores y activadores” de migración celular (E2+AMD, E2+TAM, E2+AMD+TAM, CXCL12+AMD, CXCL12+E2+AMD, E2+CXCL12+TAM+AMD).



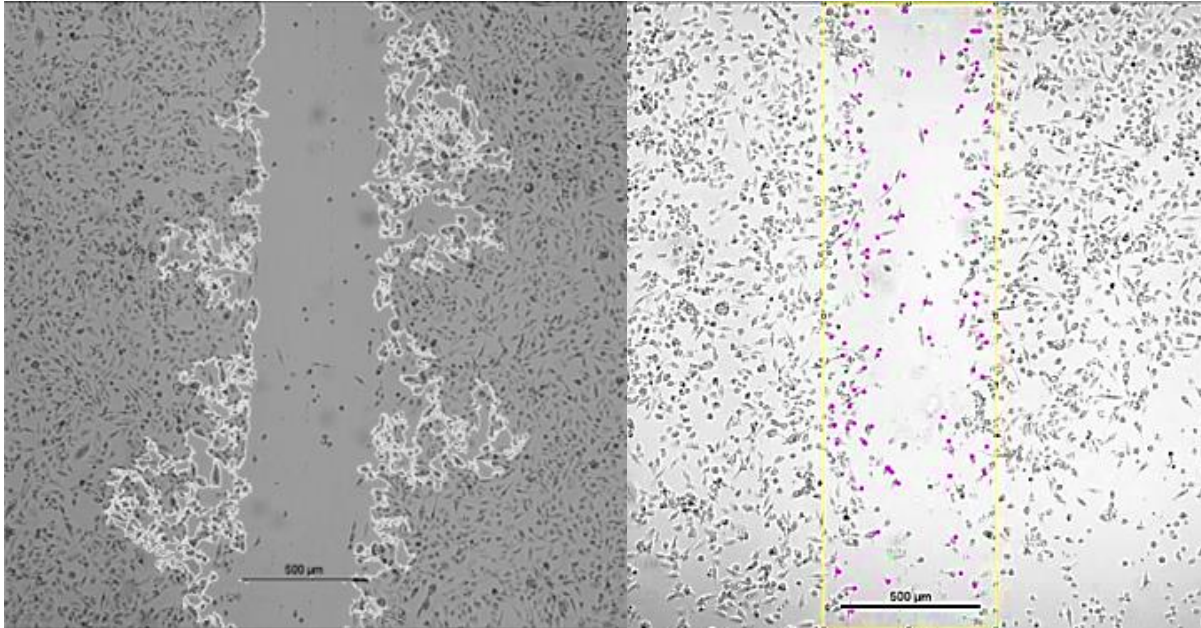
**Figura 10. PRUEBA DE CIERRE DE HERIDA.** Distribución de tratamientos en las cajas de 12 pozos; E2: estrógenos, TAM: tamoxifen, AMD: pleraxifor, CXCL12: quimiocina.

Posteriormente a la realización de la brecha, se tomaron fotografías de dos campos por pozo con un microscopio óptico invertido, a un aumento de 4x a los tiempos 0h, 6h, 24h y 72h. Siendo un total de 3 réplicas de cada experimento para cada línea celular.

Usando el software *Image J* se midió el área de la “herida” (brecha) en las fotografías de cada tratamiento, en los tiempos 0, 6, 24, 72 hrs, esto se hizo trazando todo el perímetro de la herida (Figura 11) obteniendo el área y la media de cada medición.

Posteriormente usando el mismo software se contó el número de células migrantes dentro de la brecha, se generó un rectángulo formado de la brecha de los grupos a tiempo cero como se ejemplifica a continuación en la figura 11 el cual permitió tener un tamaño de la brecha basal (500µm) para comparar el número de células migrantes

dentro del rectángulo; el conteo celular sólo se realizó en los tiempos 24h y 72h donde se observó mayor migración.



**Figura 11.** Ejemplificación en la medición de las áreas de la brecha (marcaje del perímetro de la brecha) y el conteo celular en *Image J*; a partir de un rectángulo que asemeja la herida a 0h, se contaron de manera puntual cada célula con morfología de migración dentro de la brecha (4x).

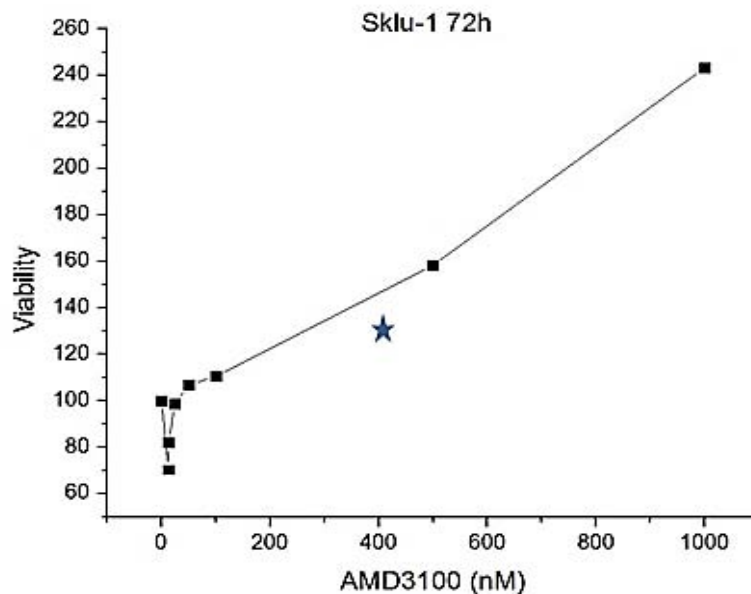
### **Análisis estadístico.**

Teniendo las áreas de las 3 réplicas de cada grupo durante los 4 tiempos, y el número de células a 24h y 72h de ambas líneas celulares, se prosiguió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) con el programa *GraphPad Prism 5.0*, con el fin de determinar si existe diferencia significativa entre los grupos analizados. Posteriormente se realizó la prueba *post hoc* de Tukey para determinar si existieron diferencias entre los tratamientos y el grupo control y los tratamientos con los inductores de migración y sus combinaciones y sus respectivos inhibidores. En todos los casos  $P < 0.001$  fue considerada como significativa.

**Resultados.**

**Pruebas de viabilidad:**

Derivado de las pruebas de viabilidad con el ensayo MTT (fig. 12) se observó que las concentraciones a las cuales el fármaco pleraxifor (AMD3100) tuvo un mejor efecto sin alterar la viabilidad celular (80% de viabilidad) fueron a 25nM, 50nM, 100nM. De las tres concentraciones se optó por usar la concentración 50nM para todas las pruebas, en la gráfica se puede observar que es una concentración donde las células se comportan muy similares al grupo control.



**Figura 12. GRÁFICA DE VIABILIDAD EN LAS CÉLULAS SKLU-1 PARA LA CONCENTRACIÓN DE PLERAXIFOR.** Se observa el número de células vivas vs la concentración de Pleraxifor (AMD3100); 50nM fue la concentración a la cual el fármaco actúa sin aumentar o disminuir la proliferación celular pero la viabilidad se mantiene similar al grupo control.

## **Prueba de Cierre de herida.**

Se llevaron a cabo tres réplicas de la prueba de cierre de herida para cada línea celular, de las cuales se analizaron dos campos (4X) por pozo correspondiente a cada tratamiento, en las figuras 13, 14, 17 y 18 se muestran los paneles de micrografías representativas de cada grupo a lo largo de los tiempos evaluados (0h, 6h, 24h y 72h) para cada línea celular, donde se observan los cambios morfológicos y el efecto en la migración de los distintos tratamientos.

## **SK-LU1**

Con respecto al efecto de los tratamientos en la migración de la línea celular SKLU-1 (derivada de mujer de > 55 años) en los diferentes tiempos, observamos al tiempo cero un área de la herida muy similar entre todos los grupos, dicha área correspondió a la brecha recién realizada con una distancia de  $\sim 500\mu\text{m}$ , como se esperaba, no hubo diferencia significativa de las áreas entre los grupos. Todos los grupos comenzaron con la misma área (se ejemplifica en la primera micrografía correspondiente a 0h de la figura 13 y 14).

6h después de que se adicionaron los tratamientos comenzaron a observarse pequeños cambios en los grupos E2 + Pleraxifor (AMD3100) + Tamoxifen y CXCL12 + E2 + TAM + AMD3100, aumentando el área de la brecha aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas (ver figura 14 C, 14 D, Gráfica 15B). Es probable que este aumento de la brecha se deba la pérdida de densidad celular por muerte celular como se puede ejemplificar en la *figura 14 D*.

A las 24h todos los grupos excepto CXCL12+AMD y CXCL12+E2+AMD presentaron una diferencia significativa con respecto al control en el área de la brecha. El área de los grupos E2, CXCL12, CXCL12+E2 y E2+AMD disminuyó significativamente respecto al control, lo cual indica que en estos grupos hubo migración celular. En los grupos donde el Tamoxifen estuvo presente, las áreas fueron mayores con respecto al control y a los grupos donde se trató con estrógenos, lo cual muestra que los estrógenos favorecen la migración y el tratamiento con tamoxifen restringe esta actividad. Los grupos que fueron tratados sólo Pleraxifor no mostraron diferencias con respecto al control y aunque el área fue mayor que en el grupo tratado con quimiocina

---

lo cual indica que éste tratamiento restringió la migración, no hubo diferencias significativas (figura 13 B, 13D, 13F, 14A, 15 C).

72 horas post-tratamiento se observó el mismo patrón que se vio a las 24 horas. La diferencia entre los grupos de estímulo con estrógenos y quimiocina vs los grupos de inhibición fue más notoria. Se observó una disminución significativa en el área de la brecha en el grupo E2, CXCL12 y E2+CXCL12 con respecto al control. Lo que apoya el efecto de los estrógenos y la quimiocina en la migración celular. Además observamos una disminución en el área de los grupos E2+TAM y E2+TAM+AMD con respecto al control, y en el grupo Tamoxifen comparado con el grupo estimulado con E2, lo cual muestra como en los tiempos pasados el efecto de los estrógenos en la migración celular y la restricción que tiene el tamoxifen en esta vía. De igual forma el pleraxifor restringió la migración celular significativamente comparado con el grupo CXCL12 ya que presentó un área mayor con respecto al grupo tratado con la quimiocina (Figura 13, 14, 15D).

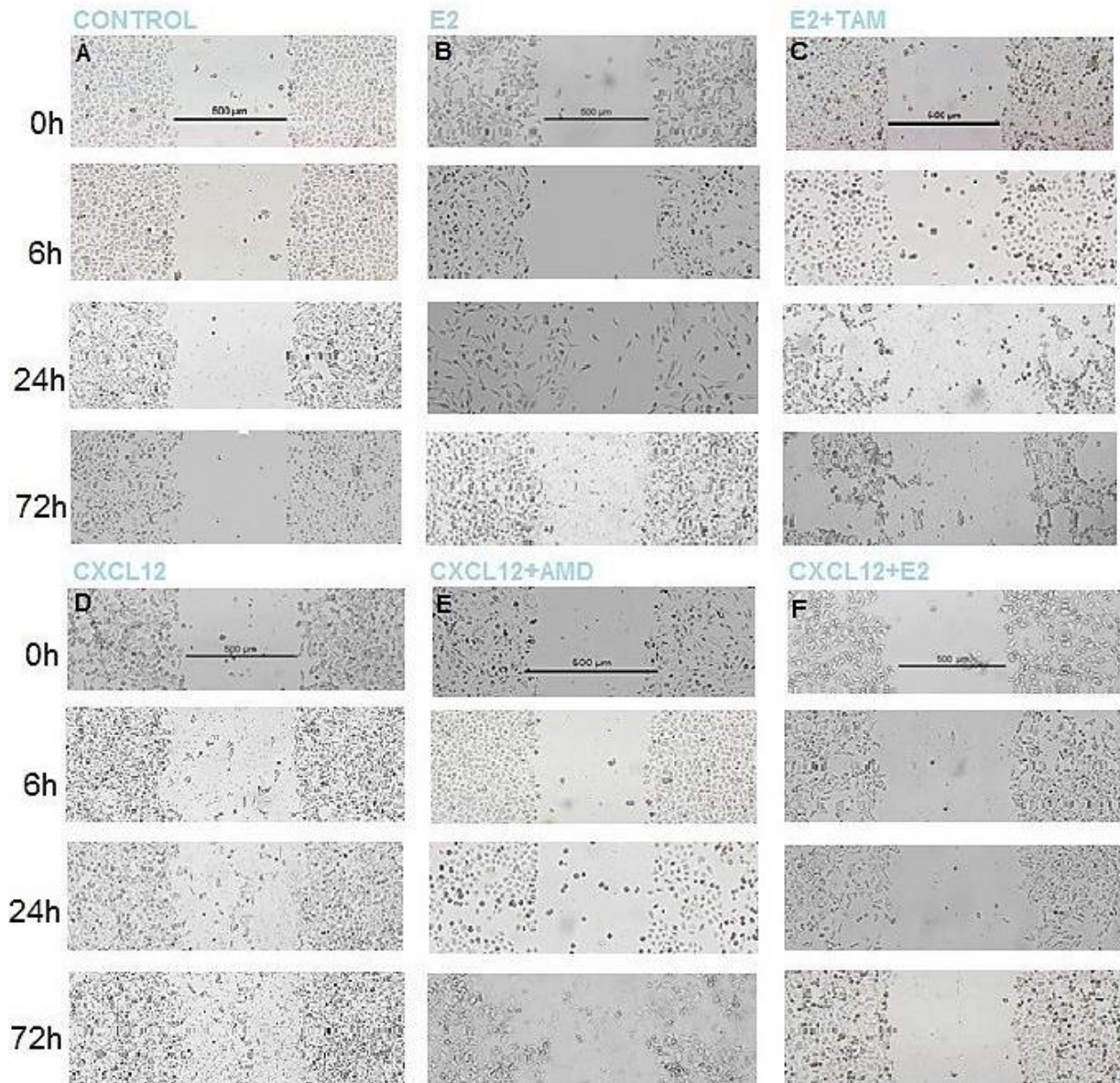


Figura 13. Panel de micrografías de la línea SK-LU1, los principales grupos problema a lo largo de los tiempos 0h, 6h, 24h, 72h post-tratamiento. (A) Control, las células son muy pequeñas mantienen su morfología poligonal pero no presenta cambios en la herida a lo largo del tiempo en cambio el grupo, no hay migración significativa (B) estimulado con estrógenos tiene cambios morfológicos desde las primeras horas y 24h después las células tienen formas alargadas con filopodios y migran de manera irregular hacia la brecha (C) al añadir Tamoxifen no se observa migración y desde 6h toman formas globulares y pierden uniones celulares se observan espacios muy grandes entre las células aún adheridas a 24h se observa gran porcentaje de muerte celular y a 72h se pierde completamente la monocapa, mientras que con el (D) estímulo de quimiocina CXCL12 las células migran desde las primeras horas y se mantiene a lo largo del tiempo; (E) aún con CXCL12 el efecto del inhibidor de CXCR4 evita la migración de las células, manteniéndolas quiescentes y estresadas,

hasta que 72h posterior al tratamiento se observa muerte celular (F) gpo. CXCL12+E2 las células tienen un aspecto alargado y 24h se observan algunas células migrantes en la herida pero la migración declina conforme al tiempo.

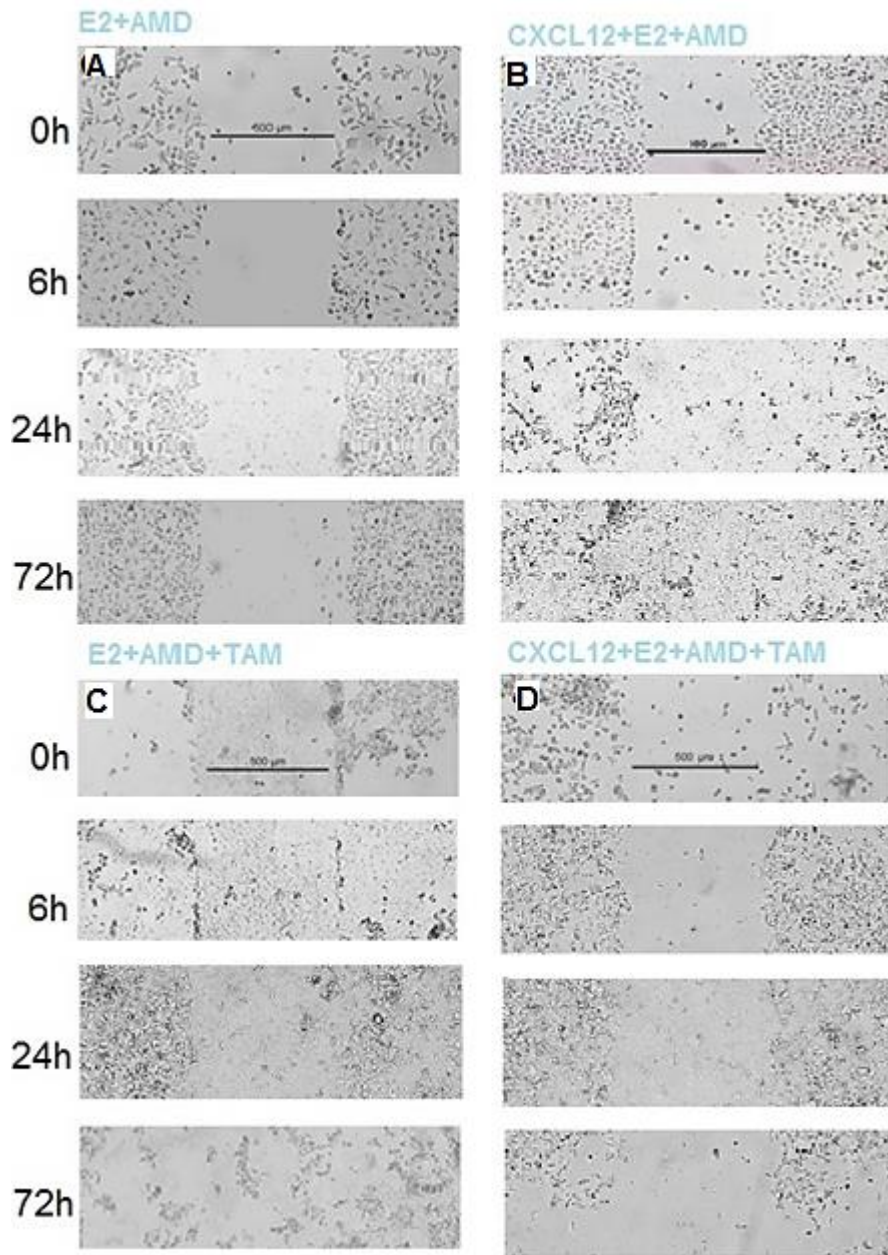
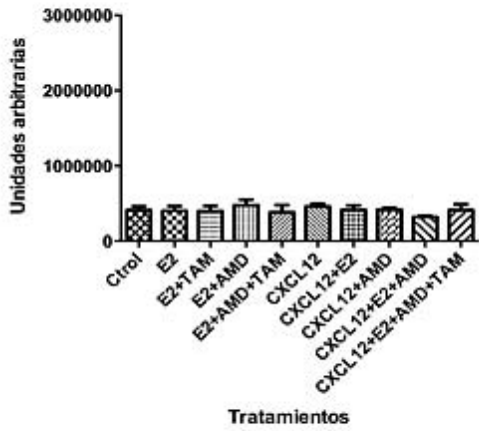
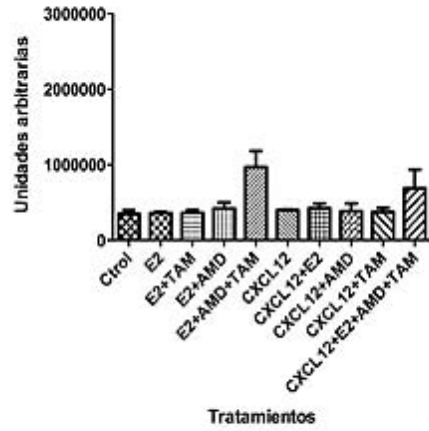


Figura 14. (A) grupo E2+AMD no hay migración y las células entran en un estado de estrés, se observa la monocapa más tenue desde las 24h como si perdieran uniones celulares y posteriormente algunas comienzan a desprenderse, (B) no se observan células migrantes en ninguno de los 4 tiempos; cuando se añaden los dos fármacos E2+Pleraxifor+Tamoxifen (C) el efecto es más acelerado, éstas células parecen ser muy sensibles al efecto de éste fármaco, desde tiempo 0 se observa muerte celular, para el gpo. CXCL12+E2+AMD+TAM (D) se observa un efecto similar.

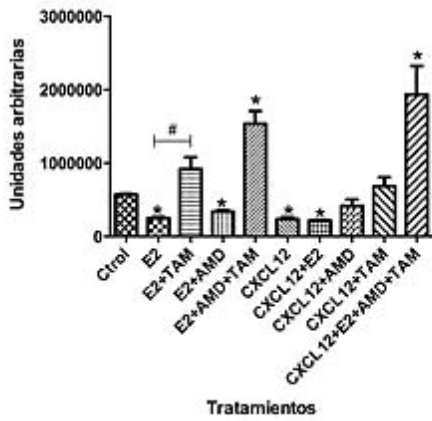
**A** SK-LU1 Área de la brecha 0h



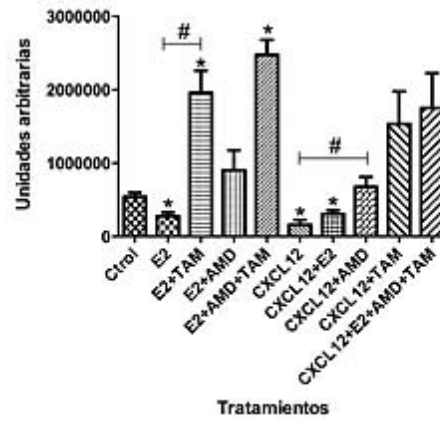
**B** SK-LU Área de la brecha 6h post-tratamiento.



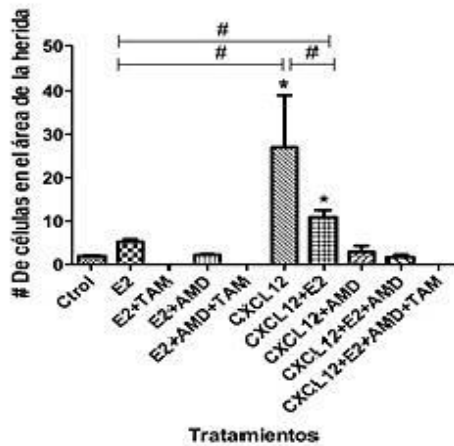
**C** SKLU Área de la brecha 24h post-tratamiento.



**D** SK-LU1 Área de la brecha 72h post-tratamiento.



**E** Migración de células SKLU 24h post-tratamiento.



**F** Migración de células SKLU 72h post-tratamiento.

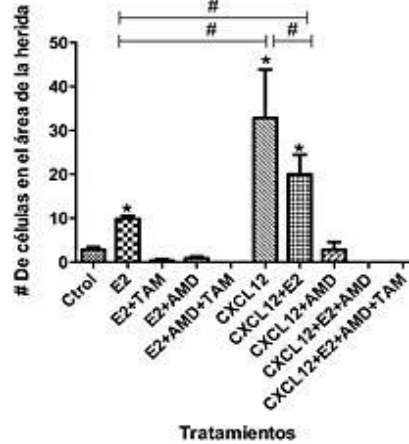




Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre la migración celular en la línea SKLU-1. (A) Áreas de la brecha en el tiempo cero. (B) Áreas de la brecha a 6 h después del tratamiento los grupos con la combinación de Tamoxifen y Pleraxifor comienzan incrementar el área de la brecha pero ningún tratamiento tiene diferencia significativa. (C) Áreas de la brecha a las 24h post-tratamiento, hay diferencia significativa respecto al control en todos los grupos ( $*p<0.001$  ANOVA, Tukey *post-hoc* test) excepto en E2+TAM, CXCL12+TAM y CXCL12+AMD. Los grupos tratados con estrógenos, CXCL12 y CXCL12+E2 fueron significativamente menores al control lo cual indica la inducción de migración por estos tratamientos. El tratamiento con Tamoxifen causó un incremento en el área con respecto al grupo E2 ( $\# p<0.001$  ANOVA, Tukey *post-hoc* test). (D) Áreas de la brecha a 72h post-tratamiento las diferencias son mayores respecto a los otros tiempos entre los grupos con activadores de migración con un área más pequeña que el control ( $*p<0.001$  ANOVA, Tukey *post-hoc* test) y también respecto a los grupos con fármacos antiestrogénico y Pleraxifor ( $\#p<0.001$  ANOVA, Tukey *post-hoc* test) con áreas mayores a los demás grupos, lo que muestra su actividad de restricción en la migración y apoya el papel de los estrógenos y la quimiocina en este evento; (E) gráfica de las células migrantes a 24h post-tratamiento, se muestra que la quimiocina y la combinación quimiocina y estrógeno incrementan significativamente la migración respecto al control. En la derecha (F) se muestra la gráfica de las células migrantes a 72 horas post-tratamiento, los grupos E2, CXCL12 y CXCL12+E2 incrementaron significativamente la migración respecto al control. En ambos tiempos el efecto de la quimiocina fue mayor que el de E2 y que la combinación E2+CXCL12, sin embargo la combinación E2+CXCL12 tuvo un efecto mayor en la migración que la de E2 solos. Con (\*) se presentan las diferencias respecto al control y con (#) las diferencias entre los grupos de interés ( $p<0.001$  ANOVA, Tukey *post-hoc* test).

Además del área, después del tratamiento se evaluó la cantidad de células migrantes. En las células SK-LU1 no hubo migración en los grupos con Tamoxifen, incluso se observó muerte celular, la cual fue aumentando conforme al tiempo de tratamiento con el fármaco antiestrogénico. Fue interesante notar que en el grupo tratado con estrógenos (E2) la cantidad de células migrantes dentro de la brecha aumentó de 24 a 72 horas sin embargo fue hasta las 72h que este grupo fue estadísticamente significativo respecto al control (figura 15 E y 15 F). Este patrón también se observó en el grupo tratado con CXCL12 cuyo número de células migrantes fue significativamente mayor con respecto al control desde la 24 horas de tratamiento y a las 72h, en ambos tiempos el número de células migrantes fue significativamente mayor al del estímulo estrogénico.

Además en el grupo tratado con E2+CXCL12 el número de células también fue significativamente mayor al control.

Es importante mencionar que el número de células migrantes en el grupo tratado con quimiocina fue significativamente mayor que en el grupo tratado con la combinación E2+CXCL12 en ambos tiempos 24 y 72h. A su vez en el grupo E2+CXCL12 hubo más células que en el grupo tratado sólo con estrógenos también en tiempos 24h y 72h post-tratamiento (Figuras 15 E y 15F). Lo cual indica que para esta línea celular tanto E2 como CXCL12 estimulan la migración, sin embargo es probable que la quimiocina

tenga un efecto más fuerte que los estrógenos. Además que el número de células migrantes en la combinación E2+CXCL12 sea mayor que en el tratamiento solo con estrógenos y que la combinación de sus inhibidores disminuya el número de células, sugiere una relación entre la vía estrogénica y CXCR4/CXCL12 en la migración celular.

Cabe mencionar que en los grupos con Pleraxifor o AMD3100 se observó un pequeño grupo de células que migraron hacia la brecha sin embargo fue menor o igual a lo que se observó en el control, en la figuras 13E, 14A, 14B , se puede observar que en éstos grupos la herida se mantiene prácticamente igual durante todos los tiempos a pesar de la presencia de la quimiocina la migración no incremento, lo cual corrobora el efecto de la quimiocina en la migración celular y la restricción que ocasiona este inhibidor. Además la morfología de las células nos indica que podrían estar quiescentes y también comenzó a observarse muerte celular a los costados de la brecha.

En las células A549 observamos un patrón muy similar al comportamiento de las células SK-LU1, a tiempo cero todos los grupos tuvieron el área de la herida muy similar entre sí, todos son iguales estadísticamente al grupo control (ver fotografías 0h Figuras 17, 18 y gráfica figura 19 A) .

Después de 6h de tratamiento los cambios fueron más notorios en el área de la brecha se observaron en los grupos E2+TAM, CXCL12+E2+AMD, E2+AMD+TAM y CXCL12+E2+AMD+TAM pero sólo en los últimos dos hubo diferencia significativa respecto al control, ya que sus áreas aumentaron también por pérdida de densidad celular debido a la muerte celular que comenzó a presentarse, provocando que las células se desprendieran y en la toma de las áreas de la brecha está fuera mayor, los demás grupos se mantuvieron similares entre ellos, con un tamaño del área de la herida similar al tiempo cero (ver fotos 6h figuras 17 y 18 y gráfica figura 19 B).

A las 24 horas se observó una disminución de las áreas en los grupos E2, CXCL12 y CXCL12+E2 (ver fotos 24h figuras 17, 18 y gráfica figura 19C), debido a que el cierre de herida fue mayor como resultado de la migración. Los grupos con el tratamiento de los fármacos tamoxifen y pleraxifor (E2+TAM, E2+AMD, E2+AMD+TAM, CXCL12+AMD, CXCL12+E2+AMD, y CXCL12+E2+AMD+TAM), por el contrario

tuvieron un aumento estadísticamente significativo en el área con respecto al control. Los grupos de estímulo (E2, CXCL12) versus su inhibidor (E2+TAM, CXCL12+AMD) también fueron diferentes, presentando un área mayor los grupos de inhibidores. Lo cual prueba también en esta línea celular el estradiol y la quimiocina incrementan la migración pues disminuye significativamente el área de la brecha con respecto al control (Gráfica, figura 19 D), mientras los inhibidores incrementan el área, restringiendo la migración e incluso provocando la muerte celular.

A 72 horas el patrón observado a 24 h de tratamiento se mantuvo, los grupos con estímulo positivo (quimiocina y estrógenos solos y en combinación) favorecieron significativamente el cierre de la herida con respecto al control, debido a la migración celular. Por otro lado, los grupos donde se administraron los inhibidores (Tamoxifen y Pleraxifor), aumentaron el área de la brecha significativamente con respecto al control debido a la muerte celular. De igual forma se observó aumento significativo en el área de los grupos tratados con los inhibidores (E2+TAM, CXCL12+AMD) comparado con los estímulos (E2, CXCL12). Y en este tiempo se mostró una menor área en la combinación de E2+CXCL12 respecto al tratamiento con E2, similar a lo observado en la línea SK-LU-1 en este tiempo.

En la figura 19 F se presenta la gráfica del número de células migrantes a 24 horas post-tratamiento donde sólo los grupos E2, CXCL12, CXCL12+E2 tuvieron un número de células migrantes significativamente mayor que el control, no hubo diferencia significativa entre ellos, pero si entre los grupos E2 vs. E2 +TAM y CXCL12 vs. CXCL12+AMD. Cabe destacar que en este tiempo se observó la presencia de algunas células migrantes en la herida del grupo E2 + AMD, que aunque no es significativo respecto al control hubo mayor efecto.

A 72h los grupos donde hubo mayor migración con respecto al control fue en los grupos E2, CXCL12 y en la combinación CXL12+E2. Además observamos mayor número de células migrantes en estos grupos con respecto al tiempo pasado, excepto en el caso del tratamiento con la combinación del estradiol y quimiocina el cual mantuvo similar al tiempo 24horas (Figura 19 E) .

El Grupo de E2+AMD donde a 24 h se observaban células migrantes se redujo casi a cero, probablemente debido al estrés en el que se encontraban las células, pues el efecto de los tratamientos fue dosis y tiempo dependiente. Los grupos con tratamiento

---

de Tamoxifen tuvieron un número de células migrantes nulo y por el contrario como se menciona anteriormente al igual que ocurrió en las SKLU1, hubo muerte celular desde las primeras horas la cual fue aumentando conforme al tiempo de tratamiento.

En ambas líneas celulares el efecto sobre el área de la brecha y del número de células migrantes fue tiempo dependiente.

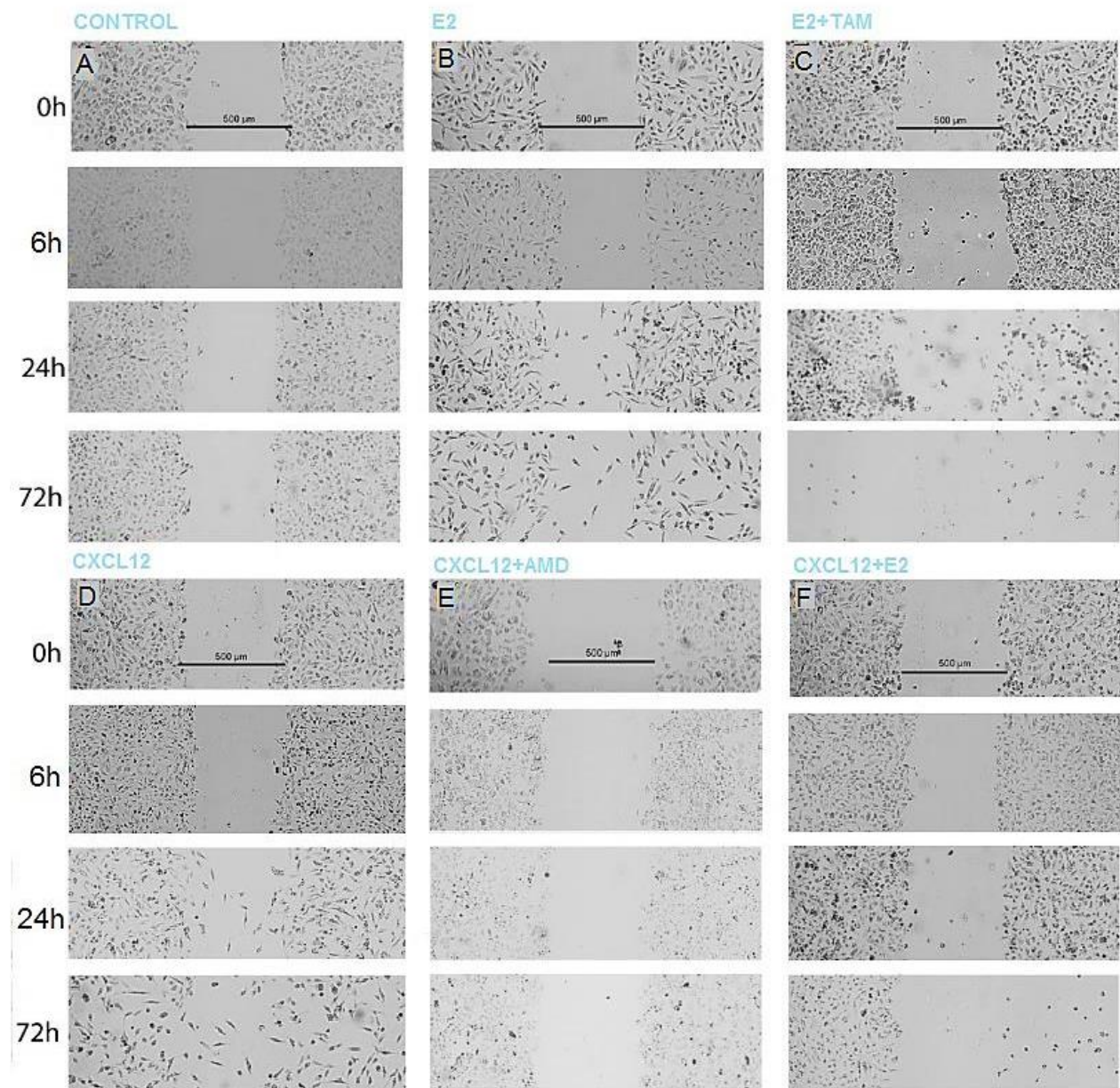


Figura 17. PANEL DE FOTOMICROGRAFÍAS DE GRUPOS PROBLEMA DE LA LÍNEA CELULAR A549, a lo largo de los tiempos 0h, 6h, 24h, 72h post-tratamiento. (A) Control, no se observa migración la

herida se mantiene igual en los 4 tiempos, (B) E2 desde las primeras horas las células tiene transformaciones morfológicas adquiriendo morfología tipo fibroblasto y a lo largo del tiempo migran al centro de la herida (C) al añadir Tamoxifen se forman núcleos picnóticos no ocurre migración y conforme avanza el tiempo aumenta la muerte celular, se observan las células flotando (D) Gpo. CXCL12 se observa migración similar al efecto en el grupo con 17- $\beta$  estradiol, en cambio en el grupo CXCL12+AMD (E) el efecto del Pleraxifor mantiene las células en un estado quiescencia; al añadir quimiocina y estradiol (F) las células tienen un aspecto alargado y 24h se observan algunas células migrantes en la herida pero la migración declina conforme al tiempo, y las células entran en estrés.

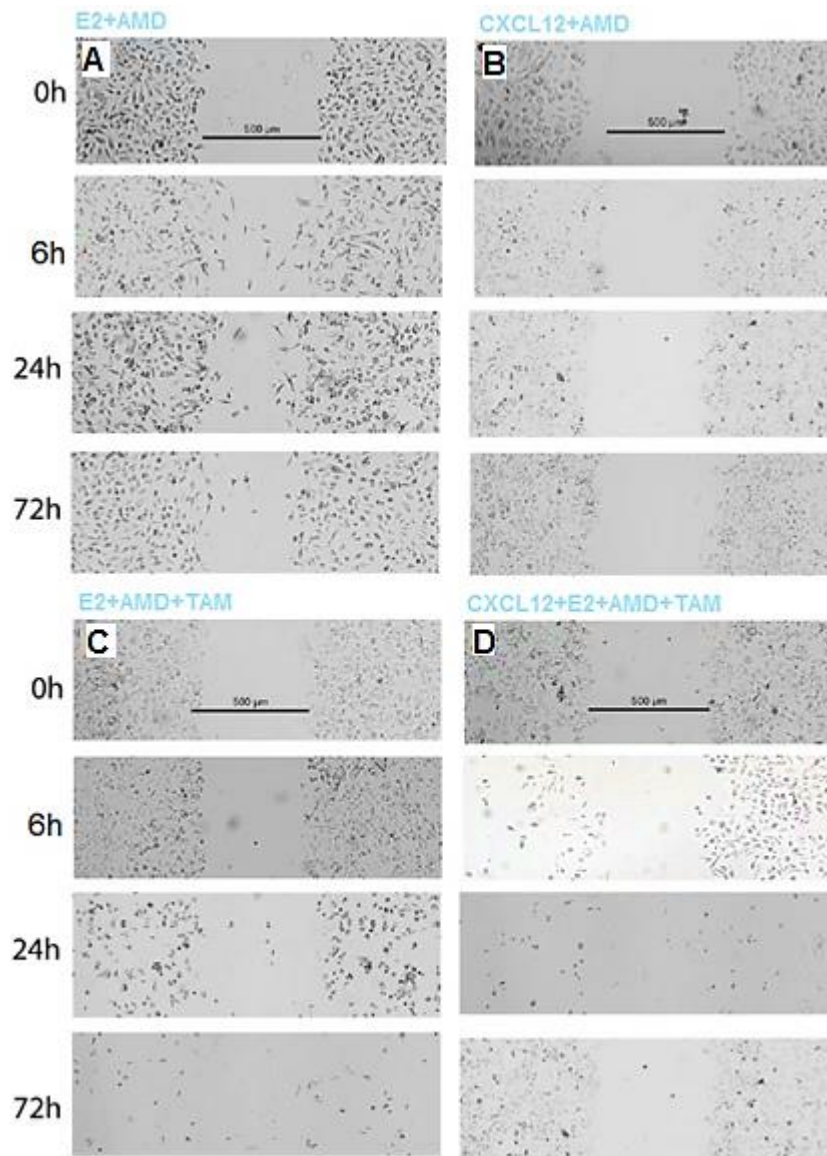


Figura 18. (A) E2+AMD se observa migración durante las primeras horas (6h y 24h) la cual se pierde conforme al tiempo mientras las células cambian a una morfología más circular y entran en estrés, (B) no hay migración a lo largo del tiempo y se observa la monocapa muy tenue debido al estado de quiescencia en el que se mantienen;(C) E2+Pleraxifor+Tamoxifen, las células se

comportan de forma similar al grupo con AMD pero 24 después comienzan a desprenderse hasta que se pierde por completo la herida, en el grupo CXCL12+E2+AMD+TAM (D) la muerte es más acelerada.

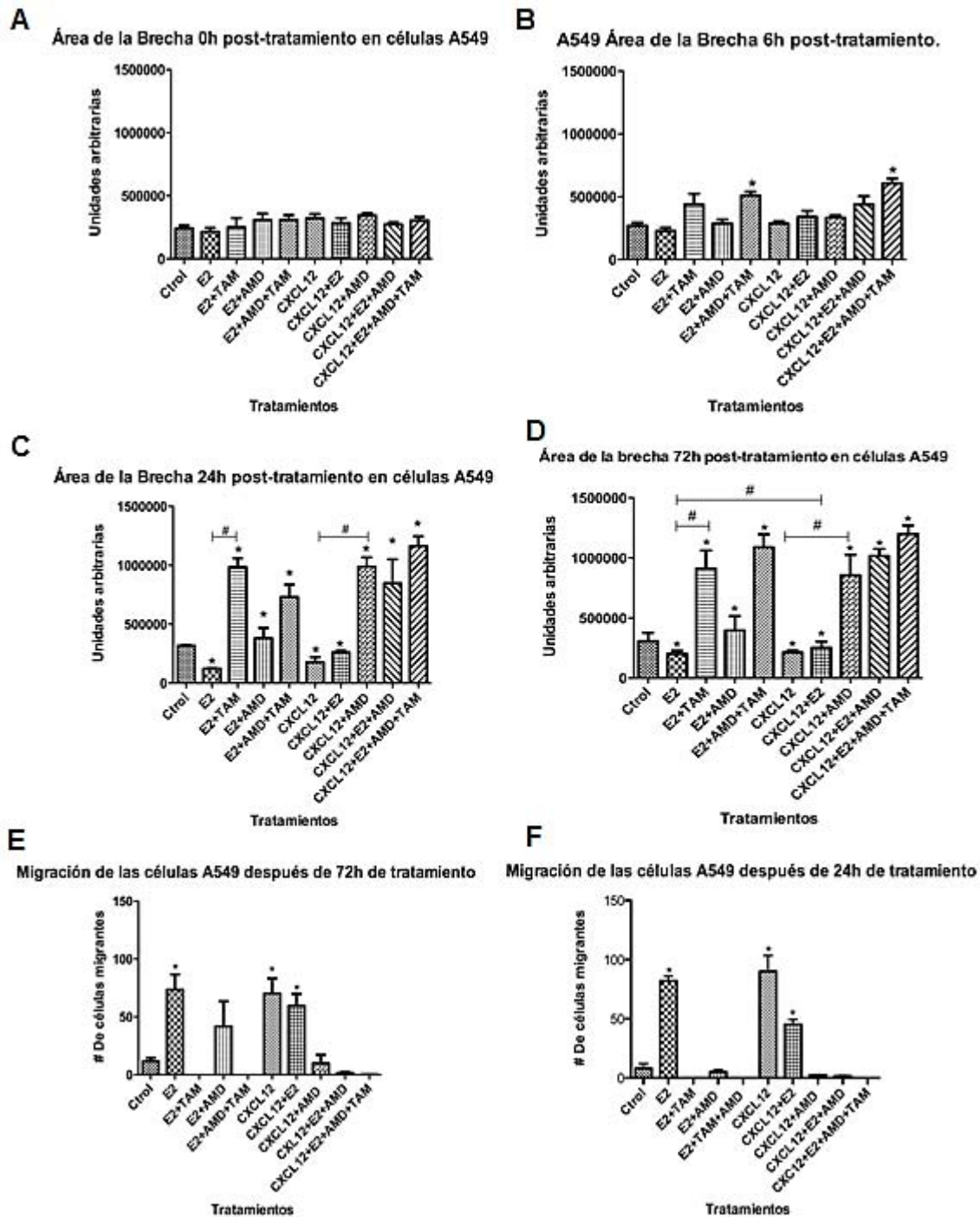


Figura 19. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ÁREA DE LA BRECHA Y NÚMERO DE CÉLULAS MIGRANTES A549. (A) Área de la brecha a 0h, todos los grupos tienen áreas similares, no

hubo diferencia significativa con el control ni entre los grupos. (B) Área de la brecha a 6h, se presenta diferencia significativa respecto al control con los grupos E2+TAM+AMD y E2+CXCL12+AMD+TAM. (C) Áreas de la brecha a 24h post-tratamiento, todos los grupos presentan diferencia vs. control ( $*p < 0.001$  ANOVA, Tukey *post hoc* test), la prueba *pos hoc* de Tukey muestra que hay diferencia entre los grupos E2 vs. E2+ TAM y CXCL12 vs. CXCL12 + AMD. (D) 72h post-tratamiento las diferencias entre las áreas aumentaron y todos los grupos presentan diferencia respecto al control, se muestran diferencias entre los grupos de estímulo (E2, CXCL12) y los grupos de inhibición (E2+TAM, CXCL12+AMD) y entre el grupo E2 y E2+CXCL12 ( $\# p < 0.001$  ANOVA, Tukey *post hoc* test). (E) Se muestra el número de células migrantes a 24h y a 72h (F). Los grupos E2, CXCL12 y CXCL12+E2 incrementaron la migración significativamente respecto al control ( $* p < 0.001$  ANOVA, Tukey *post hoc* test).

### 6.1 Discusión.

El proceso de migración celular es fundamental para establecer y mantener la organización multicelular de cualquier tejido. Sin embargo su importancia es más amplia, es un proceso crucial desde la embriogénesis (en la organización y distribución de órganos y tejidos) hasta la reparación celular y el mantenimiento y eficacia de la respuesta inmune (Zlotnic A. a Homey B., 2011); en patologías como el cáncer, es un paso fundamental en el proceso de la metástasis y es un parteaguas que determina la agresividad de un tumor y la sobrevivencia de los pacientes.

Actualmente existe información que sugiere la participación de los E2 en la carcinogénesis pulmonar (Mah, et al., 2011; París, et al., 2011; Rodríguez, et al., 2014; Wakelee, et al., 2007; Zhang, et al., 2009) sin embargo los mecanismos han sido poco explorados. Previamente se encontró una relación entre el estado hormonal y la expresión de CXCR4 y CXCL12, aunado a ello se observó que los E2 favorecen la sobreexpresión de CXCR4 en líneas celulares (Rodríguez-Lara et al., 2014). En el presente trabajo se observó que las vías ER/E2 y CXCR4/CXCL12 incrementan la migración de células de ADC pulmonar y el bloqueo de estas vías restringe este proceso y estos resultados fueron dependientes del tiempo de tratamiento. Sin embargo cuando se estimulan ambas vías no observamos mayor migración que la observada en las vías individuales, aunque si mayor al grupo control en ambas líneas celulares.

Tomando en cuenta que los resultados obtenidos con el ensayo de cierre de herida y el conteo de células migrantes tienen ciertos alcances y limitaciones es importante aclarar que los mecanismos celulares que se proponen estar involucrados en cada uno de los grupos de interés para éstas líneas celulares, surgen partir de las observaciones y estadísticas de nuestras pruebas y la bibliografía revisada.



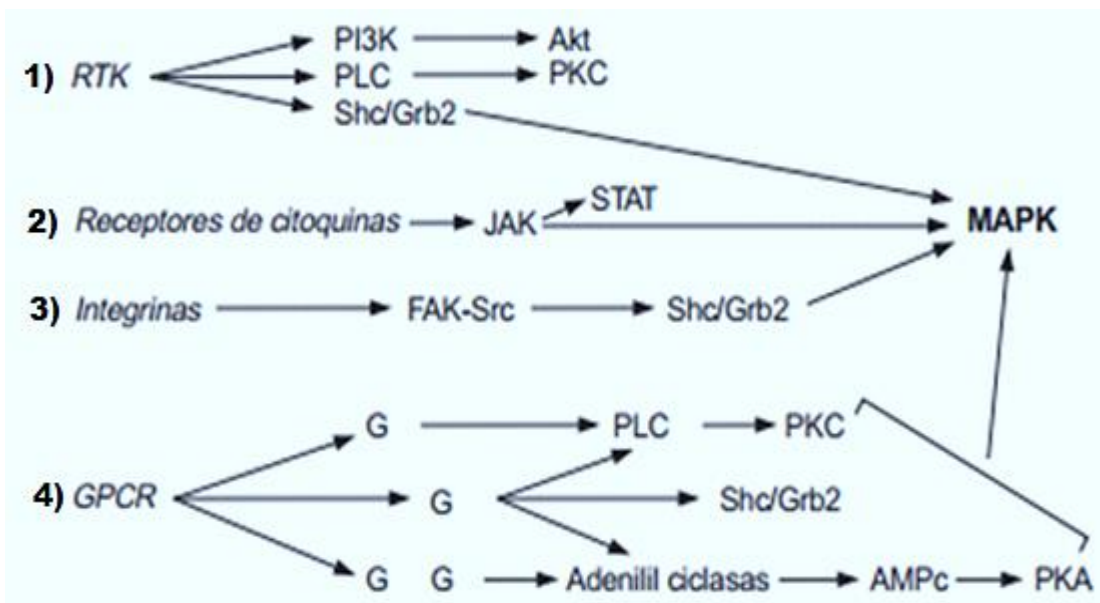
## **Grupos de interés: E2, CXCL12 y posibles mecanismos.**

En los resultados obtenidos se observó que el grupo Control tanto de SK-LU1 como de A549, no tuvo cambios significativos en el área de la brecha ni en el número de células migrantes a lo largo de los cuatro tiempos evaluados lo que quiere decir que las células no migraron de manera significativa debido a que no tenían ningún estímulo, por consiguiente el cierre de la herida prácticamente fue nulo; en comparación en el grupo E2 (tratamiento con 17- $\beta$  estradiol [10 nM ] el análisis estadístico indica que fue uno de los grupos con mayor migración y esta fue estadísticamente significativa, aunque en ninguno de los grupos se obtuvo el 100% de cierre de herida, el avance de las células fue tiempo dependiente y fue a las 72h donde se observó mayor número de células poblando la herida, esto concuerda con lo que observó Rodríguez, et al. (Rodríguez, Lara, 2014) en su estudio *in vitro* en células de ADC pulmonar donde el efecto del estradiol también fue dosis y tiempo dependiente.

Fue interesante que en las A549 el estímulo estrogénico tuviera mayor importancia, ya que las áreas en este grupo disminuyeron más que en las SK-LU1 esto también se observó en las gráficas del número de células migrantes donde la diferencia significativa respecto del control fue mayor que en el grupo de E2 de las células SK-LU1, con respecto a esto se puede destacar que a pesar de que la línea celular A549 fue generada de células de ADC de un hombre caucásico la expresión del ER es importante, como lo sugieren estos resultados, el efecto de los E2 es dependiente de las células tumorales y la expresión de ER, más que del sexo del paciente, aunque varios estudios apoyan el hecho de que la biología de los adenocarcinomas pulmonares es diferente dependiendo del sexo y que el peor pronóstico se da en mujeres premenopáusicas, (Márquez, et al.,2009; Wald, O, et al., 2011;) sin embargo hay estudios en los cuales también se observa un peor pronóstico en hombres que sobreexpresan ER comparado con aquellos que tienen una menor expresión del receptor (Chang et al., 2009).

Una de las principales vías de señalización por la cual el estradiol puede provocar la migración de estas células, es a través de las MAPk; esta vía involucra diferentes proteínas o receptores que intervienen en la adhesión celular (integrinas, E-cadherinas, cateninas) la modificación de citoesqueleto (GTPasas Rho: Rac1, RhoA, Cdc42) y la inducción de las células hacia el tejido diana. Los estrógenos también

actúan a través de la activación de EFGR y PGFR para estimular la migración principalmente son aquellos que generan cascadas de fosforilación (Picatoste & Claro, 2008; Schlaepfer, et al., 1998) y pueden ser cuatro tipos (Figura 20):



**Figura 20. RECEPTORES QUE ACTIVAN LA VÍA DE LAS MAP'S CINASA.** RTK: receptores tirosina cinasa (ER's); Receptores de citocinas (CXCR4); Expresión de Integrinas; GPCR: receptores acoplados a proteínas G. Tomado y modificado de Picatoste & Claro, 2008).

Como ocurre en el grupo de E2 a través de receptores tirosina-cinasa (Figura 20 inciso 1) los cuáles son activados por estímulos extracelulares, ya sea factores de crecimiento como los estrógenos que activan a sus ER's (Picatoste & Claro, 2008).

De esta manera en el ADC de pulmón, los estrógenos al unirse al ER-β el receptor más expresado de los receptores nucleares en este tipo de CP (Rodríguez, et al., 2014), es perteneciente a los receptores tirosina-cinasa (RTK), podría estar activando la vía canónica ERK-MAPK de migración a través del eje Shc/Grb2, proteínas que a su vez pueden ser codificadas por acción de otro RTK como EGFR (Factor de crecimiento epidermal), el cual esta sobreexpresado en el 90% de los casos de adenocarcinoma pulmonar (Picatoste & Claro, 2008; Park, et al., 2014).

Además, los receptores tirosina cinasa son los principales involucrados en la orientación de la migración, los cuales se activan por medio de estímulos

extracelulares, activan una cascada de señalización que a través de GEFs (proteínas chaperonas que se relacionan con vías de señalización de la migración) y Rho GTPasas controlando la reorganización del citoesqueleto, señalización que permite que las células migrantes lleguen a su destino (Ridley et al., 1992; Huertas-Fernández, Cecilia, 2013).

Nuestros resultados mostraron que CXCL12 también favoreció la migración de ambas líneas celulares comparado con el control y con los otros tratamientos, como se observa en las micrografías (Figuras 14D y 17D), aunque de manera diferencial entre las líneas celulares.

Este grupo permitió corroborar la capacidad del eje quimiocina /receptor para activar el proceso de migración celular en el ADC pulmonar de hombre y mujer, sin embargo cabe resaltar que fue en las SK-LU1 las que fueron más sensibles al estímulo de la quimiocina que al del propio estradiol, quizá porque estas células expresan una mayor cantidad de receptores CXCR4 en presencia de ligando, sin embargo estos datos requieren ser corroborados en estudios posteriores.

La migración observada en este grupo puede deberse a que los receptores de citocinas (figura 20 inciso 2): tal como el receptor CXCR4, son capaces de activar vías como JAK-STAT y a través de ésta activan la vía de las ERK-MAPk (Picatoste & Claro, 2008).

También se ha visto que CXCL12 activa a GTPasas de la familia Rho (de la superfamilia Ras) encargadas del reacomodo del citoesqueleto, regulando los filamentos de actina, participando en la promoción de todos los procesos que conlleva la migración celular (Burger et al., 2003; Hartmann et al., 2005; Huertas-Fernández, 2013). Esto nos ayuda a explicar por qué en el grupo CXCL12 la migración es mayor respecto al grupo E2, incluso aunque no se obtuvo diferencia significativa entre ellos. Las células SK-LU1 y A549 al estimularse con la quimiocina pudieron estar expresando mayor cantidad de CXCR4. Como se ha visto en estudios *in vivo* e *in vitro*, (Sunaga, et al., 2010) quizá la alta concentración que se utilizó de la quimiocina CXCL12 [250nM] causó la activación de la transcripción de CXCR4 (Minamiya, et al., 2010) lo que llevó a una respuesta migratoria más rápida, y este receptor a su vez se ha visto involucrado en la síntesis de 5T4 un factor importante durante la transición epitelio-mesénquima (Damelin et al., 2011).

Estudios previos han demostrado que en el NSCLC, la quimiocina CXCL12 activa a las integrinas  $\alpha$ -2,-4,-5, las cuales funcionan como mecanismo de anclaje permitiendo que las células se unan a las fibras de colágena I y fibronectina embebidas en la MEC (ver Figura 21), de esta otra manera las células se ven favorecidas en los procesos de migración e invasión (Hartmann, et al., 2008; Burger, et al., 2003;). Y se sabe que la síntesis de integrinas también se ha visto involucrada en la activación de la vía de las MAP's cinasas, esto es provocado por la síntesis de la FAK (por sus siglas en inglés *Focal Adhesión Kinase*) y la proteína Src que también activa la vía Shc/Grb2 y culmina con la migración celular (Picatoste & Claro, 2008).

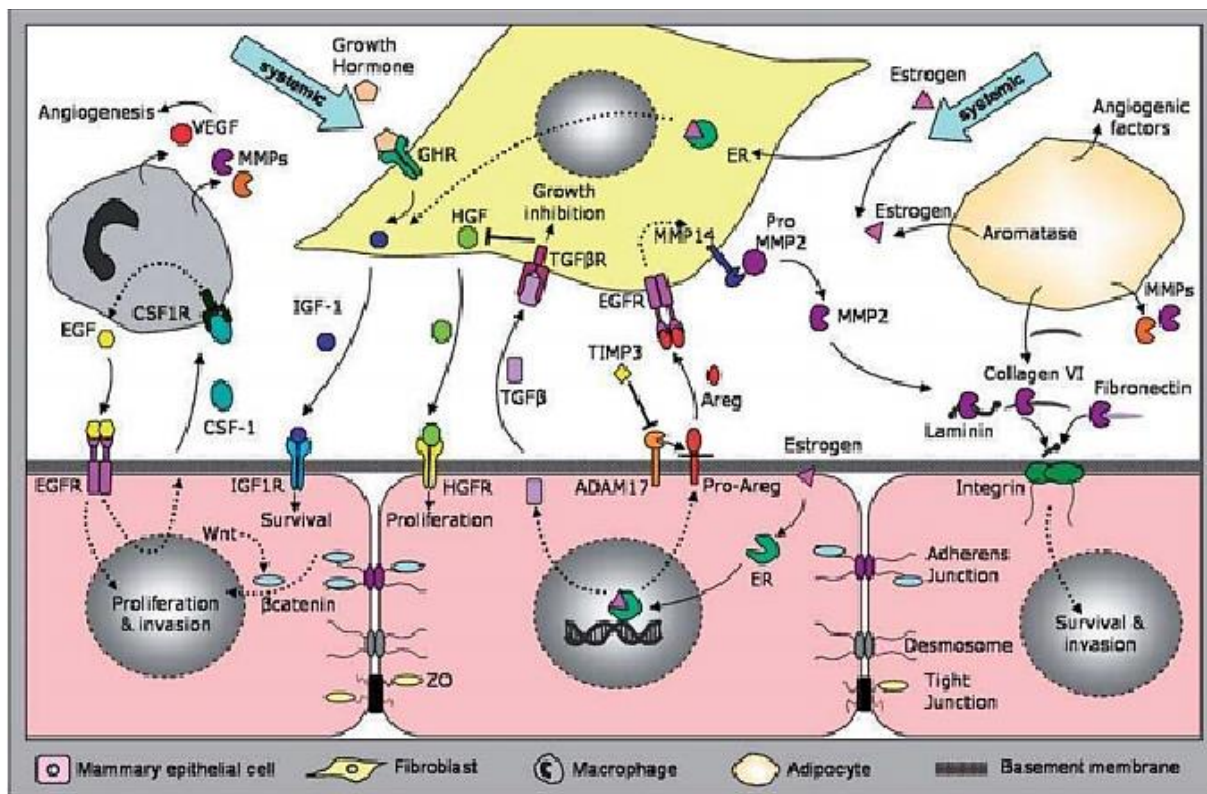


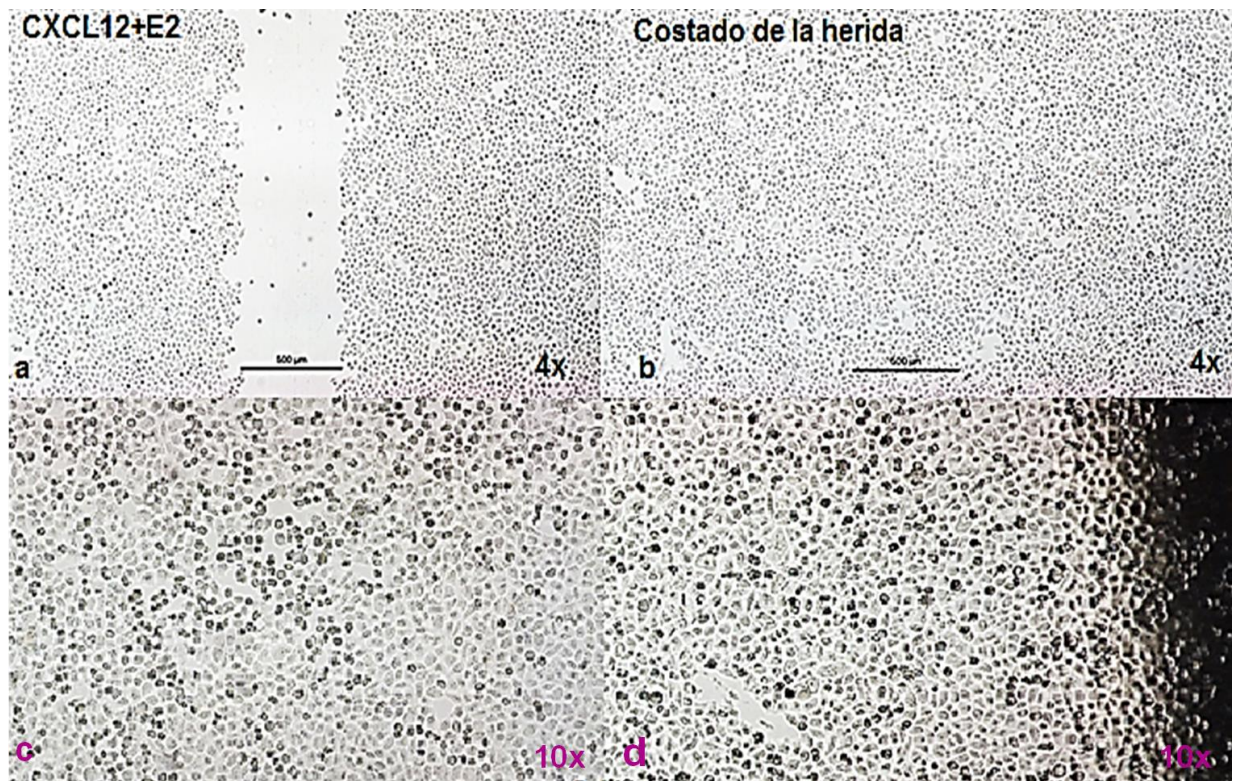
Figura 21. Esquema de Radisky & Radisky, 2007, sobre las interacciones moleculares célula –célula y célula –matriz, entre parénquima y microambiente tumoral involucrados en la migración (Tomado de Roper, L., Ana, 2001).

Cabe resaltar que en los grupos E2 y CXCL12 el área de la brecha fue cada vez más pequeña y los cambios morfológicos en las células también fueron notorios. Veinticuatro horas después del tratamiento las células presentaron prolongaciones semejantes a filopodios en dirección hacia la brecha, la morfología celular cambió de

poligonales a ahusadas. Se plantea que la activación de los complejos moleculares de la migración comprenden la transformación del citoesqueleto de las células así como de las moléculas extracelulares participantes (Dahlman W.-et al, 2006) como E-caderina, integrinas, colágena- I (Hartmann et al, 2005; Huertas-Fernández, Cecilia, 2013); con lo que corroboramos que los observado en las gráficas realmente se debió a un proceso de migración celular, estos cambios se mantuvieron hasta la última observación a las 72h.

### **Relación de las vías E2 → CXCR4/CXCL12.**

Lo observado en nuestro grupo problema de mayor importancia CXCL12 + E2 la tendencia de migración fue muy similar a los grupos con los mismos estímulos por separado hasta las 24 horas, a partir de las cuales observó un comportamiento inesperado donde las células cercanas a la brecha migraban mientras que las de los costados comenzaban a morir. En la prueba de cierre de herida a tiempos menores (6h) el cambio en cuanto la migración o muerte cerca de la brecha para la mayoría de los grupos no fue significativo, sin embargo las observaciones hechas a los costados de la brecha y en las orillas del pozo mostraban que los espacios intercelulares estaban más reducidos, además en algunas zonas se observan células intercaladas formando pequeños agregados, incluso algunas ya desprendidas por muerte celular, lo que sugiere que al tener ambos factores de crecimiento se activa de manera simultánea la proliferación y la migración celular puede depender del espacio y los nutrientes de manera muy local (figura 21).



**Figura 22. FOTOMICROGRAFÍAS DEL GRUPO CXCL12+E2 A 6H POST-TRATAMIENTO 4X;** en la parte superior izquierda a) se muestra el aspecto de las células cerca de la brecha, hay más espacios intercelulares, b) células a un costado de la brecha y c) células en la orilla del pozo, comienzan a verse más aglutinadas, los espacios se ven disminuidos y ya comienza a verse picnosis, indicio de la muerte celular, como se observa en las células más oscuras (4x) d) aumento 10x de las células a la orilla del pozo.

Son variables los mecanismos por los cuales la vía estrogénica y el eje de la quimiocina podrían estar propiciando la migración y por tanto la carcinogénesis, sin embargo, no es posible determinar en concreto lo que ocurre en el grupo CXCL12+E2 72 horas post-tratamiento. Como se ha descrito en los párrafos anteriores, la mayoría de las rutas por las que se activan las MAPK involucran otras proteínas cinasas y ejes que a su vez propician la proliferación; un mecanismo que apoye la hipótesis de lo que puede estar ocurriendo en éste grupo, puede describirse cuando los estrógenos se unen al receptor ER- $\beta$  el cuál se transloca al núcleo activando la región AF-2 (dependiente de ligando) (Noriega & Langley, 2008) y genera cascadas de fosforilación downstream por medio de receptores tirosina cinasa provocando que se activen genes implicados en la vía de proliferación PI3K/AKT (GSK-3- $\beta$ ), esto genera

que los residuos de serina 118 sean fosforilados, esta fosforilación puede activar la proliferación o migración por la ruta PI3K/AKT y la ruta MAPK/ERK, por lo tanto resulta en un incremento de la replicación de ADN con el consiguiente riesgo de sufrir más mutaciones (Marino, et al.,2006), activando de esta manera, la sobreexpresión río debajo de CXCR4, manteniendo un feedback positivo para la migración.

Así mismo la presencia de quimiocina CXCL12 en el medio puede actuar como un factor de crecimiento que provoque la síntesis de CXCR4 (Cai, et al., 2013; Su,et al., 2005; Wald, et al.,2013), pero también active otras vías de migración alternas estrogénicas no dependientes de ligando ya sea por señales genómicas o no genómicas: ya sea actuando sobre el receptor intracelular transmembranal GPR30, provocando la activación de proteínas cinasas que conlleven a la producción de otras proteínas involucradas en proliferación o migración, como las integrinas (Ropero,L., 2001; Hartmann, et al., 2008) como se ejemplifica en la figura 23.

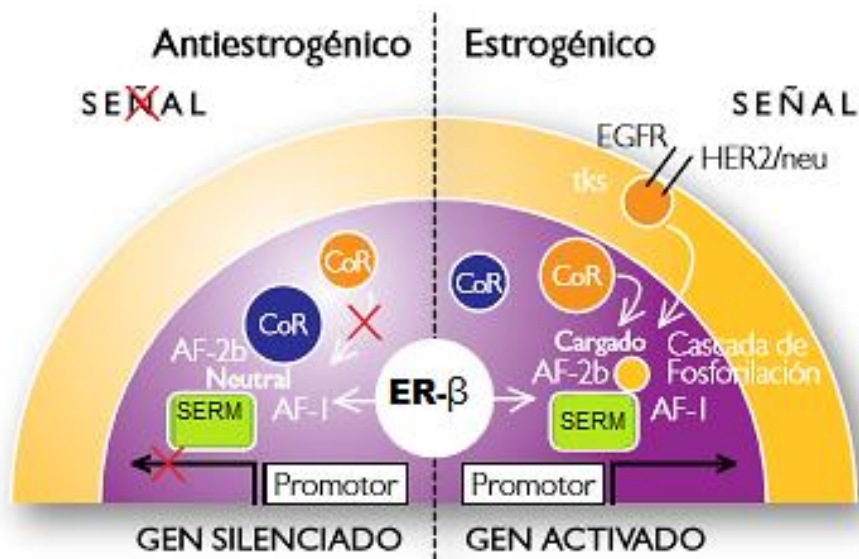


Figura 23. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE ER. Activación dependiente de ligando estrogénica y antiestrogénica. Los factores que participan en la migración, son sintetizados por la translocación de los receptores de estrógenos, por la intervención de diferentes correguladores. Tomada y modificada de Noriega & Langley, 2008.

También podría estar activando la región AF-1 (independiente de ligando) localizada entre la DBD (unión a DNA) y LBD (unión a ligando) del ER, cerca de la N- terminal donde existen diversos sitios de fosforilación regulados por gran cantidad de proteínas cinasas, algunas fosforilaciones en sitios específicos como en la serina 118, 105 y 124, modulan la actividad de este factor AF-1 y de otras vías no canónicas de transducción de señales (Noriega & Langley, 2008; Hershberger, et al.,2009;Marino, et al.,2006), que podría ocurrir simultáneamente en los grupos donde observamos migración.

Otro mecanismo que también esté participando se da a través de los GPCR's: receptores acoplados a proteínas G, que pueden provocar la activación de la vía MAPK a desde distintos niveles en éste último caso los estrógenos también son capaces de estar participando en la migración de nuestras células por este mecanismo.

La unión de los estrógenos a su receptor acoplado a proteína G (GPR30) provoca que el GDP de la proteína G se fosforile a GTP fomentando la disociación entre sus subunidades  $\beta/\alpha$  éste fenómeno causa que se active la vía PI3K $\gamma$  y se recluten proteínas cinasas de la familia Src activando de manera autocrina o paracrina distintas proteínas diana que generan una cascada de señalización que activa el eje Ras/SOS, otra vía moduladora de la migración (ver figura 24, vías alternas a través de receptor membranar), esto mismo puede ocurrir tras la internalización del propio receptor y la participación de la  $\beta$ -Arrestina ya sin necesidad del estímulo externo (E2) lo cual culmina en la migración (Caunt, et al.,2006; Picatoste & Claro,2008;Schlaepfer, et al.,1998).

Con lo anterior se propone que los procesos pueden estar ocurriendo simultáneamente, uno activado por vía genómica y el otro por la no genómica, sin embargo resulta difícil discernir, la exactitud de los mecanismos que relacionan a estas vías, porque al parecer su comportamiento depende de los tipos celulares.

Aun con estas evidencias existen limitaciones que no permiten saber la relación exacta entre E2  $\rightarrow$  CXCL12/CXR4; sería importante hacer otros ensayos moleculares, tomando en cuenta más parámetros para esclarecer mejor ésta interacción.



Aunque no fue estadísticamente significativo, el hecho de que en el grupo E2+ AMD presentara un porcentaje de migración mayor respecto al control hace pensar que las células SKLU1 y A549 son más dependientes de E2 para su supervivencia sin embargo sugiere que el eje CXCL12/CXCR4 es más importante para la migración (Wald et al., 2013; Damelin et al., 2011), pero también de manera secundaria para el metabolismo y mantenimiento de éstas células.

### **Tratamientos con inhibidores de las vías E2/ER y CXCR4/CXCL12.**

Por otra parte los resultados de los grupos con el fármaco antiestrogénico Tamoxifen reflejan la importancia que tienen los estrógenos en estas líneas celulares de ADC, no sólo para que ocurra o no un proceso migratorio, sino también en la misma viabilidad de éstas células tumorales, donde parecen ser fundamentales para su mantenimiento. Tan sólo el grupo con el fármaco antiestrogénico Tamoxifen: E2+TAM, tuvo más del triple de área de en la herida que el grupo E2, al final del experimento, desde las primeras horas el efecto del tamoxifen se vió en la mortalidad que también aumentaba a lo largo del tiempo; el mismo patrón se observó en los demás grupos que tenían Tamoxifen, incluso en los grupos donde se puso el tratamiento del antiestrogénico más el inhibidor del receptor CXCR4 (Pleraxifor) la muerte celular se vió acelerada. Lo cual confirma la relación entre E2 y CXCL12/CXCR4.

Estudios recientes en cáncer de mama, sobre el ER- $\beta$  y los correguladores genéticos y epigenéticos (correpretores: RIP140, LCoR; coactivadores: SWI/SNF) de los receptores estrogénicos, han demostrado que el efecto antagonista de los antiestrogénicos puede ser muy fuerte, evitando la transcripción de proteínas indispensables para activar los procesos básicos del metabolismo (Noriega & Langley, 2008) lo cual se ve reflejado en la supervivencia de las células tumorales (*en figuras 13C, 14 I, 14J, 17C, 17I y 17J se observa el efecto del tamoxifen*).

Se sabe que algunos receptores nucleares son capaces de reprimir la transcripción génica en ausencia de ligando o en presencia de ligandos antagonistas como el Tamoxifen con el ER- $\beta$ . Esta regulación negativa puede estar mediada por correpretores los cuales se unen al receptor después de que la unión del antiestrogénico provoca un cambio conformacional en la región AF-2 (región de ER dependiente de ligando: ligando antagónico) y permite que los correpretores se unan en el sitio CoRNR (ver fig. 23) siendo capaces de la remodelación de la cromatina, regulada por ER's (Noriega & Langley, 2008).

---

Correspondiente con esto se ha visto que en los tejidos con mayor respuesta a estímulos hormonales, hay una mayor expresión de correpresores (Noriega & Langley, 2008) al estar el efecto del antagonista potenciado por moléculas como correpresores, recae en la regulación de muchas más vías metabólicas no solo involucradas en la migración si no en el comportamiento normal de las células cancerosas, lo que pudiera explicar la razón de la muerte celular acelerada, en nuestros grupos con Tamoxifen.

Otros estudios de cáncer mamario, usando inhibidores selectivos como PD98059, ICI 182 780 y PP2 demuestran que la migración se da por la activación de las MAPK causada por el efecto directo de los E2 sobre las proteínas Shc-Scr (Song, et al., 2002), de acuerdo al comportamiento de las líneas celulares observadas, estos datos se podrían extrapolar a lo que ocurre durante la migración de ADC pulmonar. De forma contraria al ser bloqueada la vía por la unión de alta afinidad del Tamoxifen con el receptor de estrógenos el resultado no sólo inhibe la activación de la vía de las MAPK si no también es mortal para las células, como se explicó anteriormente.

En contraparte los grupos con Pleraxifor CXCL12+AMD y E2+AMD indican que las células son sensibles a la inhibición de CXCR4, pero no tanto como a la del ER- $\beta$ . Durante las primeras horas las células se comportaron muy similares al control, pero a partir de las 24 horas las células estaban quiescentes incluso es posible ver en las micrografías que la óptica de la imagen es más tenue y las células no tienen una morfología normal como se observa en el control; en el área de la brecha los cambios fueron sutiles respecto al tiempo cero aunque en el conteo celular se observaron algunas células migrantes, no se observó diferencia significativa y ese efecto se perdió a las 72h donde ya presentaba muerte celular quizás relacionado más al estrés por falta de nutrientes en el medio.

Esta muerte fue en menor grado a lo observado en los grupos con Tamoxifen.

CXCL12+E2+AMD+TAM fue un grupo que nos confirmó el papel de cada uno de los factores de crecimiento: estradiol y quimiocina (CXCL12) al igual que el efecto inhibidor para cada uno, de manera conjunta. Resultando fue un efecto fatal al bloquear ambas vías, pues la muerte celular fue más acelerada a pesar de tener

ambos factores de crecimiento; con lo que se corrobora la alta afinidad de los fármacos a los respectivos receptores, mayor que la de sus propios ligandos conjugados.

### 7.1 Conclusiones

- ❖ El 17- $\beta$  estradiol y CXCL12 de manera independiente incrementan la migración de las células A549 y SKLU-1 de manera significativa respecto del control y otros grupos problema, esta migración es dependiente del tiempo y diferente por línea celular.
- ❖ Los estrógenos están implicados en la migración de las células de adenocarcinoma pulmonar estimulando la vía CXCR4/CXCL12, sin embargo en el grupo E2+CXCL12 no se potenció la migración lo cual puede deberse a que intervienen otros procesos del metabolismo celular como la proliferación de manera simultánea.
- ❖ Las células SK-LU1 y A549 son dependientes de estrógenos no solo para migrar si no para la misma sobrevivencia celular.
- ❖ La relación entre estrógenos y el eje CXCL12-CXCR4 para acelerar el proceso de migración, puede tomarse como un posible mecanismo por el cual los estrógenos participen en la progresión de los ADC pulmonar en mujeres premenopáusicas haciendo que estos sean más agresivos y expliquen el peor pronóstico observado en este grupo en específico.
- ❖ Es de importancia resaltar que el Tamoxifen es un fármaco usado como tratamiento para cáncer de mama y ovario, pero al ver la importancia que tienen los estrógenos para la viabilidad de estas líneas celulares de ADC pulmonar podría ser una opción terapéutica para este tipo de cáncer.

## 7.2 Perspectivas.

- \* La prueba de Cierre de herida permitió ver el comportamiento de las células en el proceso de migración según los diferentes tratamientos con estradiol, quimiocina CXCL12 y sus inhibidores, sería interesante llevarla a cabo en otras líneas celulares de ADC pulmonar donde se pueda comparar a mujeres premenopáusicas con mujeres postmenopáusicas y hombres, ya que el efecto también fue diferente entre las líneas celulares analizadas.
- \* Dados los resultados obtenidos en las líneas celulares estudiadas sería importante fortalecer la información, llevando a cabo otras pruebas de migración como la de Cámaras Transwell donde podemos saber con mayor exactitud la relación con otras moléculas de la matriz extracelular y tener más certeza sobre el mecanismo de los estrógenos con el eje CXCR4/CXCL12.
- \* Crear un modelo murino que permita observar la migración *in vivo* de células de ADC pulmonar por estímulo estrogénico y ver si ocasiona metástasis, midiendo diferentes concentraciones de CXCL12 ,CXCR4 y CXCR7.



### 8.1 Referencias.

1. Aerts E, Babic A, Devine H, et al., (2013) *Movilización y aferésis de las células hematopoyéticas: Guía práctica para personal de enfermería y otros profesionales de la atención sanitaria relacionados*. EBMN, Ed. Genzyme Europe B.V, pp30.
2. Águila G B, Verdecia N F & Cué B M., *Estriol y sus Derivados. Comportamiento de la tecnología en el mundo*, (1999) *Rev Cubana Farm*; 33 (3):195-200.
3. Albain KS, Unger JM, Gotay CC, et al. *Toxicity and survival sex in patients with advance non-small cell lung carcinoma on modern Sothwest Oncology Group (swog) trials*. In *Oncology Aso C. ed 2007. American Society Clinical Oncology*; Vol.101:14, 984-992 pp.
4. Anthony J. Alberg, Malcolm V. Brock, Jean G. Ford, Jonathan M. Samet, Simon D. Spivack; *Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines* *Chest*. 2013 May; 143.
5. Balis JU, Bumgarner SD, Paciga JE, et al., (1989) *Synthesis of lung surfactant-associated glycoproteins by A549 cells: description of an in vitro model for human type II cell dysfunction*. *Exp Lung Res*; 6 (3-4):197-213.
6. Borja-Aburto, VH, Loomis, DP, Bangdiwala, S, Shy, CM, Rascon-Pacheco, RA (1997) *Ozone, Suspended Particulates, and Daily Mortality in Mexico City*. *Am. J. Epidemiol.* , 145(3):258-68
7. Becoña, E, & Vázquez, F, *Las mujeres y el tabaco: características ligadas al género*. (2000). *Revista Española de Salud Pública*, 74(1), 00. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-57272000000100003&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272000000100003&lng=es&tlng=es) Recuperado en 15 de mayo de 2016.

8. Behera, D; Balamugesh, T. (2004). Lung cancer in India. *Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences* **46** (4): pp. 269-281. Consultado Noviembre 5, 2013
9. Burger JA, Spoo A, Dwenger A, Burger M and Behringer D. (2003a). *Br. J. Haematol.*, 122, 579–589.
10. Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Graff A, Silberstein LE, Fujii N, Kipps TJ and Burger JA. (2003b) *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. Cai, C, Wang LH, Dong Q, et al. Association of CXCL12 and CXCR4 gene polymorphisms with the susceptibility and prognosis of renal cell carcinoma.(2013). *Tissue Antigens*,\_Sep;82(3):165-70.
12. Caunt CJ, Finch AK, Sedgley K, et al. (2006), Seven-transmembrane receptor signaling and ERK compartmentalization. *Trends Endocrinol Metab.* 17(7), 276-86.
13. Cascón S A, *Planteamientos básicos del cáncer hereditario: principales síndromes*, 2011, Edit. ADEMÁS Comunicación Gráfica, Madrid, 199pp.
14. Craig V J, *The New biology of Estrogen-induced Apoptosis applied to treat and prevent Breast Cancer* (2015) *Endocr Relat Cancer* ; 22(1): R1–31.
15. Cheng, Y.W.; Chiou H.L., Sheu G.T. et al. abril 2001 . *Cancer Research (American Association for Cancer Research)* **61** (7): pp. 2799–2803 . Consultado Noviembre 17, 2013.
16. Dahlman W. K., Cavailles V., Fuqua S.A., et al. (2006). *International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. Pharmacology. Rev.* 58 (4): pp. 773–81.
17. Damelin M, Geles KG, Follettie MT, et al. *Delineation of a cellular hierarchy in lung cancer reveals an oncofetal antigen expressed on tumor-initiating cells. Cancer Res.* 2011;71(12):4236–4246.
18. Dela Cruz Charles S. et al. (2011) *Lung Cancer: Epidemiology, etiology and prevention, Clin Chest Med*;32(4): 605-44.
19. Evans, et al., (2002) *Health benefits of air pollution control. Air quality in Mexico megacity an integrated assessment. Molina&Molina edit. Kluwer Academic Publishers.*



20. Garon, GE, Pietras, RJ, Finn, RS, et al., *Antiestrogen fulvestrant enhances the antiproliferative effects of epidermal growth factor receptor inhibitors in human non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol. (2013) March; 8(3): 270–278.*
21. Ganti AK, Sahmoun AE, Panwalkar AW, et al. (2006) Hormone replacement therapy is associated with decreased survival in women with lung cancer. *J Clin Oncol; 24:59–63.*
22. Giannicola D'Addario; Melania, P.; Leighl N.L.; Ronald F.; Cerny T. & Shepherd F. A. (May 1, 2005). *Platinum-Based Versus Non-Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of the Published Literature.* vol. 23, no. 13. *Journal of clinical oncology of the American Society of Clinical Oncology.*
23. Giuliani, L.; Jaxmar T., Casadio C. et al (2007) *Detection of oncogenic viruses (SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV) and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. Lung Cancer .57 (3): pp. 273–281.*
24. Giulianelli, Sebastián, J. (2009). *Papel de los receptores de estrógenos alfa en el crecimiento de carcinomas mamarios murinos con respuesta diferencial a progestágenos. Doctorado. Lab Ciencias exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.*
25. Gorlova, O.Y.; Weng S.F.; Zhang Y., et al. (Julio 2007). *Aggregation of cancer among relatives of never-smoking lung cancer patients. International Journal of Cancer. 121 (1): pp. 111–118.*
26. Hartman, TN, Burger, A, Glodek A, et al. *CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. Oncogene (2005) 24, 4462–4471.*
27. Health Effects Institute (HEI) 2002, *Understanding the health effects components of the particulate matter mix: progress and next steps. HEI perspective. Consultado 24 de junio 2016.*
28. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. (2008) *Lung cancer. N Engl J Med. 25; 359(13):1367-80.*
29. Hershberger P.A., Stabile L.P., Kanterewicz B, et al., (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. J Steroid Biochem Mol Biol. 116(1-2):102-9.*

30. Huertas-Fernández, Cecilia, (2013) *Mecanismos moleculares que regulan la migración celular colectiva*, Doctorado, Universidad Pablo Olavide, Sevilla.
31. Instituto de Ecología 2000. *Gestión de calidad del aire en México*. SEMARNAT: <http://www.inecc.gob.mx/>.
32. Kanterewicz B. et al. *Estrogen receptor beta (ER beta) subtype-specific ligands increase transcription, p44/p42 mitogen active protein kinase (MAPK) activation and growth in human non-small cell lung cancer cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2009); 116; 102-109.
33. Kato S., Endoh H., Masuhiro Y., Kitamoto T, et al., (1995). *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase*. *Science* **270** (5241): pp. 1491.
34. Katzung, B.G. (2007). Chapter 55. *Cancer Chemotherapy*. *Basic & Clinical Pharmacology* (9na edición). McGraw-Hill.
35. Kim C, Gao YT, Xiang YB, Barone-Adesi F, Zhang Y, Hosgood HD, Ma S, Shu XO, Ji BT, Chow WH, Seow WJ, Bassig B, Cai Q, Zheng W, Rothman N, Lan Q. *Home kitchen ventilation, cooking fuels, and lung cancer risk in a prospective cohort of never smoking women in Shanghai, China*. *Int J Cancer*. 2015 Feb 1; 136(3):632-8.
36. Kumar, V.; Ramzi S. C. y Stanley L. R. (2008) (en español) *Patología humana* (7ma edición). Elsevier, España. pp. 500.
37. Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R, Muyan M (2004). *Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimere modulates functions of the ER alpha dimer in genomic estrogen signaling pathways*, *Mol. Cell. Biol.* 24 (17): pp. 7681–94.
38. Liede A, Narod SA. *Hereditary breast and ovarian cancer in Asia: genetic epidemiology of BRCA1 and BRCA2*. *Hum Mutat.* (2002); 20:413-24.
39. 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*. *Int J Cancer*; 117:662–666.
40. 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.
-

41. Mantovani A., Allavena P., Sozzani S., Vecchi A., Locati M., Sica A. *Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. Semin Cancer Biol.* 2004 Jun; 14(3):155–60.
42. Mantovani A. *Chemokines in neoplastic progression.* 2004. *Semin Cancer Biol;* 14(3):147–8.
43. Marino M, Galluzo P. Ascenzi P. (2006) *Estrogen signaling multiple Pathways to Impact Gene Transcription current genomics, Current Genomics, 7: 497-508.*
44. Márquez, GDC, Hsiao-Wang C, et al. *Targeting Aromatase and Estrogen Signaling in Human Non-Small Cell Lung Cancer. Ann N Y Acad Sci. (2009) ; 1155: 194–205.*
45. Marquez DC, and RJ., P. (2001) *Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells. 20(39), 5420-30*
46. Minamiya Y, Saito H, Takahashi N, (2010) *Expression of the chemokine receptor CXCR4 correlates with a favorable prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. Lung Cancer; 68(3):466-71.*
47. Moore KA, Mery CM, Jaklitsch MT, et al. *Menopausal effects and presentation treatment and survival of women with non-small cell lung cancer. ANN Thorac Surg 2003: 1789-1795.*
48. Noriega R, MY & Langley ME, *Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario (2008) Cancerología 3, 29-40.*
49. Organización Mundial de la Salud (2004). *Gender in lung cancer and smoking research (PDF).* Consultado Noviembre 5, 2013.
50. Pavlova, Hume K. R., Yazinski S.A., Flanders J., Southard T.L., Weiss R.S., Webb W.W. (Marzo 17, 2012) *.Multiphoton microscopy and microspectroscopy for diagnostics of inflammatory and neoplastic lung. Journal of Biomedical optics.*
51. Paris C, Duchene C, Vignaud JM, et al., *Relationships between lung adenocarcinoma and gender, age, smoking and occupational risk factors: A case-case study. (2011) Lung Cancer. Volumen 68, apartado 2. pp 146-153.*

52. Park KS, Raffeld M, Wha Moon Y, et al. (2014) *CRIPTO1 expression in EGFR-mutant NSCLC elicits intrinsic EGFR-inhibitor resistance. J Clin Invest; 124 (7); 3003-3015.*
53. Piédrola G., G. (2000) *Medicina preventiva y salud pública. 10ma edición). Elsevier, España. pp. Consultado Nov. 12, 2013.*
54. Prado, Faibischew , G et al. *Woman and smoking: risks, impacts, and challenges, (2011), J Bras Pneumol; 37(1), pp.118-128.*
55. Ridley J & Hall (1992) *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell 70: 389-399.*
56. Robledo MM, Bartolomé RA,, Longo N, et al. (2001) *Expression of functional chemokine receptor CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. J Biol Chem. 276(48):45098-105.*
57. Rodríguez L. Vianey, (2014) *Influencia del sexo, el estadio hormonal y los estrógenos en la expresión del eje CXCR4/CXCL12 en el Adenocarcinoma pulmonar. Doctorado, Fac. de Medicina, UNAM.*
58. Rodríguez-Lara V, Pena-Mirabal E, Baez-Saldana R, Esparza-Silva AL, Garcia-Zepeda E, Carbon Cervantes MA, et al. *Estrogen Receptor Beta and CXCR4/CXCL12 Expression: Differences by Sex and Hormonal Status in Lung Adenocarcinoma. Arch Med Res. 2014*
59. Ropero L, Ana B (2001) *Caracterización del receptor y de los mecanismos de señalización implicados en el efecto no genómico del 17beta-estradiol en el islote de Langerhans de ratón. Doctorado, Universidad Miguel Hernández, Instituto de Bioingeniería.*
60. Rubin, P & Williams PJ (2003) *Oncología clínica, 8va edición, Elsevier, España, pp.823.*
61. Sarah B. Goldberg, MD, *PD-1 and PDL-1 inhibitors: Activity as single agents and potencial biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer. 2015. Am J Hemath/Oncol 7:*
62. Samet JM, Avila TE, Boffetta P, et al. (2009) *Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factor. Clin Cancer Res.; 15(18): 5626–5645.*

63. Schabath MB, Wu X, Vassilopoulou-Sellin R, et al. (2004) Hormone replacement therapy and lung cancer risk: A case-control analysis. *Clin Cancer Res*; 10 (1 Pt 1):113–123.
64. Schlaepfer DD, Jones KC & Hunter J (1998) Multiple Grb2- mediated Integrin-stimulated Signaling Pathways to ERK2/Mitogen- activated protein kinase-initiated Tyrosine Phosphorylation Events. *Mol and Cell Biol*. 18 (5); 2571-2585.
65. Schwartz AG, Wenzlaff AS, Prysak GM, et al. (2007) Reproductive factors, hormone use, estrogen receptor expression and risk of non small-cell lung cancer in women. *J Clin Oncol* 2007; 25:5785–5792.
66. Song DR, McPherson RA, Adam L, et al. (2002) Linkage of Rapid Estrogen Action to MAPK Activation by ER-Shc Association and Shc Pathway Activation. *Molecular Endocrinology* 16(1):116–127.
67. Song RX, McPherson RA, Adam L, (2002) Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER-alpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol*, 16 (1); 116-127.
68. Stabile LP, Davis AL, Gubish CT, (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 Res*. 1; 62(7):2141-50.
69. Su, L, Zhang, J, Xu, et al. Differential Expression of CXCR4 Is Associated with the Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. (2005) *Clin Cancer Res*; 11(23):8273-80.
70. Suárez A, Mozo L, Gutiérrez M y Peña J, (2003) Citocinas y quimiocinas. *Inmunología*, Ed. Phadia. Córdoba.
71. The state of US health, 1990-2010: Burden of diseases, injuries, and risk factors. National Center for Health Statistics, Division of Vital Statistics, Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.cdc.gov/nchs/nvss.htm>. Consultado Noviembre 10, 2013.
72. Toh, C.K. The changing epidemiology of lung cancer. *Methods Mol Biol*. 2009; 472: 397-411. Consultado Noviembre 5, 2013.
73. Tovar, G. Víctor J.; Barquera, S. and López A., Francisco J. Tendencias de mortalidad por cánceres atribuibles al tabaco en México. *Salud pública Méx*. 2002, vol.44, suppl.1. pp. s20-s28. Consultado 17 Noviembre 2013

74. Trepap X, Chen Z, Jacobson K, *Cell Migration*, (2012). *Compr Physiol.*, 2(4) 2369-2392.
75. Wakelee HA, Chang, E, Gomez S, et al., *Lung cancer incidence in never-smokers* .*J Clin Oncol.* 2007 Feb 10; 25(5): 472–478.
76. Wald O., Shapira M. & IzharUzi .*Review: CXCR4/CXCL12 Axis in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathologic Roles and Therapeutic Potential. Theranostics.* 2013; 3(1): pp26–33.
77. William, DT, Brambillia E, Masayuki Noguchi, et al., *Review International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma.*(2011) *Journal of Thoracic Oncology: Volume 6 - Issue 2 - pp 244-285.*
78. World Health Organization Web site. *Projections of mortality and burden of disease, 2002 – 2030. Disponible en: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/projections2002/en](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections2002/en)*  
Consultado el 20 de Octubre, 2013.
79. Yan M. Li, Yong Pan, Yongkun Wei, et al., *Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis* (2004)*Cancer Cell*; Vol. 6(5): 459–469.
80. Zabel B.A., Lewen S., Berahovich R.D., Jaen J.C., Schall T.J. *The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. Molecular Cancer.* 2011; 10:73.
81. Zhao G, Zhao S, Wang T, et al. *Estrogen receptor beta signaling regulates the progression of chinese non-small cell lung cancer.* (2011) *Journal Steroid Biochem Mol Biol.* 124(1-2):47-57
82. Zhang G., Liu X, Farkas A.M. et al. *Estrogen receptor beta functions through non genomic mechanisms in lung cancer cells. Mol Endocrinol* (2009); 26; 146-156.
83. Zilfou JT & Lowe SW, *Tumor Suppressive Functions of p53*, (2009) *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 1(5).
84. Zlotnik A., Burkhardt A.M., Homey B. *Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. Nat Rev Immunol.* (2011) Sep; 11(9):597–606.
85. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. Consultado Noviembre 15, 2013.

86. <http://medicablogs.diariomedico.com/jmsanz/2010/05/08/adenocarcinoma-de-pulmon-de-origen-ocupacional/>. Consultado Noviembre 2,2013.

87. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs>

88. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/gacetas/422/particulas.html>