



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de los estrógenos en la proliferación celular
de adenocarcinoma pulmonar mediante la
activación del eje CXCL12/CXCR4.**

TESIS

Que para obtener el título de

Bióloga

presenta

Ericka Karol Pamela Almeida Aguirre



**Tutora
Dra. Vianey Rodríguez Lara
Ciudad universitaria, CDMX.
2016**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos de la alumna.

Almeida
Aguirre
Ericka Karol Pamela
52738533
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Ciencias.
Biología.
309000666

2. Datos de la tutora.

Dra.
Rodríguez
Lara
Vianey

3. Datos del trabajo escrito.

Efecto de los estrógenos en la proliferación celular de adenocarcinoma pulmonar mediante la activación del eje CXCL12/CXCR4.
72 p.
2016

4. Palabras clave.

Cáncer, pulmón, adenocarcinoma, proliferación, estrógenos, quimiocina.

Jurado

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.
Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez.
Dra. Vianey Rodríguez Lara.
Dra. Teresa Imelda Fortoul Vander Goes.
Dr. Ignacio González Sánchez.

Agradecimientos

Gracias a mis padres *Lety y Erick* por siempre cuidarme y dedicarme todo su esfuerzo, consejos, por permitirme soñar y volar sin dejarme caer.

A mi abuelita *Judith* por regalarme alas y enseñarme a usarlas. Por darme fuerza, amor y alegría.

A mi abuelito *Pedro* por siempre regalarme el impulso, tanto cariño y abrazos de protección.

A mi tío *Cristopher* por ser mi cómplice y mi guardián favorito.

A *Yetli* por existir, por darme el motivo, ser el ejemplo de energía y alegría.

Por su apoyo incondicional, por alentarme en cada nuevo impulso y por hacer mi vida maravillosa este trabajo está dedicado a ustedes seis, mi familia.

Gracias también a *Gabriel Matusalem* por alentarme a correr sin miedos, por mostrarme la eternidad en un instante, por ir conmigo a no sé dónde y conocer juntos no sé qué.

También a *Eduardo Mashamanscuinle* por siempre estar para escuchar lo que sea, por tantas risas, sueños e historias de vikingos.

Gracias a los dos por cuidarme y quererme tanto (niñitas).

Este camino no hubiera sido lo mismo sin mis amigos;

Diana Vaquera y tu ejemplo de amistad incondicional, gracias.

Gracias también a *Daniela Casarreal* por crecer conmigo en todos los sentidos y seguir siempre donde se necesita.

A *Karinus* porque sin ti no habría disfrutado tanto cada día en Ciencias y en la vida.

Rocío MJM y *Tere* tienen un lugar especial por sus contraseñas, prestarme libros, por siempre cuidarme y confiar en mí, además de quererme tan rápido.

Gracias también a *Aleli Squishy* por quererme, así sin más, sin importarle nada.

A *Leilo* por estar desde que el cielo explotó en colores hasta que el panorama se tornó azul profundo.

A *Fernanda Riquelme*, a *Jorge Moncayo* y a *Bambi* por construir conocimiento conmigo.

A *Valeria Vázquez*, *Vianey Mejía*, *Alonso Parsimonia*, *Lau Isabel* y a *Casco* por apoyarme en gran parte de las clases.

Todos ustedes me construyen, los quiero.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la labor de la *Dra. Vianey Rodríguez Lara* quien me brindó su apoyo en el proyecto. Gracias por el tiempo, las correcciones e impulsarme a sacar lo mejor de mí.

Gracias también a la *Dra. Teresa Fortoul* y todos los doctores que conforman el laboratorio por su valioso tiempo y comentarios invertidos en el proyecto.

Al *Dr. Cerbón y compañeros del laboratorio* por abrirme las puertas del mismo, acogerme y brindarme los recursos, por sus observaciones y su confianza.

Al Dr. Ignacio Sánchez por tanto conocimiento compartido conmigo, por su amistad y por enseñarme lo bonito que es el cultivo celular.

Al Dr. Andrés Castell por la revisión del proyecto y sus valiosos comentarios.

Gracias infinitas a la Facultad de Ciencias y a esta hermosa universidad.

**Siento el impulso del andariego, me crecen alas y sus plumas brillan
Son rojas como el fuego que me inunda, como la sangre que se hereda
Mis oídos sordos son ya valiosos y estos ojos no existen si no se asombran.**

Contenido

Abreviaturas.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Cáncer.....	2
1.1.2 Importancia de la proliferación celular en el desarrollo de la carcinogénesis.	3
1.2.1 Epidemiología del cáncer de pulmón.....	4
1.2.2 Clasificación del cáncer de pulmón.....	9
1.2.3 Factores etiológicos del cáncer de pulmón.....	10
1.3 Estrógenos.....	14
1.3.1Estrógenos y su relación con el Adenocarcinoma pulmonar.....	15
1.3.2 Estrógenos y proliferación celular.....	16
1.4 Quimiocinas.....	17
1.4.2 CXCL12/CXCR4 y proliferación celular.....	19
1.4.3 Quimiocinas y estrógenos.....	20
2. Justificación.....	21
3. Hipótesis.....	22
4. Objetivos.....	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos particulares.....	22
5. Método.....	23
5.1 Cultivo celular.....	23
5.2. Tratamiento.....	24
5.3 Ensayo MTT.....	25
5.4 Análisis estadístico.....	26
6. Resultados.....	27
6.1 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 1.5 horas.....	28
6.2 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 3 horas.....	29
6.3 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 6 horas.....	31
6.4 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 24 horas.....	32
6.5 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 72 horas.....	34
6.6 Evaluación de la proliferación celular de la línea A549 a 1.5 horas.....	38
6.7 Evaluación de la proliferación celular de la línea A549 a 3 horas.....	39

6.8 Evaluación de la proliferación celular de la línea A 549 a 6 horas.....	41
6.9 Evaluación de la proliferación celular de la línea A549 a 24 horas.....	42
6.10 Evaluación de la proliferación celular de la línea A549 a 72 horas.....	44
7. Discusión.....	48
8. Conclusiones.....	55
9. Perspectivas.....	55
10 Bibliografía.....	57

Abreviaturas

ADC	Adenocarcinoma.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AKT	Proteína kinasa tipo B.
ALK	Kinasa del linfoma anaplásico.
BaP	Benzo (a) pireno.
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico.
CP	Cáncer de pulmón.
C (PKCs)	Fosfolipasa C.
E2	Estradiol.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.
EREs	Elementos de respuesta a estrógenos.
ERs	Receptores a estrógenos.
Erα	Receptor de estrógenos alfa.
Erβ	Receptor de estrógenos beta.
HREs	Elementos de respuesta hormonal.
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1.
MAPK/ ERK	Proteína quinasa activada por mitógenos.
MTT	Bromuro de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-ilo) 2,5difeniltetrazol.
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
PK	Proteína kinasa.
PLC	Fosfolipasa C.
PI3-K	Fosfatidil inositol 3 kinasa.
SDF-1	Factor derivado de célula del estroma
SBF	Suero bovino fetal.
SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas.
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial.

1. Introducción.

1.1 Cáncer.

El cáncer se caracteriza por la proliferación descontrolada de células que finalmente darán lugar a un tumor (Hanahan y Weinberg, 2011). Es una enfermedad que involucra una serie de procesos que en conjunto producen la enfermedad, entre estos se encuentran: 1) la adquisición de mutaciones que conducen a una transformación progresiva de las células normales, 2) la evasión a señales que detienen la proliferación 3) la capacidad ilimitada para replicarse, 4) la evasión de la apoptosis, 5) la síntesis de factores de crecimiento, 6) la alteración en las vías metabólicas de las células tumorales, 7) la evasión a la vigilancia del sistema inmune, 8) la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), 9) la migración de las células neoplásicas y 10) la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011). Además las células tumorales tienen interacciones entre distintos tipos celulares como las células del estroma, los fibroblastos y las células del sistema inmune asociadas al tumor que favorecen la progresión tumoral (Lemjabbar-Alaoui, Hassan, Yang, y Buchanan, 2015).

1.1.2 Importancia de la proliferación celular en el desarrollo de la carcinogénesis.

Un rasgo fundamental en una célula cancerígena, implica la capacidad para mantener una proliferación descontrolada. En los tejidos normales se controla la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento y se regula la progresión del ciclo celular asegurando de esta manera la homeostasis de las células así como la forma y estructura del tejido (Hanahan y Weinberg, 2011), sin embargo, las células cancerígenas pueden adquirir la capacidad para proliferar de manera descontrolada por diversos mecanismos, como la producción de sus factores de crecimiento (estimulación autocrina) o la estimulación de las células que conforman el estroma y recibir a cambio varios factores de crecimiento (estimulación paracrina). Otra manera en que las células cancerosas proliferan de manera descontrolada es por la activación constitutiva o la sobreexpresión de receptores de factores de crecimiento debido a mutaciones en genes que codifican estas proteínas (Hanahan y Weinberg, 2011).

Análisis de secuencias de ADN de células cancerígenas han revelado mutaciones que predicen la activación constitutiva de circuitos que regulan la proliferación celular como las vías PI3K, AKT/PKB, AKT y ERK (Hanahan y Weinberg, 2011).

Con relación al cáncer pulmonar una de las vías más importantes para su aparición involucra la desregulación de la vía del factor de crecimiento epidérmico y su receptor (EGF/EGFR) que resulta en la activación de vías de señalización que incluyen PI3K y RAS/mitógeno activado por MAPK induciendo al aumento en la proliferación celular. Es de notar que esta desregulación se ha observado en el 90% de los casos de cáncer de pulmón (Brambilla y Gazdar, 2009).

1.2 Cáncer de pulmón.

1.2.1 Epidemiología del cáncer de pulmón.

El cáncer pulmonar (CP) es una patología que presenta un problema de salud pública debido a su alta incidencia y mortalidad. La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (Globocan IARC) en 2012 reportó, que el cáncer pulmonar ocupó el primer lugar en cuanto a mortalidad a nivel mundial, considerando ambos sexos (Ferlay J. *et al.*, 2012) (Figura 1).

PREZADON

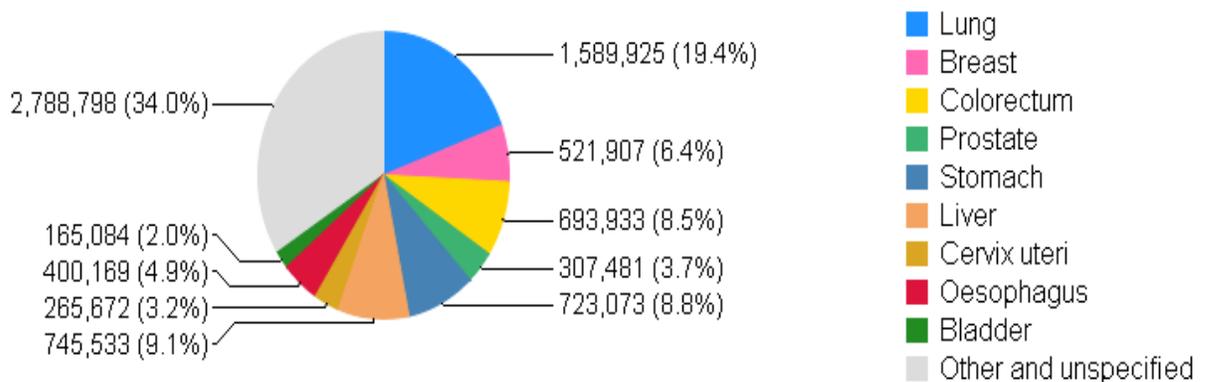


Figura 1. Mortalidad de cáncer pulmonar a nivel mundial, considerando ambos sexos. Tomado de GLOBOCAN IARC 2012.

La importancia de esta patología para los varones, es evidente, los datos estadísticos de Globocan (IARC) 2012 muestran que la incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón a nivel mundial en varones ocupa el primer lugar comparado con otros tipos de cáncer (Ferlay J. *et al.*, 2012) (Figura 2).

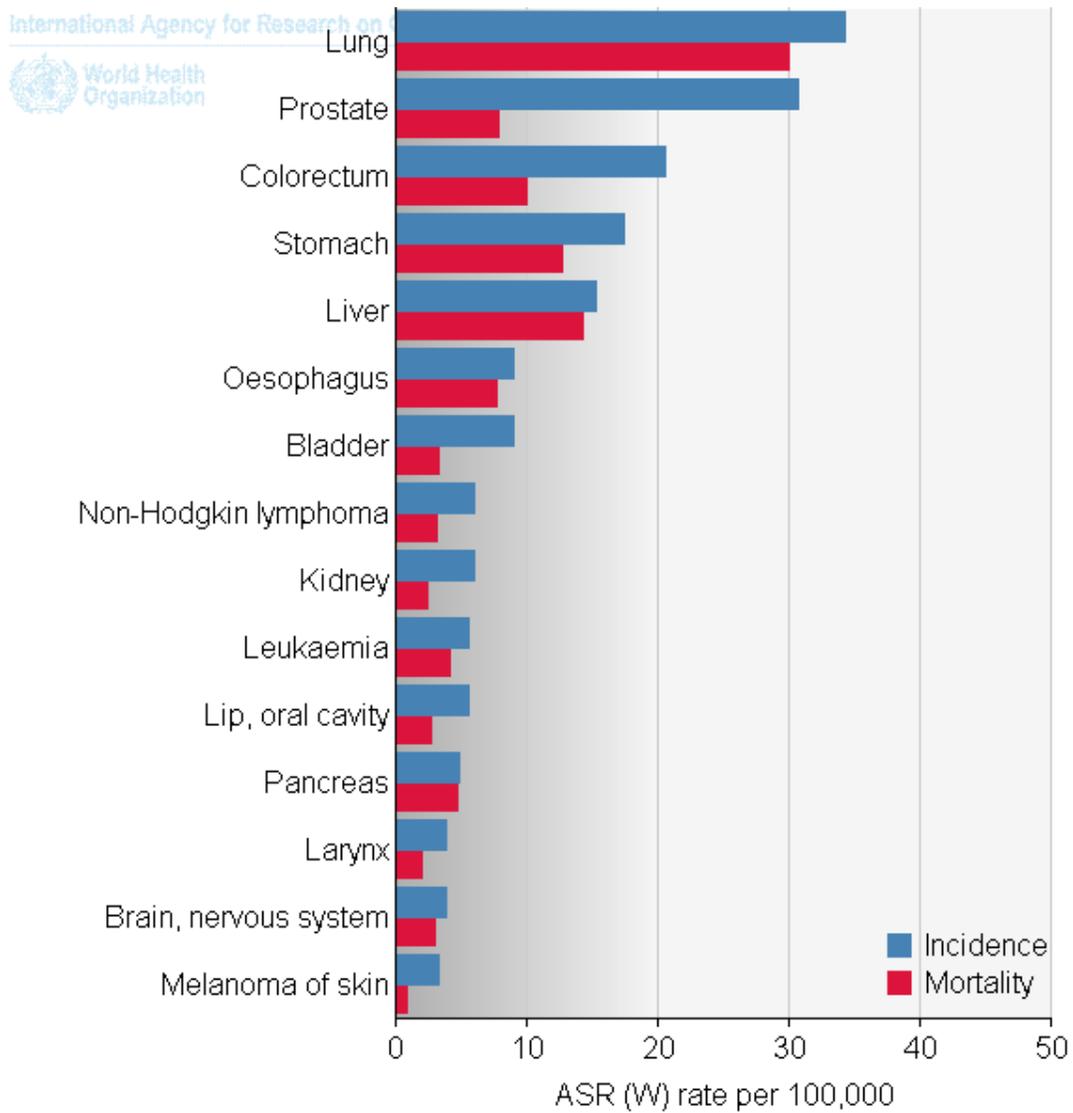


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer de pulmón en varones a nivel mundial. Tomado de Globocan IARC 2012.

Y para el caso de las mujeres, Globocan (IARC) 2012 reportó que la incidencia de cáncer pulmonar a nivel mundial ocupó el cuarto lugar, por debajo de los de mama, colon y útero. En relación con la mortalidad ocupó el segundo lugar por debajo del cáncer de mama (Ferlay J. *et al.*, 2012) (Figura 3).

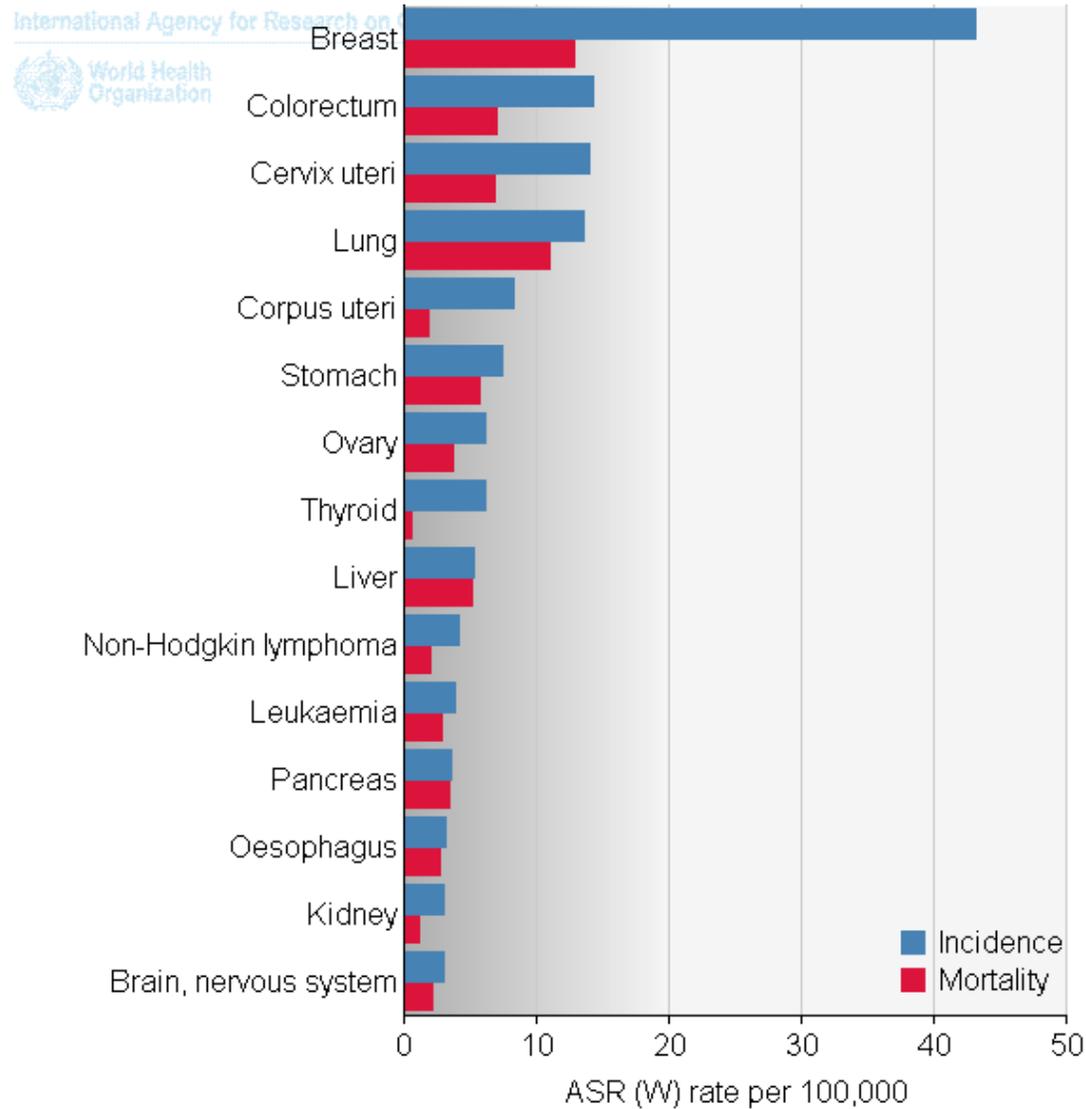


Figura 3. Incidencia y mortalidad de cáncer de pulmón en mujeres a nivel mundial. Tomado de Globocan IARC 2012.

Globocan (IARC) 2012 reportó que en México la incidencia y mortalidad de cáncer pulmonar en varones ocupó el segundo lugar sólo por debajo del cáncer de próstata (Ferlay J. *et al.*, 2012) (Figura 4).

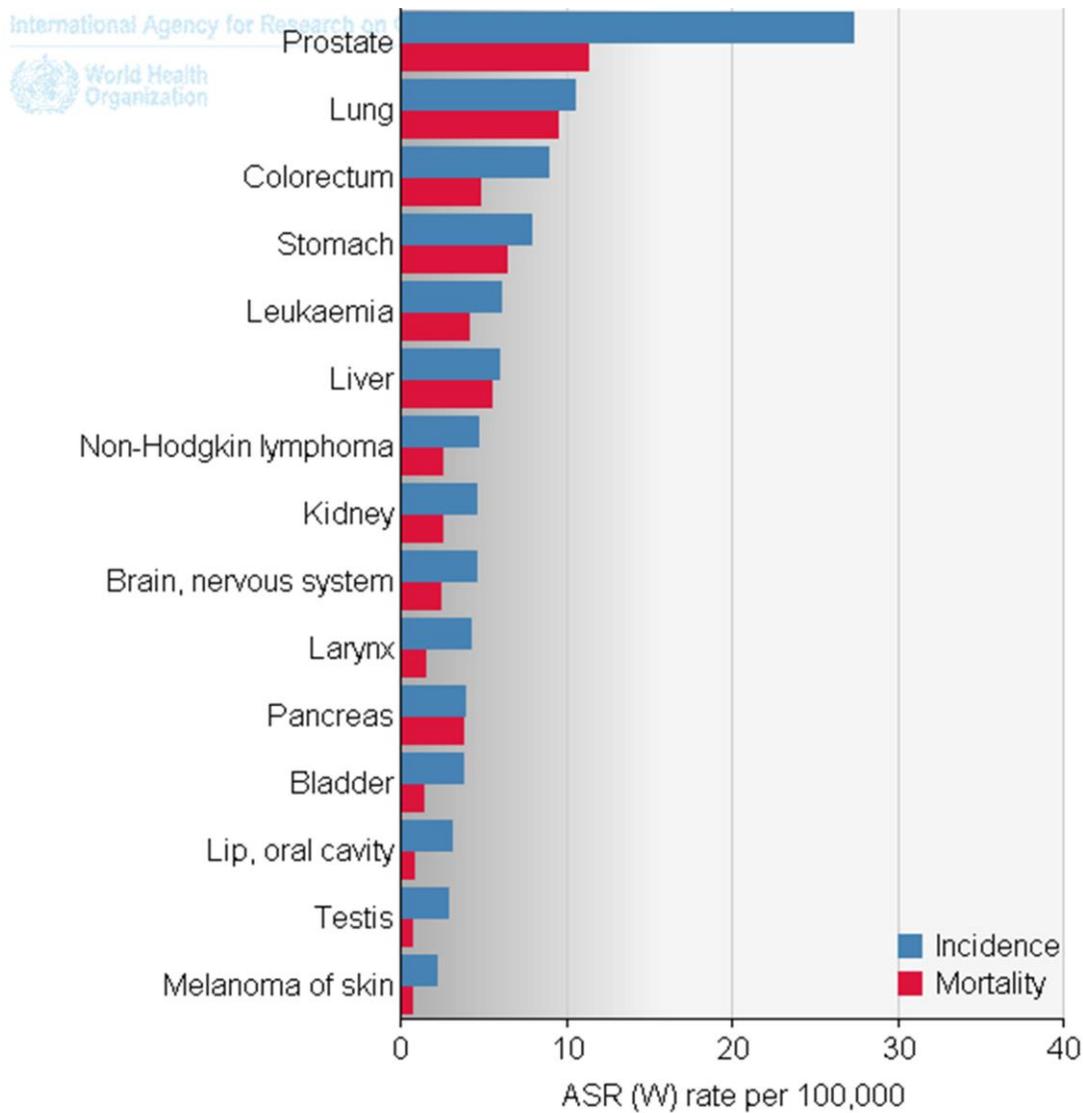


Figura 4. Incidencia y mortalidad de cáncer de pulmón en México para varones. Tomado Globocan IARC 2012.

Por otro lado, para las mujeres en México, Globocan (IARC) 2012 reportó que la incidencia de cáncer de pulmón ocupó el octavo lugar, sin embargo en mortalidad ocupó el quinto lugar (Figura 5).

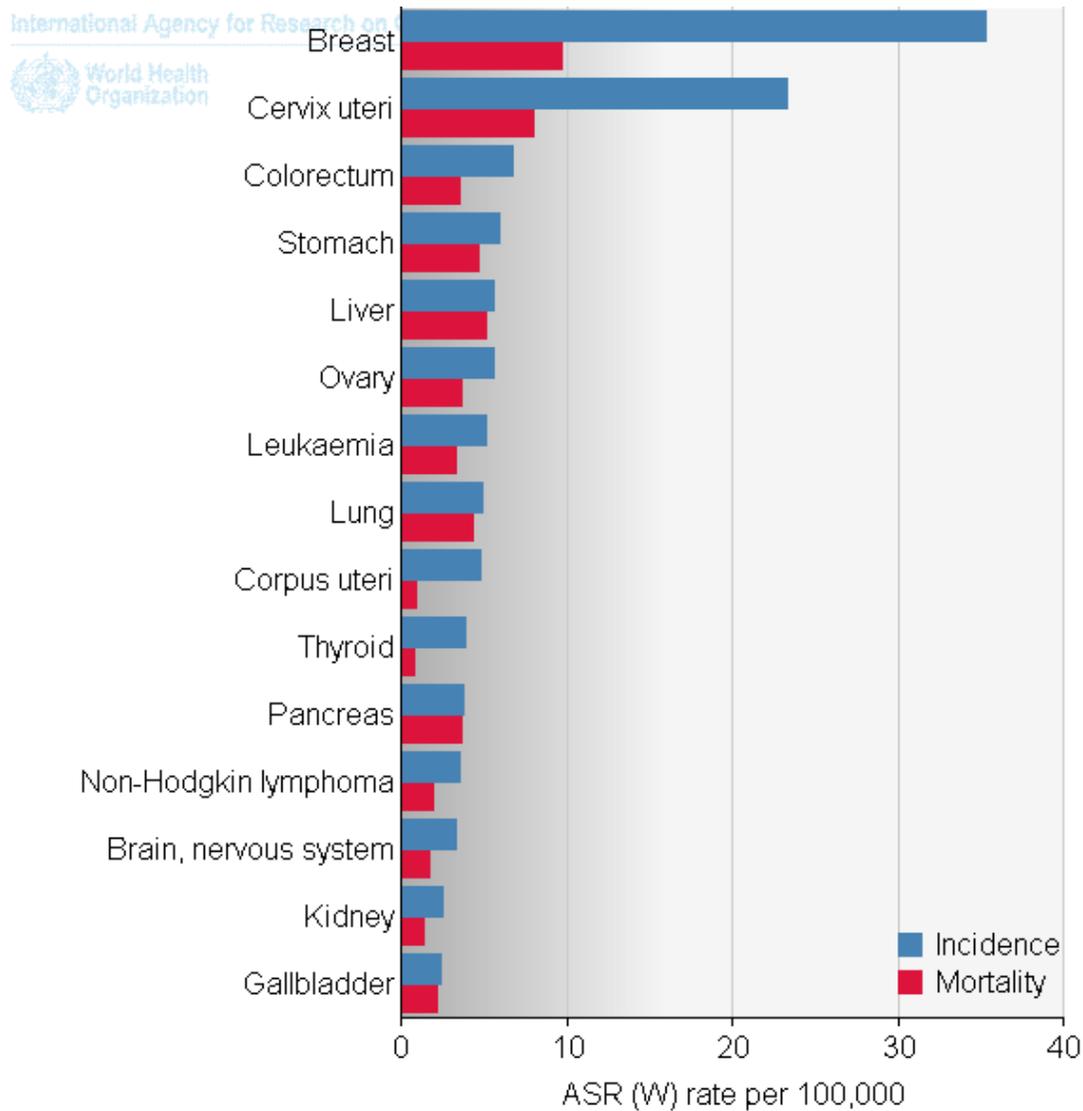


Figura 5. Incidencia y mortalidad de cáncer de pulmón en México para mujeres. Tomado Globocan IARC 2012.

Así en la actualidad en las estadísticas mundiales y en las de nuestro país el cáncer pulmonar es una patología de alta incidencia y mortalidad en ambos sexos. Cabe mencionar que esta patología ha incrementado en las mujeres a nivel mundial y en México en los últimos años (De la Cruz, *et al.*, 2011; Powell, Iyen-Omofoman *et al.*, 2013).

1.2.2 Clasificación del cáncer de pulmón.

El cáncer de pulmón se divide en dos categorías dependiendo de su estirpe histológica, biología y comportamiento:

1) Cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC por sus siglas en inglés), es un tumor muy agresivo con rápida diseminación que representa el 15% de los casos de cáncer de pulmón y, 2) el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés), que representa el restante 85% de los casos. Este último a su vez se divide en 3 grandes subtipos: el carcinoma de células escamosas, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma (ADC) (De la Cruz *et al.*, 2011). El ADC ocupa el 40% de todos los tipos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015) y se origina de las células epiteliales de los alvéolos, de las células de Clara y de los neumonocitos tipo II (Brambilla y Gazdar, 2009).

1.2.3 Factores etiológicos del cáncer de pulmón.

Tabaco

El CP está asociado principalmente al hábito tabáquico ya que en el humo producido están incluidos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), aminas aromáticas, N-nitrosaminas, y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, como: el benceno, el cloruro de vinilo, el arsénico, el cromo, el radón, sus productos de desintegración, el bismuto y el polonio que inducen la formación de aductos del ADN en las células epiteliales de pulmón. En la actualidad se han identificado más de 60 carcinógenos presentes en el tabaco (De la Cruz *et al.*, 2011b; Delgado *et al.*, 2005; Pfeifer *et al.*, 2002), siendo el benzopireno (BaP) y la N- nitrosamina 4- (metilnitrosamino) -1- (3 - piridil) -1 -butanona (NNK) los más importantes ya que inducen a mutaciones en genes importantes como en p53 (Pfeifer *et al.*, 2002).

A pesar de la fuerte asociación con el hábito tabáquico, las estadísticas mundiales estiman que el 15% de los cánceres de pulmón en los varones y hasta un 53% en las mujeres no son atribuibles al consumo de tabaco, observándose que el 25% de todos los casos de cáncer de pulmón en todo el mundo no se relacionan con el hábito tabáquico (Belani, Marts *et al.*, 2007; De la Cruz *et al.*, 2011; Vavalà *et al.*, 2014). Además los pacientes que no son fumadores se caracterizan por una mayor incidencia de ADC pulmonar (Vavalà *et al.*, 2014).

Sin embargo, aunque el consumo de tabaco es considerado el primer factor etiológico para el desarrollo del cáncer pulmonar, existen otros factores.

Humo de leña

En países en desarrollo, la madera y otros combustibles sólidos son utilizados para la cocción de alimentos y dar calor al hogar, sin embargo la exposición al humo producido por ésta biomasa se ha asociado a enfermedades respiratorias (Bruce, Perez-Padilla, y Albalak, 2000; Delgado, 2005).

Se ha observado que pacientes que han estado expuestos a humo de leña y que presentan cáncer de pulmón son en su mayoría mujeres donde el tipo histológico predominante es el ADC. Además, el BaP, uno de los principales carcinógenos presentes en tabaco, también se encuentra en el humo de leña (Delgado *et al.*, 2005). Se sabe que BaP es el causante de la mutación del gen p53 caracterizado por un cambio de bases de Guanina a Timina (Pfeifer *et al.*, 2002) siendo éste uno de los mecanismo por los cuales podría favorecerse el cáncer pulmonar (Delgado *et al.*, 2005).

Mutaciones

En el cáncer de pulmón, específicamente en el NSCLC se han identificado varias alteraciones genéticas que incluyen mutaciones en proto-oncogenes como KRAS, EGFR, BRAF, PI3K, MEK y HER2 y EGFR (Bogush *et al.*, 2010); este último desempeña un rol muy importante en la regulación de la proliferación normal de las células, la apoptosis, y otras funciones celulares. Mutaciones en este receptor se observan frecuentemente en pacientes mujeres no fumadores con ADC (Stabile *et al.*, 2011). De manera específica en el ADC pulmonar se ha encontrado un reordenamiento estructural en *ALK* y *ROS1* contribuyendo a la desregulación de

ciclinas y arrestinas, moléculas importantes en la regulación del ciclo celular (Brambilla y Gazdar, 2009; Hanahan y Weinberg, 2011). De igual manera se han encontrado mutaciones en el gen MYC que contribuye al crecimiento celular y en los genes Bax/Bcl-2, los cuales son claves en el proceso de sobrevivencia y apoptosis (Brambilla y Gazdar, 2009). Además se ha reportado la amplificación de proto-oncogenes como MET en el ADC. MET regula varios procesos fisiológicos incluidos la proliferación mediante la activación de PI3K, RAS-ERK o PI3K/AKT. Otro factor genético es la sobreexpresión de oncogenes por microRNAs (miRNAs) así como la inactivación de genes supresores de tumores (TSG), incluyendo TP53, RB1, CDKN2A, FHIT, RASSF1A, PTEN y una mayor actividad de la telomerasa, lo que contribuye a la inmortalidad celular mediante el mantenimiento de la longitud de los telómeros (Lemjabbar-Alaoui *et al.*, 2015).

Se ha identificado que existen diferencias moleculares entre fumadores y no fumadores, mutaciones en EGFR, ROS1 y ALK han sido observadas con mayor frecuencia en los pacientes no fumadores, mientras KRAS, TP53, BRAF, JAK2, JAK3 son más frecuentes en los pacientes fumadores (Vavalà *et al.*, 2014), lo que muestra que aunque existe una fuerte asociación del cáncer pulmonar al hábito tabáquico existen otros factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad como la susceptibilidad genética del paciente.

Hormonas

Se ha demostrado que las mujeres que han sido sometidas a terapia de reemplazo hormonal tienen mayor riesgo de incidencia de cáncer de pulmón, presentan tumores más heterogéneos y tienen una menor esperanza de vida comparada con los varones (Chlebowski *et al.*, 2010; Slatore, *et al.*, 2010). Así mismo los tratamientos con estradiol y progestina incrementan la mortalidad de pacientes con cáncer de pulmón (Chlebowski *et al.*, 2010).

Por otro lado se ha observado que los receptores de estrógenos, ER α y Er β , se expresan en tumores de pulmón (Stabile *et al.*, 2002) y que la activación de la vía de estrógenos con su receptor (E2/ER) induce la proliferación de células tumorales de pulmón *in vivo* e *in vitro* la cual puede ser bloqueada con fármacos antiestrogénicos como el fulvestrant (Belani *et al.*, 2007; Hammoud, *et al.*, 2008; Stabile *et al.*, 2002). Además existe una mayor prevalencia de ciertas mutaciones en mujeres no fumadoras comparado con varones como es el caso de los protooncogenes KRAS, HER2 y BRAF (Vavalà *et al.*, 2014). Estos datos sugieren que existen diferencias en el desarrollo y comportamiento del cáncer de pulmón entre varones y mujeres no fumadores, la cuál podría ser explicado por el efecto de los estrógenos en la carcinogénesis pulmonar.

1.3 Estrógenos.

Los estrógenos son hormonas esteroideas sintetizadas principalmente en las gónadas, glándulas adrenales y la unidad feto-placentaria. Contribuyen al correcto funcionamiento y diferenciación de algunos tejidos, de igual forma tienen un papel importante en las funciones reproductivas y en la conducta sexual (Marino, *et al.*, 2006; Niikawa *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2011).

Existen tres tipos de estrógenos principales de origen natural en las mujeres: estríol (E3), estradiol (E2) y estrona (E1). El E3 es el estrógeno predominante en las mujeres embarazadas, mientras que la E1 es el estrógeno predominante en la menopausia y el E2 es el predominante en las mujeres premenopáusicas no embarazadas (Tam *et al.*, 2011).

La principal hormona estrogénica es el 17β -estradiol (E2), que es sintetizado por la aromatización de la testosterona en el ovario y otros tejidos, entre ellos el pulmón. Esta hormona es muy importante para las funciones reproductivas, la diferenciación de varios tejidos y órganos, la modulación de la inflamación así como funciones cerebrales y cardiovasculares (Marino *et al.*, 2006). Los estrógenos actúan a través de sus receptores, el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) y el receptor de estrógenos beta ($ER\beta$) (Marino *et al.*, 2006; Tam *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción del E2 es mediante dos vías:

- 1). La vía genómica donde los estrógenos se unen a receptores celulares citoplásmicos que son translocados al núcleo ($ER\alpha$ y $ER\beta$) lo que induce un cambio conformacional en el mismo receptor que a su vez induce la disociación de

chaperonas, la dimerización del receptor y la activación de un dominio de transcripción mediante la unión directa a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) o la unión indirecta a otros factores de transcripción (Marino *et al.*, 2006; Tam *et al.*, 2011).

2). La vía no genómica donde varias vías de señalización son activadas con la unión de E2 a los ERs, entre las vías de señalización que se activan se encuentran: la fosfolipasa C (PKCs), Ras/Raf/MAPK, (PI3K)/AKT y cAMP (Marino *et al.*, 2006).

1.3.1 Estrógenos y su relación con el Adenocarcinoma pulmonar.

Recientemente se ha observado que los estrógenos juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer pulmonar, principalmente del ADC (Liu *et al.*, 2000; Vavalà *et al.*, 2014). Tanto el ER α como el ER β se encuentran expresados en NSCLC, sin embargo el ER β tiene un papel más importante en el CP ya que se encuentra sobreexpresado y se asocia a las funciones biológicas de los E2 al activar las vías genómicas y no genómicas (Miki, *et al.*, 2011). De igual forma se ha encontrado que la aromatasa, enzima que cataliza la formación de estrógenos, se expresa en muchos tumores de NSCLC (Stabile *et al.*, 2011) y se relaciona con la producción de estrógenos *in situ*. Además las concentraciones de E2 en ADC es significativamente mayor que en tejido pulmonar no neoplásico (Niikawa *et al.*, 2008).

Los estrógenos inducen la proliferación celular de NSCLC *in vitro* y el crecimiento del tumor *in vivo* (Hammoud *et al.*, 2008; Niikawa *et al.*, 2008; Stabile *et al.*, 2002).

Este efecto se ha comprobado ya que fármacos antiestrogénicos como el tamoxifeno y fulvestrant, son capaces de bloquear la transcripción de genes estrógeno dependientes que funcionan como factores de crecimiento en células de cáncer pulmonar (Niikawa *et al.*, 2008; Stabile *et al.*, 2002).

Se sabe que los estrógenos son importantes en la carcinogénesis de varios tipos de cáncer hormono-dependientes como el cáncer de esófago, estómago, colon, tiroides, hueso y mama (Miki, *et al.*, 2011) además que contribuyen a la proliferación celular en el cáncer de mama y el cáncer endometrial.

Así mismo se ha sugerido que los estrógenos son importantes en el desarrollo de la carcinogénesis en el ADC pulmonar (Hammoud *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2000; Miki *et al.*, 2011a; Niikawa *et al.*, 2008; Slatore *et al.*, 2010; Stabile *et al.*, 2002). Sin embargo los mecanismos por los cuales pueden favorecer la carcinogénesis han sido pobremente estudiados.

1.3.2 Estrógenos y proliferación celular.

Los estrógenos funcionan como un factor mitogénico de las células y al actuar sobre elementos de respuesta a estrógenos (ERE) activan promotores de secuencia de ADN llamados elementos de respuesta hormonal (HREs) lo cual resulta en la activación de factores de transcripción que pueden afectar la expresión de genes que promueven la proliferación celular. De esta forma los estrógenos pueden funcionar como factores de crecimiento en cooperación con los receptores de estrógeno (ER) o mediante la vía no genómica desencadenando cascadas de señalización como la de cAMP, PI3k o causando la desregulación de las ciclinas

(Mah *et al.*, 2011; Paulus *et al.*, 2011; Tam *et al.*, 2011). Sin embargo otros mecanismos por los cuales podrían inducir la proliferación en el CP no han sido explorados. Recientemente se demostró que los estrógenos son capaces de incrementar la expresión de CXCR4, un receptor de la quimiocina CXCL12, en líneas celulares de ADC pulmonar (Rodriguez-Lara, 2014). Estas proteínas podrían jugar un papel importante en la proliferación del ADC pulmonar sin embargo este evento no ha sido estudiado.

1.4 Quimiocinas.

Las quimiocinas son pequeños péptidos de secreción que ejercen su función biológica mediante la unión a sus receptores los cuales cuentan con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Beverly A., *et al.*, 2010; Nagasawa 2014; Tauler y Mulshine, 2009; Zlotnik, *et al.*, 2006). Estructuralmente se caracterizan por tener, en la mayoría de los casos, 4 cisteínas en posiciones conservadas (Zlotnik, *et al.*, 2006) y se clasifican como C, CC, CXC, o CX3C con base en la posición de las dos primeras cisteínas en su secuencia (Thulasitha *et al.*, 2015; Wald, Shapira, e Izhar, 2013), mientras que la letra L o R se agrega indicando si se trata de un ligando o un receptor respectivamente (Zlotnik *et al.*, 2006). Las quimiocinas se encuentran en el cuerpo humano en condiciones normales siendo su principal función la regulación de la migración de varios tipos celulares, adicionalmente se ha reportado que tienen un papel importante en el proceso

inflamatorio y también en enfermedades infecciosas, autoinmunes y en el cáncer (Zlotnik *et al.*, 2006).

1.4.1 CXCL12/CXCR4 y su relación con la carcinogénesis pulmonar.

Entre todos los receptores de quimiocinas; el receptor CXCR4 es ampliamente expresado en los tumores malignos, la sobreexpresión de CXCR4 en tumores de distintos tipos como el de ovario, próstata, melanoma, neuroblastomas y recientemente en el ADC pulmonar ha sido reportada (Domanska *et al.*, 2013; Rodriguez-Lara *et al.*, 2014; Wald *et al.*, 2013). Este receptor actúa tras la unión de su único ligando, la quimiocina CXCL12 o SDF-1 (Domanska *et al.*, 2013; Wald *et al.*, 2013). En 2006 se identificó otro receptor de CXCL12 llamado CXCR7, este receptor es expresado durante la embriogénesis, angiogénesis y también en varios tejidos malignos (Wald *et al.*, 2013).

El eje CXCL12/CXCR4 tiene un papel fundamental en varios procesos fisiológicos como la hematopoyesis. En el sistema inmune contribuye a la proliferación de precursores de linfocitos tipo B, contribuyen a la migración celular durante el desarrollo embrionario, en la neurogénesis y formación del sistema cardiovascular en tejidos sanos (Nagasawa, *et al.*, 2014). Sin embargo también se sabe que tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer ya que la unión de CXCL12 a CXCR4 desencadena cascadas de señalización que permite la supervivencia, la proliferación y la migración de las células que lleva a la metástasis (Kim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2011; Wald *et al.*, 2013).

Se ha reportado que el eje CXCL12/CXCR4 contribuye al progreso de distintos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, ovario, próstata, melanoma, neuroblastoma, carcinoma y en NSCLC favoreciendo la proliferación celular (Domanska et al., 2013; Lee et al., 2011; Miao et al., 2007 y Sun et al., 2014).

Se ha encontrado que más del 80% de tumores de NSCLC expresan CXCL12 (Wald et al., 2013) y en estudios realizados con pacientes se ha encontrado una sobreexpresión de CXCR4. Esta sobreexpresión del eje CXCL12/CXCR4 se relaciona con una fase más avanzada del cáncer, peor pronóstico de vida y metástasis (Spano et al., 2004; Su, 2005; Wagner et al., 2009; Wald et al., 2013; Zhou, et al., 2002).

1.4.2 CXCL12/CXCR4 y proliferación celular.

Se ha reportado que el eje CXCL12/CXCR4 pueden contribuir a la proliferación celular del cáncer cerebral (Barbieri et al., 2008; Uemae et al., 2014), y del ADC pulmonar (Wald et al., 2011) mediante distintos mecanismos activando múltiples vías intracelulares que involucran la regulación de la proliferación celular (Balkwill, 2004a; Uemae et al., 2014; Wald et al., 2013). Por un lado CXCL12 favorece, la fosforilación río abajo de ERK-2 y PI3AKT y PKB/Akt, que son las principales vías involucradas en la proliferación celular (Balkwill, 2004b; Wald et al., 2013). De igual manera la activación de la proteína G unida al receptor CXCR4 produce un aumento de los niveles de calcio intracelular lo cual activa IP3 una proteína de suma importancia para la proliferación celular (Pinto et al., 2015).

Esto se ha confirmado en estudios *in vitro* donde se bloquea el eje CXCL12/CXCR4 con un antagonista para CXCR4 llamado AMD3100 (plerixafor) y se observa disminución en la proliferación celular (Barbieri *et al.*, 2008; Uemae *et al.*, 2014; Wald *et al.*, 2011).

1.4.3 Quimiocinas y estrógenos.

Recientemente, Rodriguez-Lara y colaboradores (2014) reportaron que el E2 juega un papel importante en la expresión del eje CXCL12/CXCR4 en el NSCLC particularmente en el ADC. Se demostró que las mujeres premenopáusicas exhiben una mayor expresión de CXCR4/CXCL12 y ER β , comparado con las mujeres posmenopáusicas y los varones. Además el mismo grupo encontró que el E2 es capaz de estimular la expresión de CXCR4 de forma dosis y tiempo dependiente en células de ADC pulmonar, en un análisis *in vitro* (Rodriguez-Lara, 2014).

Debido a que el eje CXCR4/CXCL12 está implicado de manera importante en la proliferación del NSCLC y a la reciente descripción de la relación de los E2 con ésta vía, resulta interesante estudiar si los E2 favorecen la proliferación mediante la activación del eje CXCL12/CXCR4 el cual es un eje muy importante en la carcinogénesis pulmonar y podría ser un nuevo mecanismo que vislumbre el papel de los estrógenos en la carcinogénesis pulmonar.

2. Justificación.

El cáncer pulmonar presenta el segundo lugar de mortalidad por cáncer en las mujeres en el mundo. La incidencia de ADC pulmonar en mujeres ha incrementado independientemente del hábito tabáquico. Las mujeres premenopáusicas presentan los tumores más agresivos, lo que indica que otros factores, entre ellos las hormonas sexuales, pueden favorecer el curso de esta enfermedad. Estudios previos muestran una alta expresión de ER β , CXCL12, CXCR4 en ADC pulmonares de mujeres premenopáusicas. Además se observó que el E2 incrementa la expresión de CXCR4 *in vitro*, sin embargo, se desconoce si esta hormona es capaz de estimular la proliferación celular a través de la activación del eje CXCR4/CXCL12, la activación de esta vía por los estrógenos, podría ser un mecanismo que ayude a explicar el peor pronóstico observado en las mujeres premonopáusicas.

3. Hipótesis.

Los estrógenos incrementarán la proliferación de las células de ADC pulmonar a través del eje CXCL12/CXCR4.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

Investigar la participación de los estrógenos en la proliferación de las células de ADC pulmonar a través de la activación del eje CXCR4/CXCL12.

4.2 Objetivos particulares

Evaluar la participación del E2 en la proliferación de las células SK-LU1 y A549 de ADC pulmonar a través de la activación del eje CXCR4/CXCL12, mediante la prueba de MTT.

Analizar el efecto que presentan los fármacos tamoxifeno y AMD3100 en la proliferación de las células SK-LU-1 y A549.

5. Método.

5.1 Cultivo celular.

Las líneas celulares de ADC pulmonar A549 y SK-LU1 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). La línea A549 fue cultivada en medio de DMEM F-12 (Gibco®), suplementado con 10% SBF (Gibco®). Las células SK-LU1 fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco®) suplementado con 10% SBF (Gibco®). Ambas líneas celulares se incubaron a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ y 95% de aire y humedad.

La línea SK-LU1 deriva de un tumor de ADC pulmonar de una mujer de 60 años de edad, mientras que la línea A549 proviene de un hombre de 58 años. En ambas líneas la expresión de ER β ha sido reportada (Caltagirone *et al.*, 1997; Ivanova *et al.*, 2010; Mollerup *et al.*, 2002).

5.2. Tratamiento.

Las células fueron cultivadas en cajas de 96 pozos a una confluencia inicial de 7,000 células por pozo.

Para mantener un ambiente libre de hormonas durante los tratamientos se utilizó medio DMEM sin rojo de fenol con 1% de SBF sin hormonas. Se realizaron tres experimentos independientes y cada tratamiento se realizó por triplicado.

Se formaron 10 grupos para cada línea celular con distintos tratamientos (Tabla 1). Se utilizó (Sigma Aldrich) a una concentración para 17β -estradiol de 10 nM (disuelto en etanol y agregado al medio de cultivo), debido a que es la concentración a la que se ha reportado la mayor expresión de CXCR4 en estudios previos (Rodríguez-Lara *et al.*, 2014).

Se utilizó tamoxifeno a una concentración de 17 μ M. El tamoxifeno es un antagonista de ER β (Paulus *et al.*, 2011), el principal receptor expresado en estas líneas celulares.

Se utilizó AMD3100 a una concentración de 50 nM. AMD3100 es un fármaco que bloquea el eje CXCL12/CXCR4 al ser un antagonista de CXCR4 (Barbieri *et al.*, 2008; Uemae *et al.*, 2014; Wald *et al.*, 2011).

Para determinar la concentración adecuada de AMD3100 y tamoxifeno se probaron varias concentraciones y se determinó una concentración de 50 nM y de 17 μ M respectivamente ya que a esas concentraciones no se afecta la viabilidad celular.

Los tratamientos se aplicaron en eventos independientes para 1.5, 3, 6, 24 y 72 horas.

Tabla 1. Grupos formados para los distintos tratamientos.

Grupos	Tratamientos
1. Control	DMEM sin hormonas y sin fenol rojo
2.	DMEM y E2
3.	DMEM, E2 y tamoxifeno
4.	DMEM, E2 y AMD3100
5.	DMEM, E2 y tamoxifeno
6.	DMEM y CXCL12
7.	DMEM, CXCL12 y AMD3100
8.	DMEM, E2 y CXCL12
9.	DMEM, E2, CXCL12 y AMD3100
10.	DMEM, E2, CXCL12, AMD3100 y tamoxifeno

5.3 Ensayo MTT.

La prueba de MTT es un ensayo colorimétrico cuantitativo que es utilizado para medir la supervivencia y proliferación de las células (Mosmann, 1983).

Consiste en la reducción metabólica de MTT o bromuro de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-ilo) 2,5difeniltetrazol a formazán, la cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células y por la tanto al índice de proliferación.

Los resultados se pueden leer en un espectrofotómetro de escaneo de múltiples pozos, las principales ventajas del ensayo colorimétrico son su rapidez y precisión (Mosmann, 1983).

El ensayo MTT se realizó 1.5, 3, 6, 24 y 72 horas después del tratamiento añadiendo 20 µl de MTT disuelto en DMSO a cada pozo y se incubó durante 80 minutos a 37°C.

Los cristales formados se disolvieron con DMSO y se midió la absorbancia de formazán en un espectrofotómetro para microplacas Epoch (Bio Tek®) a una longitud de onda de 520nm.

5.4 Análisis estadístico.

Se obtuvo la absorbancia de cada uno de los grupos y se obtuvieron las medias de absorbancia para cada uno. Para saber si los datos presentaron una distribución normal se realizaron tres pruebas; Kolmogorov-Smirnov test, D'Agostino and Pearson omnibus normality test y Shapiro-Wilk normality test (Prisma 6.0, GraphPad® software La Jolla California, USA).

Posteriormente para determinar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la proliferación celular se estimaron los porcentajes de viabilidad y se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) (Prisma 6.0, GraphPad® software La Jolla California, USA), posteriormente se realizó la prueba post hoc de Tukey (Prisma 6.0, GraphPad® software La Jolla California, USA) para determinar las diferencias entre cada grupo con su control a los diferentes tiempos. En todos los casos $p < 0.001$ fue considerada significativa.

6. Resultados.

Para evaluar el efecto de los estrógenos en la proliferación celular a través de la activación del eje CXCR4/CXCL12 se trataron las líneas celulares SK-LU-1 y A549 de ADC pulmonar con los diferentes tratamientos (Tabla 1), posteriormente a 1.5, 6, 24 y 72 horas después del tratamiento se midió la absorbancia de formazán (Figura 6). Se estimó el porcentaje de viabilidad y se comparó con el grupo control así como entre los grupos con tratamiento mencionados anteriormente.

En cada línea celular y en cada uno de los tiempos analizados se tomó como basal el grupo control, el cual se consideró con un 100% de viabilidad celular.

Los resultados se muestran por línea celular y por tiempo de tratamiento (Tablas 2 y 3, Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16).

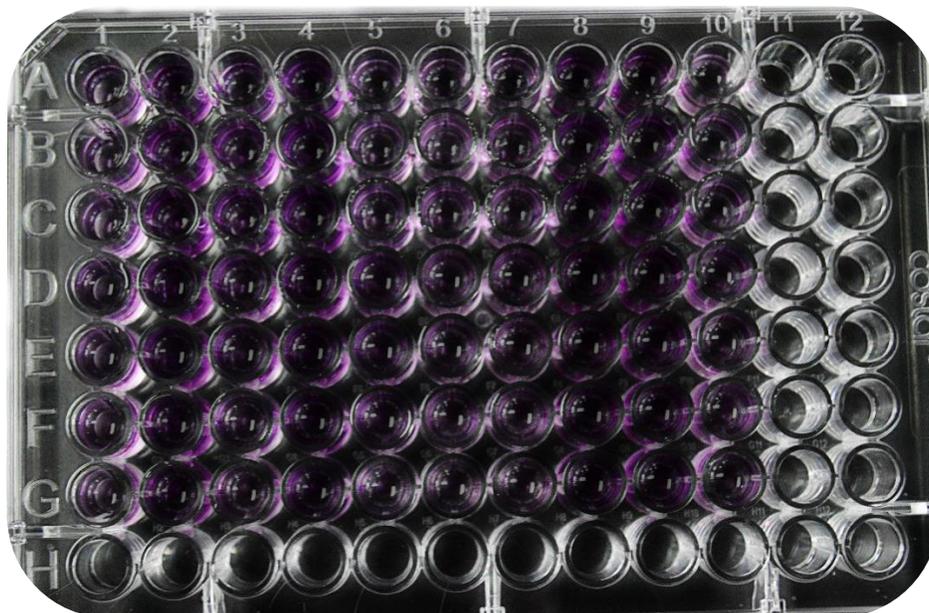


Figura 6. Placa de 96 pozos con la formación de formazán, resultado del ensayo MTT en las células SK-LU1 como ejemplo.

6.1 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 1.5 horas.

A 1.5 horas después del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad (Figura 7, Tabla 2) y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos, el cual se midió en función del incremento o disminución del porcentaje de viabilidad dada en porcentaje. Una viabilidad mayor al 100% nos sugiere que hubo proliferación.

Los grupos en los que el tamoxifeno estuvo presente mostraron menor viabilidad comprado con el control. En el grupo E2+Tamoxifeno (3) se observó una viabilidad del 24%, mientras que en el grupo E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) la viabilidad fue del 31%, y en el grupo E2+Tamoxifeno+CXCL12+ AMD3100 (10) fue de 23% (Figura 7, Tabla 2). Así mismo, se observó diferencia significativa entre el grupo tratado con E2 (2) y el tratado con E2+Tamoxifeno (3) que presentaron una viabilidad del 119% y 24% respectivamente (Figura 7, Tabla 2).

Lo anterior sugiere que el incremento en la viabilidad de los grupos tratados con estrógenos se debe a la presencia del E2. Y que el tratamiento con los fármacos disminuyó la viabilidad celular.

Por otro lado, el grupo E2+CXCL12 (8) presentó una viabilidad del 152% (Figura 7, Tabla 2), indicando un incremento significativo en la proliferación celular.

6.2 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 3 horas.

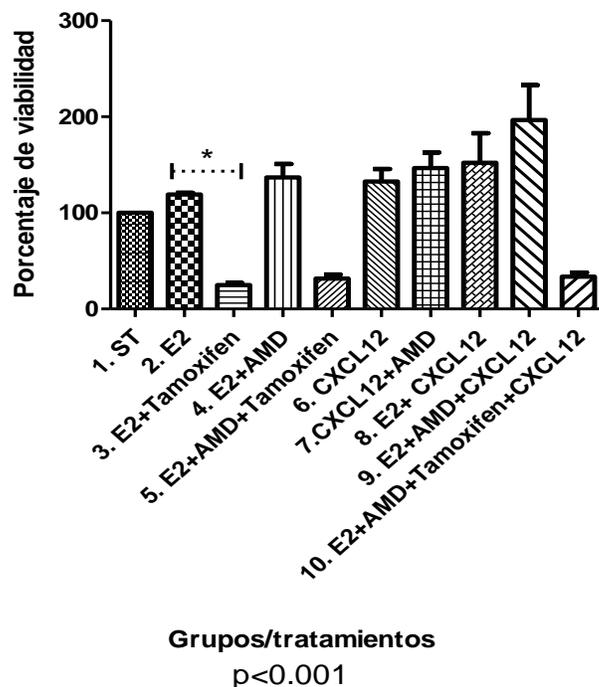
A 3 horas después del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentó el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 8, Tabla 2).

De forma similar a lo ocurrido a 1.5 horas de tratamiento, los grupos tratados con tamoxifeno presentaron significativamente menor viabilidad con respecto al grupo control. En los grupos E2+Tamoxifeno (3), E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) y E2+Tamoxifeno + CXCL12+ AMD3100 (10), la viabilidad fue del 29%, 26% y 25%, respectivamente (Figura 8, Tabla 2).

Además, observamos una disminución en la viabilidad del grupo tratado con E2+Tamoxifeno (3) con respecto al grupo tratado con estrógenos (2) con el 29% y 137% respectivamente (Figura 8, Tabla 2).

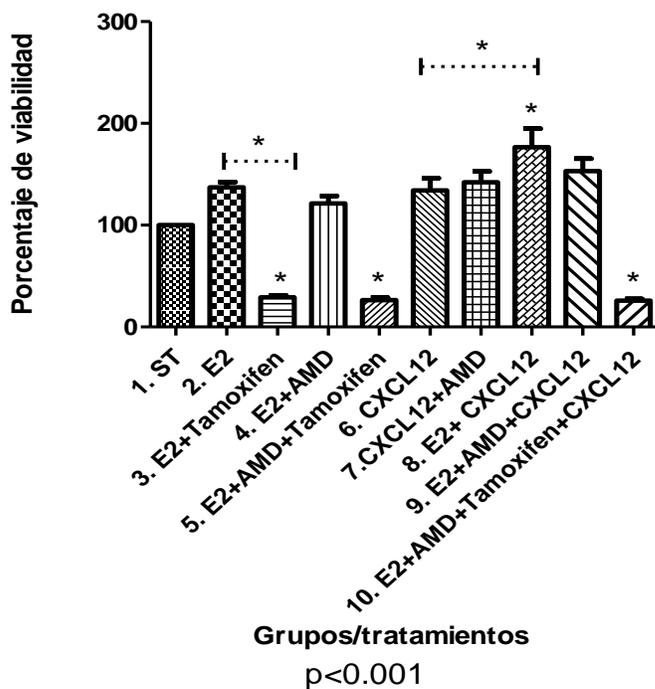
Cuando las células fueron tratadas con E2+CXCL12 (Grupo 8) la viabilidad fue del 176% (Figura 8, Tabla 2), lo que representa un incremento significativo en la proliferación celular.

Proliferación de células SKLU 1.5h post-tratamiento



* Diferencia con respecto al control.
|.....| Diferencia entre grupos.

Proliferación de células SKLU 3h post-tratamiento



* Diferencia con respecto al control.
|.....| Diferencia entre grupos.

Figuras 7 y 8. Se muestran las gráficas de la línea celular SK-LU1 con el porcentaje de viabilidad celular para 1.5h y 3h respectivamente.

6.3 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 6 horas.

A 6 horas después del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 9, Tabla 2).

A este tiempo los grupos tratados con tamoxifeno presentaron significativamente menor viabilidad con respecto al grupo control. En los grupos E2+Tamoxifeno (3), E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) y E2+Tamoxifeno + CXCL12+ AMD3100 (10), la viabilidad fue del 21%, 22% y 20%, respectivamente (Figura 9, Tabla 2).

Así mismo, se observó diferencia significativa entre el grupo tratado con E2 (2) y el tratado con E2+Tamoxifeno (3) que presentaron una viabilidad del 120% y 21% respectivamente (Figura 9, Tabla 2).

Confirmando así que el incremento en la proliferación de los grupos tratados con estrógenos se debe a la presencia del E2.

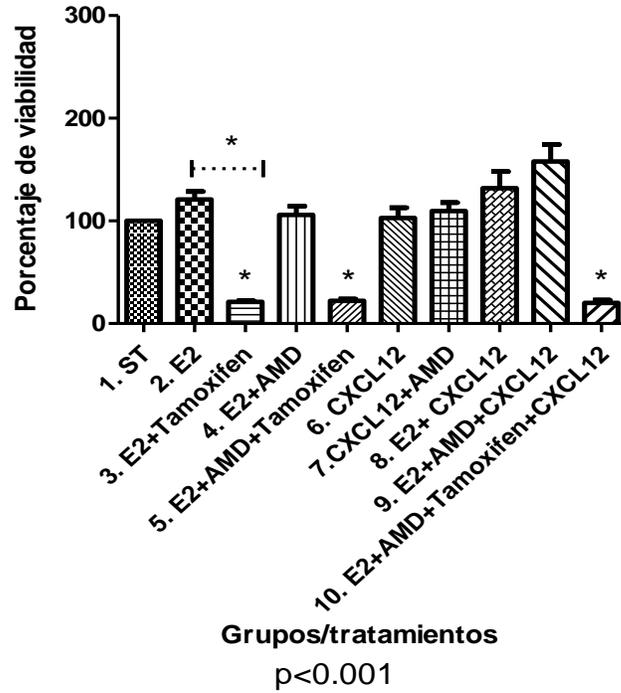
6.4 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 24 horas.

A 24 horas después del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 10, Tabla 2).

A este tiempo los grupos que fueron tratados con tamoxifeno también mostraron un decremento significativo en la viabilidad celular con respecto al control. El grupo tratado con E2+Tamoxifeno (3) presentó una viabilidad del 27%, el grupo tratado con E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) del 28% y el grupo tratado con E2+Tamoxifeno + CXCL12+ AMD3100 (10) presentó una viabilidad del 27% (Figura 10, Tabla 2).

Se presentaron diferencias significativas entre dos distintos tratamientos, el de E2 (Grupo 2) y el grupo E2+Tamoxifeno (Grupo 3) con una viabilidad del 104% y 27% respectivamente (Figura 10, Tabla 2). Sin embargo el tratamiento con E2, con CXCL12 o ambos factores de proliferación, a 24 horas después del tratamiento, no produjeron un incremento significativo en la proliferación con respecto al control (Figura 10, Tabla 2).

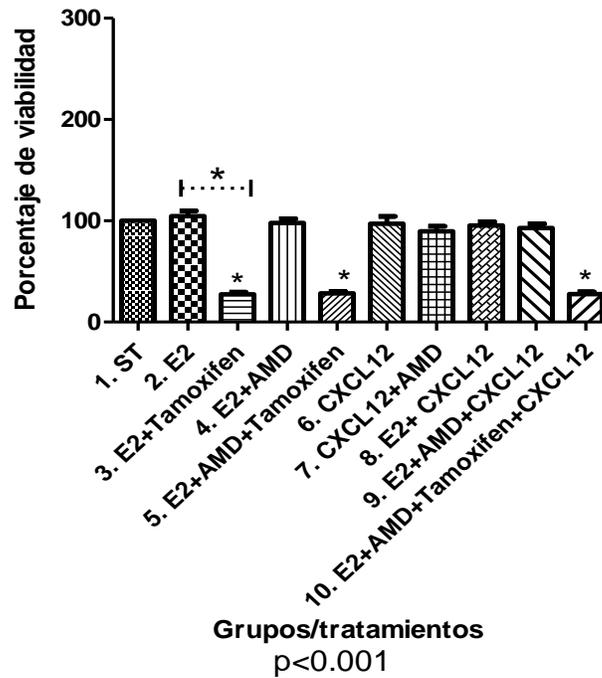
Proliferación de células SKLU 6h post-tratamiento



* Diferencia con respecto al control.

|.....| Diferencia entre grupos.

Proliferación de células SKLU 24h post-tratamiento



* Diferencia con respecto al control.

|.....| Diferencia entre grupos

6.5 Evaluación de la proliferación celular de la línea SK-LU1 a 72 horas.

A 72 horas después del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 11, Tabla 2).

De manera similar a lo reportado en tiempos menores para esta línea los grupos que después de 72 horas de tratamiento presentaron menor viabilidad con respecto al control fueron aquellos a los que se les añadió tamoxifeno, específicamente los grupos tratados con E2+Tamoxifeno (3) y el grupo con E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) con una viabilidad del 33%, así como el grupo con E2+Tamoxifeno + CXCL12+AMD3100 (10) que mostró una de viabilidad del 34% (Figura 11, Tabla 2).

También se observó un decremento significativo en la viabilidad del grupo tratado con E2+CXCL12 (8) con una viabilidad del 49% y del 75% para el grupo tratado con CXCL12 (6) (Figura 11, Tabla 2).

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con E2 (Grupo 2) y E2+Tamoxifeno (Grupo 3) con una viabilidad del 126% y 33%, respectivamente (Figura 11, Tabla 2). También entre los grupos tratados con CXCL12 (6) y CXCL12+AMD3100 (7) con una viabilidad del 75% y 49%, respectivamente (Figura 11, Tabla 2).

Por otro lado se observó un incremento significativo en la proliferación del grupo E2 (2) con una viabilidad del 126% (Figura 11, Tabla 2) y disminuyó significativamente cuando se añadió tamoxifeno.

Proliferación de células SKLU 72h post-tratamiento

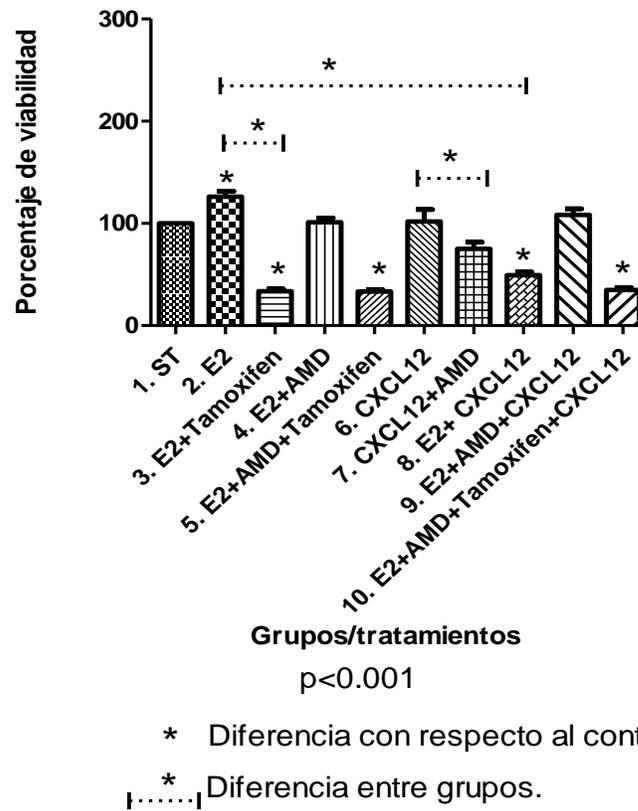


Figura 11. Se muestra la gráfica de la línea celular SK-LU1 con el porcentaje de viabilidad celular para 72h.

En resumen, aunque a 1.5, 3 y 24 horas después del tratamiento con E2 se observó un aumento en la proliferación con respecto al control, este incremento no fue significativo.

El tratamiento con CXCL12 incrementó la proliferación con respecto al control en tiempos cortos (1.5, 3 y 6h) sin embargo tampoco fue significativo.

Con respecto a la combinación de ambos factores E2 y CXCL12 a 3 horas después del tratamiento se mostró un incremento significativo en la proliferación con respecto al control, por lo tanto en células SK-LU1 a este tiempo la combinación del E2 y la quimiocina favorecen de forma significativa la proliferación celular. Por otro lado a 3, 6, 24 y 72 horas después del tratamiento se presentó un decremento significativo en la viabilidad del grupo E2+Tamoxifeno (3) con respecto al grupo E2 (2) demostrando la importancia de los estrógenos no sólo para la proliferación de las células sino para la supervivencia celular y corrobora que el efecto observado en los grupos tratados con E2 se debe a la presencia del E2. Es importante mencionar que en todos los tiempos se encontró un decremento en el porcentaje de viabilidad del grupo tratado con E2 y AMD3100 (4) con respecto al grupo tratado sólo con E2 (2) lo cual nos sugiere la relación de las vías ER/E2 y CXCL12/CXCR4 en la proliferación celular de ambas líneas celulares.

A 72 horas se presentaron diferencia significativa entre los grupos CXCL12 (6) y CXCL12+AMD3100 (7) con mayor proliferación el grupo 6 lo cual nos muestra el efecto antagonista de AMD3100, sin embargo a tiempos cortos no observamos que dicha diferencia fuera significativa.

A 24 y 72 horas después del tratamiento se observó una disminución general de la viabilidad en todos los grupos comparado con la viabilidad obtenida a 1.5, 3 y 6 horas después del tratamiento. Lo que puede sugerir un estrés de las células ante las condiciones de tratamiento en tiempos largos.

A 72 horas post-tratamiento la proliferación de las células con E2 fue significativamente mayor que el control y que la combinación CXCL12+E2. Además como esperábamos se observó un decremento significativo en la viabilidad de los grupos tratados con los inhibidores AMD3100 y tamoxifeno.

Lo anterior muestra claramente el efecto del fármaco antiestrogénico y el papel de los estrógenos en el mantenimiento y la proliferación de las células.

Tabla 2. Porcentajes de viabilidad celular para cada uno de los tratamientos a los diferentes tiempos en células SK-LU1.

Tratamientos en células SK-LU1	% viabilidad celular a 1.5h.	% viabilidad celular a 3h.	% viabilidad celular a 6h.	% viabilidad celular a 24h.	% viabilidad celular a 72 h.
1. Control	100	100	100	100	100
2. E2	119	137	120	104	126
3. E2+Tamoxifeno	29	29	21	27	33
4. E2+AMD3100	136	121	105	97	101
5.E2+Tamoxifeno +AMD3100	31	26	22	28	33
6. CXCL12	132	134	102	97	101
7. CXCL12+AMD3100	146	142	109	89	75
8. E2+CXCL12	152	176	131	95	99
9.E2+CXCL12 +AMD3100	196	153	157	92	108
10. E2+Tamoxifeno + CXCL12+AMD3100	33	25	20	27	34

6.6 Evaluación de la proliferación celular de la línea A549 a 1.5 horas.

Después de 1.5 horas del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 12, Tabla 3).

De manera similar a lo reportado en la línea SK-LU1 los grupos tratados con tamoxifeno mostraron menor viabilidad con respecto al control.

El grupo tratado con E2+Tamoxifeno (3) presentó una viabilidad del 26%, igual que el grupo tratado con E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) mientras que el grupo tratado con E2+Tamoxifeno + CXCL12+ AMD3100 (10) presentó una viabilidad del 29% (Figura 12, Tabla 3). En estos grupos se muestra un decremento significativo en la viabilidad celular e incluso muerte celular con respecto al control.

En contraste, los grupos tratados con E2 (2), E2+CXCL12 (8) y con E2+CXCL12+AMD3100 (9) mostraron un incremento significativo en la proliferación celular, con una viabilidad del 187% y 214% y 173%, respectivamente (Figura 12, Tabla 3).

Fue interesante que el grupo tratado con E2+CXCL12 (8) presentó un incremento significativo en la proliferación con respecto al grupo estimulado sólo con CXCL12 (6), mostraron una viabilidad del 214% y 126% respectivamente (Figura 12, Tabla 3). Lo cual nos sugiere que aunque CXCL12 incrementa la proliferación celular, la presencia de estrógenos potencia este efecto proliferativo.

Así mismo a 1.5 horas después del tratamiento se mostraron diferencias significativas entre el grupo tratado con E2 (2) y el tratado con E2+Tamoxifeno (3) con una viabilidad del 187% y 26% respectivamente (Figura 12, Tabla 3).

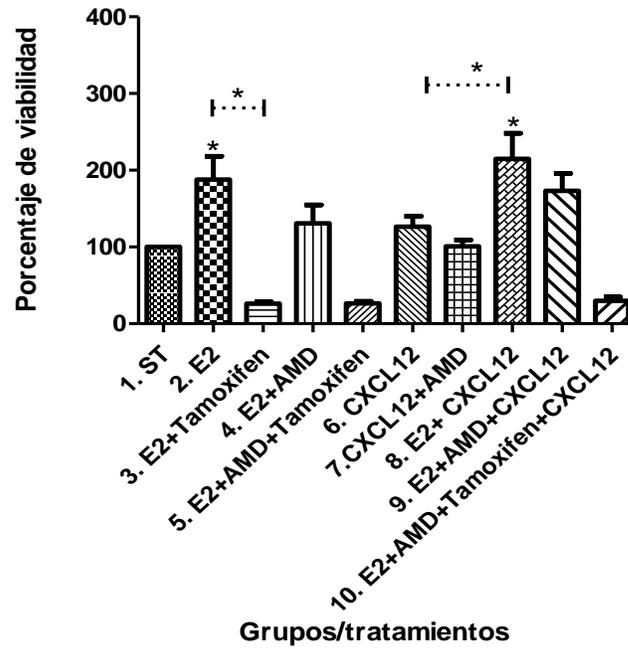
6.7 Evaluación de la proliferación celular de la línea A549 a 3 horas.

Después de 3 horas de cultivo celular se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 13, Tabla 3).

Como observamos en el tiempo anterior y con la línea celular SK-LU1, los grupos tratados con tamoxifeno mostraron un decremento significativo en la viabilidad con respecto al control. El grupo tratado con E2+Tamoxifeno (3) con 0.28%, el grupo tratado con E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) con 60% y el grupo tratado con E2+Tamoxifeno + CXCL12+ AMD3100 (10) con 73% (Figura 13, Tabla 3).

Por otro lado el grupo tratado con E2 (2) con una viabilidad del 169% y el grupo con E2+CXCL12 (8) con una viabilidad del 280% mostraron un incremento significativo en la proliferación celular con respecto al control y como se mencionó anteriormente disminuyó significativamente cuando se añadió tamoxifeno (Figura 13, Tabla 3), lo que sugiere que los estrógenos y la combinación de E2 y CXCL12 incrementan la proliferación de manera significativa a 3 horas en esta línea celular.

Proliferación de células A549 1.5h post-tratamiento

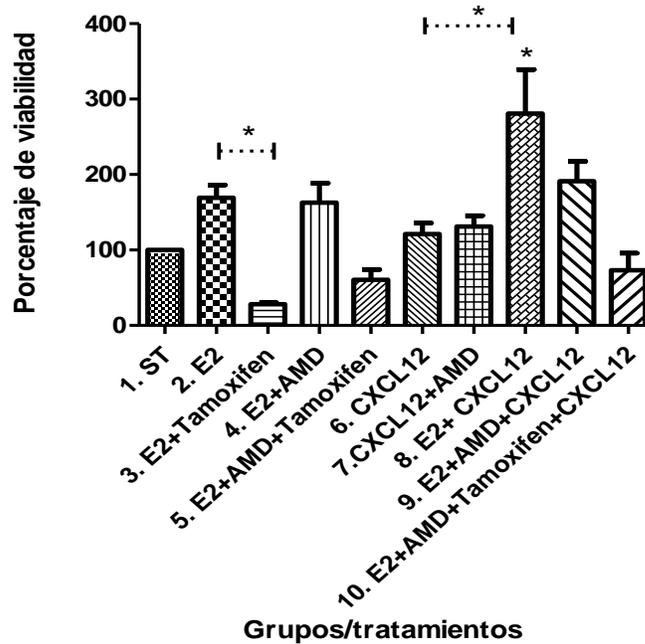


p<0.001

* Diferencia con respecto al control.

|.....| Diferencia entre grupos.

Proliferación de células A549 3h post-tratamiento



p<0.001

* Diferencia con respecto al control.

|.....| Diferencia entre grupos.

Figuras 12 y 13. Se muestran las gráficas de la línea celular A549 con el porcentaje de viabilidad celular para 1.5h y 3h respectivamente.

6.8 Evaluación de la proliferación celular de la línea A 549 a 6 horas.

A 6 horas después del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 14, Tabla 3).

De forma similar a la línea SK-LU1 y los tiempos anteriores en A549, los grupos tratados con tamoxifeno presentaron una menor viabilidad comprado con el control, específicamente el grupo tratado con E2+Tamoxifeno (3) con 57%, el grupo E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) con 73% y el grupo E2+Tamoxifeno + CXCL12+AMD3100 (10) con 93% (Figura 14, Tabla 3).

En contraste al grupo tratado con E2 (2) con una viabilidad de 255% y al grupo E2+CXCL12 (8) con una viabilidad del 268% (Figura 14, Tabla 3) que mostraron un incremento significativo en la proliferación celular de esta línea a 3 horas post tratamiento.

Por otro lado se mostró un decremento significativo entre el grupo tratado con E2 (2) y E2+Tamoxifeno (3) con un una viabilidad del 255% y 57% respectivamente (Figura 14, Tabla 3), demostrando el efecto inhibitor del tamoxifeno sobre el efecto proliferativo de los estrógenos.

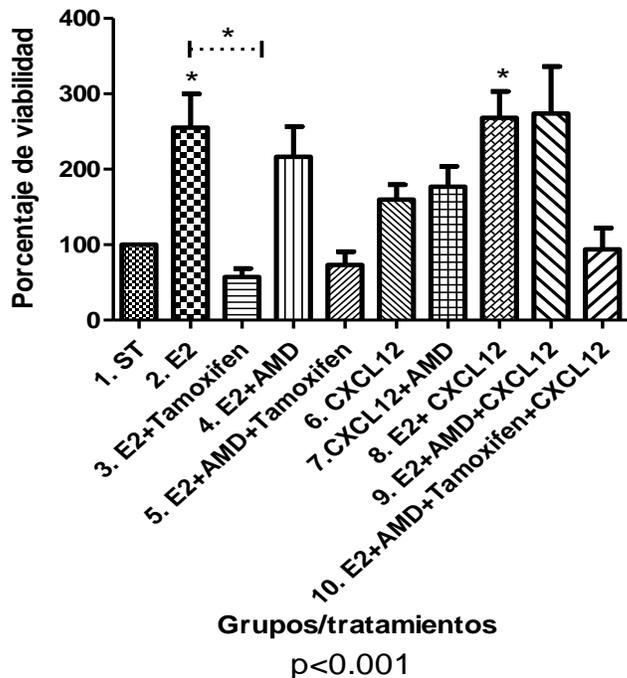
6.9 Evaluación de la proliferación celular de la línea A549 a 24 horas.

A 24 horas del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 15, Tabla 3).

Después de 24 horas los grupos tratados con tamoxifeno presentaron un decremento significativo en la viabilidad con respecto al control, el grupo tratado con E2+Tamoxifeno (3) presentó una de viabilidad del 26%, el grupo tratado con E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) presentó una viabilidad del 27% y el grupo E2+Tamoxifeno + CXCL12+ AMD3100 (10) de 26% (Figura 15, Tabla 3).

Se mostraron diferencias significativas entre el grupo con E2 (2) y el grupo con E2+Tamoxifeno (3) con una viabilidad del 104% y 26% respectivamente (Figura 15, Tabla 3).

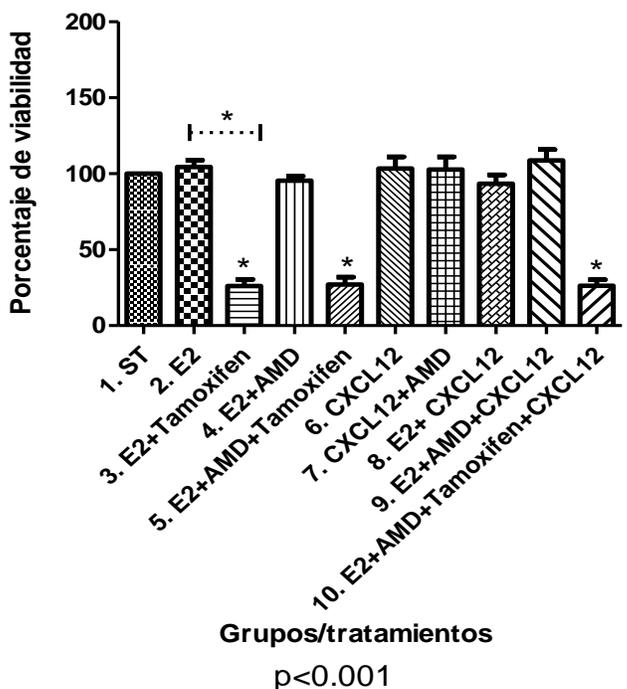
Proliferación de células A549 6h post-tratamiento



* Diferencia con respecto al control.

|.....| Diferencia entre grupos.

Proliferación de células A549 24h post-tratamiento



* Diferencia con respecto al control.

|.....| Diferencia entre grupos.

Figuras 14 y 15. Se muestran las gráficas de la línea celular A549 con el porcentaje de viabilidad celular para 6h y 24h respectivamente.

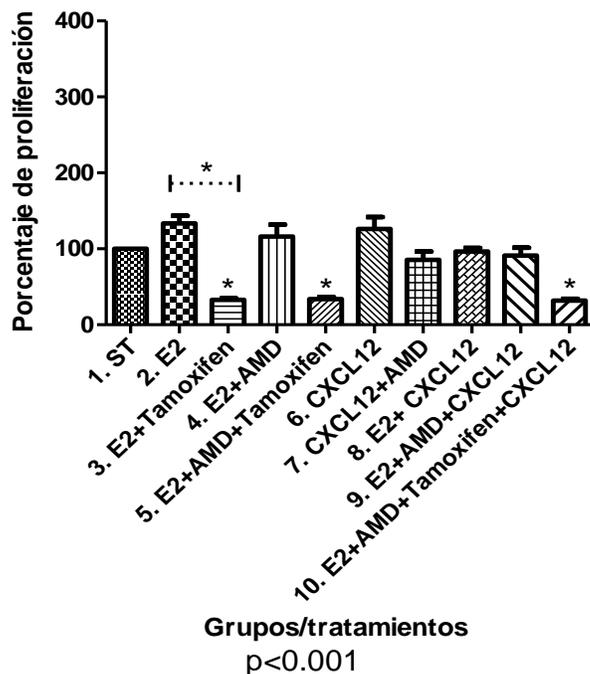
6.10 Evaluación de la proliferación celular de la línea A549 a 72 horas.

A 72 horas después del cultivo se consideró que el grupo control (Grupo 1) presentaba el 100% de viabilidad y fue tomado como basal para comparar el efecto que tuvieron los tratamientos (Figura 16, Tabla 3).

De manera similar a lo observado en ambas líneas a todos los tiempos, los grupos tratados con tamoxifeno muestran un decremento significativo en la viabilidad con respecto al control, específicamente el grupo E2+Tamoxifeno (3) mostró una viabilidad del 32%, el grupo E2+Tamoxifeno+AMD3100 (5) con 33% y el grupo E2+Tamoxifeno + CXCL12+ AMD3100 (10) con 31% (Figura 16, Tabla 3).

Entre el grupo tratado con E2 (2) y el grupo con E2+Tamoxifeno (3) se muestran diferencias significativas con una viabilidad del 133% y 32% respectivamente (Figura 16, Tabla 3), lo que nos demuestra el efecto inhibitor del tamoxifeno y que el efecto proliferativo observado en el grupo es debido a los estrógenos.

Proliferación de células A549 a 72h post-tratamiento



* Diferencia con respecto al control.

Figura 16. Se muestra la gráfica de la línea celular A549 con el porcentaje de viabilidad celular para 72h.

En resumen, los estrógenos incrementan la proliferación de las células A549 a 1.5, 3 y 6 y 72 horas después del tratamiento.

El efecto de los estrógenos sobre la proliferación de esta línea celular es confirmado por los grupos 3, 5 y 10 tratados con tamoxifeno, los cuales muestran un decremento significativo en la viabilidad comparado con el control y el grupo tratado con E2 (2).

Así mismo, a 1.5, 3 y 6 horas se mostró un incremento significativo en la proliferación del grupo E2+CXCL12 (8) con respecto al control y al grupo con CXCL12 (6) lo cual

nos indica que en células A549 a estos tiempos la combinación de E2+CXCL12 también tiene efecto positivo en la proliferación celular, un patrón similar a lo observado en la línea SK-LU1.

A pesar de que a tiempos cortos (1.5, 3 y 6 horas) se observó un incremento en la proliferación en el grupo E2+CXCL12 (8) cuando se comparó con el grupo E2 (2) no resultó significativo. Lo cual indica que los estrógenos en ésta línea pueden ser un factor más importante que la quimiocina en la proliferación celular.

A 24 y 72 horas después del tratamiento se observó una disminución general de la viabilidad en todos los grupos comparada con la viabilidad a 1.5, 3 y 6 horas después del tratamiento, otro patrón similar al observado en la línea SK-LU1. Es importante mencionar que en todos los tiempos se encontró un decremento en el porcentaje de viabilidad del grupo tratado con E2 y AMD3100 (4) con respecto al grupo tratado sólo con E2 (2) lo cual nos sugiere la relación de las vías ER/E2 y CXCL12/CXCR4 en la proliferación celular de ambas líneas celulares.

Nuestros resultados con ambas línea celulares muestran que la combinación de ambos factores E2 y CXCL12 favorecen la proliferación de manera importante a tiempos cortos. Así mismo observamos que las líneas presentan diferente sensibilidad a los tratamientos aunque se observan patrones similares en respuesta. Finalmente fue claro que los estrógenos presentaron un efecto predominante en la proliferación celular e incrementan la proliferación celular en un microambiente donde el eje CXCR4/CXCL12 está activo.

Tabla 3. Porcentajes de viabilidad celular para cada uno de los tratamientos a los diferentes tiempos en células A549.

Tratamientos en células A549	% viabilidad celular a 1.5h.	% viabilidad celular a 3h.	% viabilidad celular a 6h.	% viabilidad celular a 24h.	% viabilidad celular a 72 h.
1. Control	100	100	100	100	100
2. E2	187	169	255	104	133
3. E2+Tamoxifeno	26	28	57	26	32
4. E2+AMD3100	130	162	216	95	116
5.E2+Tamoxifeno +AMD3100	26	60	73	27	33
6. CXCL12	126	121	159	103	126
7. CXCL12+AMD3100	100	48	176	102	85
8. E2+CXCL12	214	280	268	93	96
9.E2+CXCL12 +AMD3100	173	191	273	108	91
10. E2+Tamoxifeno + CXCL12+AMD3100	29	73	93	26	31

7. Discusión.

La proliferación celular es un evento importante que mantiene la carcinogénesis (Hanahan y Weinberg, 2011). Recientemente se ha relacionado a los estrógenos con el cáncer pulmonar (Belani *et al.*, 2007; Chlebowski *et al.*, 2010; Hammoud, *et al.*, 2008; North y Christiani, 2013; Siegfried, 2001; Vavalà *et al.*, 2014) y se ha reportado que los estrógenos incrementan la proliferación celular tanto *in vivo* como *in vitro* en el ADC pulmonar (Bogush *et al.*, 2010; Caltagirone *et al.*, 1997; Hershberger *et al.*, 2010; Omoto *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2011). Sin embargo se sabe poco de los mecanismos por los cuales favorecen este evento. Se ha reportado que los E2 incrementan la expresión de CXCR4 (Burns, 2006) un receptor de CXCL12 que a su vez activa vías de proliferación (Beverly A. Teicher y Simon P. Fricker, 2010; X. Sun *et al.*, 2010), sin embargo la proliferación a través de esta vía no ha sido reportada previamente.

Nuestros resultados muestran que tanto el E2 como la quimiocina CXCL12 incrementan la proliferación de las células de ADC pulmonar y la adición de E2 a un microambiente CXCL12 esté presente puede tener un efecto mayor en la proliferación celular. Nuestros resultados mostraron que ambas vías están relacionadas y favorecen la proliferación del ADC pulmonar *in vitro*, lo cual podría ser un mecanismo por el cual el E2 favorezca la carcinogénesis pulmonar.

Sin embargo la proliferación inducida por E2 depende de la sensibilidad de cada línea celular ya que en la línea celular SK-LU-1 el incremento de la proliferación celular resultó significativo hasta las 72 horas después del tratamiento mientras que

el incremento de la proliferación celular en la línea A549 resultó significativo a 1.5 y 3 horas después del tratamiento.

El E2 ejerce su función biológica mediante la unión a sus receptores ER α y ER β (Marino *et al.*, 2006; Márquez-Garbán y Pietras, 2008). Además que en células de ADC pulmonar se ha reportado una mayor expresión de ER β (Bogush *et al.*, 2010; Hershberger *et al.*, 2010; Mah *et al.*, 2011; Miki, *et al.*, 2011b; Omoto *et al.*, 2001; Rodriguez-Lara *et al.*, 2014; Stabile *et al.*, 2002, 2011; Zhou *et al.*, 2002). Tanto la línea A549 como SK-LU-1 expresan éste receptor (Caltagirone *et al.*, 1997; Hershberger *et al.*, 2010; Ivanova, *et al.*, 2002; Niikawa *et al.*, 2008).

El receptor de estrógenos es una proteína nuclear con diferentes regiones que participan en la formación de dominios funcionales. El dominio N-terminal o también llamada región A/B participa directamente en la transcripción de genes, el dominio de unión a ADN (DBD) también llamada región C y la región D permiten la dimerización del receptor y la unión a la región de respuesta a estrógenos (ERE) en el ADN lo que también conlleva a la transcripción de genes. El dominio de unión al ligando, C-terminal o región E/F trabaja sinérgicamente con el dominio N-terminal en la regulación de transcripción de genes. A su vez ERs contiene dos regiones AF-1 y AF-2 llamadas funciones de activación (AFs) que son importantes para la actividad transcripcional mediante coactivadores (Marino *et al.*, 2006).

Tras la unión de E2 con el receptor éste puede actuar promoviendo la proliferación celular, mediante dos vías: 1) La vía genómica en donde ER es fosforilado, sufre un cambio conformacional que es seguido por la dimerización del receptor y la asociación del complejo E2/ER con ERE en el ADN lo que genera la transcripción

de distintos genes entre los que se encuentran bcl-2, caderina E, ciclina D1, VEGF y mediante coactivadores pueden activarse algunas vías como CREB, MAPK, ERK, PI3/AKT. 2) la vía no genómica en la cual el E2 presenta una respuesta rápida mediada por vías de señalización activadas tras la unión con el receptor entre las que se encuentran PLC/PK, C(PKC), Ras/Raf/MAPK, PI3k/AKT y cAMP/PK (Bogush *et al.*, 2010; Marino *et al.*, 2006; Márquez-Garbán y Pietras, 2008).

Otro mecanismo por el cual el E2 incrementa la proliferación es mediante la interacción con otras vías es el caso de la interacción con IGF-1, EGF que tras activarse por E2 incrementan la actividad de vías de señalización como ERK en el caso de IGF-1 y MAPK con EGF (Marino *et al.*, 2006; Márquez-Garbán y Pietras, 2008).

Se ha reportado específicamente en células de ADC que niveles endógenos de E2 son suficientes para generar ambas respuestas; genómicas y no genómicas en esta última específicamente tras la activación de MAPK y que éstas son suficientes para promover la proliferación celular y por lo tanto la carcinogénesis en el ADC pulmonar (Hershberger *et al.*, 2010).

Así mismo, se ha reportado que la adición de fármacos antiestrogénicos como fulvestran y tamoxifeno disminuyen la proliferación celular de ADC pulmonar *in vitro* (Bogush *et al.*, 2010; Caltagirone *et al.*, 1997; Mah *et al.*, 2011; Niikawa *et al.*, 2008; Stabile y Siegfried, 2004; Stabile *et al.*, 2002). Nosotros utilizamos tamoxifeno, los grupos tratados con este fármaco nos permitieron corroborar la actividad del E2 en las células, ya que observamos que en los grupos tratados con tamixifeno en ambas líneas celulares, la supervivencia celular y por lo tanto la proliferación fue

drásticamente disminuida en todos los tiempos (Tablas 2 y 3, Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16).

Estos resultados nos sugieren la dependencia de las células derivadas de ADC pulmonar a la vía estrogénica. Este dato también es confirmado por otros autores (Bogush *et al.*, 2010; Niikawa *et al.*, 2008).

El tamoxifeno es capaz de bloquear la vía estrogénica al actuar como un antagonista del receptor de estrógenos. Su acción se inicia tras la unión del fármaco al receptor, el efecto antiestrogénico se lleva a cabo a través de la inhibición de la actividad del factor de transcripción TAF-1 como TAF-2 impidiendo así la transcripción de genes (Barrón-González, Arias-Martínez, y Castro-Romero, 2001).

Las recientes evidencias sugieren que el cáncer pulmonar, específicamente el ADC pulmonar es un cáncer hormono-dependiente. Sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos por los cuales los E2 favorecen la carcinogénesis en pulmón.

Rodríguez Lara y colaboradores (2014) reportaron mediante un análisis de inmunohistoquímica que en muestras de pacientes con ADC pulmonar el ER β , CXCL12 y CXCR4 se encuentran sobrepresados sobre todo en muestras de mujeres premenopáusicas y en un estudio *in vitro* del mismo laboratorio se reportó que el E2 estimula la expresión de CXCR4 (Rodríguez-Lara, *et al.*, 2014) .

Estos datos sugieren una relación entre estas las ER/E2 y CXCR4/CXCL12. Se ha sugerido que el E2 podría ser capaz de estimular la expresión de CXCR4 mediante la vía genómica como se ha propuesto en el cáncer de mama y a su vez esta proteína contribuir en la proliferación celular mediante la unión a su único ligando

CXCL12 (Rodriguez-Lara 2014), sin embargo estos datos no habían sido investigados en el cáncer pulmonar. Nuestros datos sugieren una relación de las vías E2/ER y CXCR4/CXCL12 que resulta en la proliferación celular.

CXCL12, también conocido como (SDF-1), es una quimiocina homeostática que se expresa tanto en tejido embrionario como en el adulto. Está implicada en la proliferación y diferenciación de células embrionarias y en organismos adultos. CXCL12 desempeña un papel importante en diferentes procesos fisiopatológicos: como el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, la supervivencia y el tráfico de células del sistema inmune, Actualmente se sabe que este eje favorece además la carcinogénesis pulmonar (Pozzobon, Goldoni, Viola, y Molon, 2016; Wald *et al.*, 2013).

La estimulación de la expresión de CXCR4 por el E2 (Rodriguez-Lara *et al.*, 2014), así como la secreción paracrina o autocrina de CXCL12 y la subsecuente activación de esta vía que resulta en la proliferación celular podría ser otro mecanismo por el cual los estrógenos favorezcan la progresión tumoral y una de las posibles causas del mal pronóstico observado en las mujeres premenopáusicas con ADC pulmonar. Nuestros resultados muestran que la activación de ambas vías de señalización separadas inducen la proliferación y juntas incrementan este proceso con respecto al control aunque no siempre con respecto a las vías separadas.

Además observamos que el efecto de los estrógenos es importante y puede incrementar la proliferación dada por CXCL12, ya que en el grupo tratado con CXCL12 más E2 se observó un efecto mayor en la proliferación celular al

encontrado sólo con CXCL12 pero no mayor al observado en el grupo tratado con E2 y este efecto fue diferente dependiendo de la línea celular.

Como se mencionó anteriormente, el E2 puede estimular la expresión de CXCR4 a través de la vía genómica ya que se ha reportado que la expresión de CXCR4, en células malignas, es regulada por VEGF (Burns, 2006) el cuál es estimulado por E2 (Márquez-Garbán y Pietras, 2008).

CXCL12/CXCR4 a su vez puede inducir la proliferación mediante distintas vías. Cuando CXCL12 se une a CXCR4, un receptor transmembranal acoplado a proteína G, favorece la dimerización de dicha proteína en tres subunidades, G α , G β y G γ (Beverly A. Teicher y Simon P. Fricker, 2010; X. Sun *et al.*, 2010) lo que permite la activación de múltiples vías de señalización. Se ha demostrado que CXCL12 es capaz de activar, mediante una rápida fosforilación la vía de señalización mediada por MAPK /ERK1 la cuál es fundamental para la proliferación celular (Zhou *et al.*, 2002). También se favorece la formación de PI3/AKT que además de incrementar la proliferación celular favorece la resistencia a apoptosis (Wagner *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2002).

En nuestros resultados, aunque observamos proliferación en células de ADC pulmonar mediante la activación del eje CXCL12 y CXCR4 esta no fue significativa con respecto al control a los tiempos analizados y al añadir AMD3100 (Plerixafor) tampoco encontramos un efecto antagónico. Es probable que se requiera mayor tiempo para estimular la proliferación de éstas células a través de esta vía de señalización.

Aunque ambas líneas tuvieron un comportamiento diferente, en ambas se observó la fuerte influencia que tienen los estrógenos en la proliferación, incluso podría ser mayor a la que observó cuando fueron estimuladas con CXCL12. Fue interesante que en la línea A549 la proliferación en el grupo tratado con CXCL12 +E2 fue mayor a la observada en el grupo solo tratado con CXCL12 pero no mayor a la observada en el grupo tratado solo con E2.

Estos resultados sugieren que la activación del eje CXCL12/CXCR4 podría ser inducido por E2 en células de ADC pulmonar y tener un efecto aditivo en la proliferación de estas células, lo cual podría explicar el peor pronóstico observado en el desarrollo del ADC pulmonar de pacientes jóvenes y especialmente mujeres premenopáusicas, ya que al tener mayores concentraciones de E2 se favorece el efecto aditivo de CXCL12/CXCR4 y estrógenos. Sin embargo es necesario realizar este estudio en más líneas celulares.

Es probable que estas dos vías se relacionen y que E2 induzca la proliferación por las vías antes mencionadas además de favorecer la expresión de CXCR4 favoreciendo mediante otras vías la proliferación celular, aunque como lo observamos en este estudio este efecto dependerá de la sensibilidad de las células que compongan el tumor.

8. Conclusiones.

Nuestros resultados muestran que el eje CXCL12/CXCR4 y la vía estrogénica son importantes para la supervivencia y proliferación de las células de ADC pulmonar.

Es probable que ambas vías CXCL12/CXCR4 y E2/ER estén relacionadas y que participen en conjunto para incrementar la proliferación celular. Este podría ser un mecanismo por el cual el E2 contribuya a la carcinogénesis pulmonar.

El efecto de los E2 en la proliferación celular y su relación con la vía CXCR4/CXCL12 es diferente en cada línea celular por lo cual es necesario realizar estudios en más líneas celulares.

Nuestros resultados apoyan la participación del E2 en el ADC pulmonar y sugieren que el tamoxifeno, un fármaco que en la actualidad es utilizado para tratar el cáncer de mama, podría resultar efectivo para reducir la proliferación celular en el ADC pulmonar por lo que podría tener buenos resultados en el tratamiento del CP, sin embargo se requieren más estudios.

9. Perspectivas.

Debido al escaso conocimiento sobre la participación de las hormonas en el cáncer pulmonar y la diferente susceptibilidad celular sería interesante estudiar su efecto en más líneas celulares.

Ya que el receptor CXCR7 también contribuye a la señalización celular y depende de CXCL12 sería interesante investigar su papel en la carcinogénesis pulmonar y si existe alguna relación con los estrógenos.

Aunque E2 es la hormona con mayor presencia y con un mayor efecto biológico no debe descartarse estudiar el efecto de otros tipos de hormonas en líneas celulares de ADC pulmonar.

10 Bibliografía.

1. Balkwill, F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in Cancer Biology*. 14(3): 171–179.
2. Barbieri, F., Bajetto, A., Stumm, R., Pattarozzi, A., Porcile, C., Zona, G. y Florio, T. (2008). Overexpression of Stromal Cell-Derived Factor 1 and Its Receptor CXCR4 Induces Autocrine/Paracrine Cell Proliferation in Human Pituitary Adenomas. *Clinical Cancer Research*. 14(16): 5022–5032.
3. Barrón-González, A., Arias-Martínez, J., y Castro-Romero, I. (2001). Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud Pública de México*. 43(6): 577–584.
4. Belani, C. P., Marts, S., Schiller, J., y Socinski, M. A. (2007). Women and lung cancer: Epidemiology, tumor biology, and emerging trends in clinical research. *Lung Cancer*. 55(1): 15–23.
5. Beverly, A. T. y Simon, P. Fricker. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*. 16(11): 2927–2931.
6. Bogush, T. A., Dudko, E. A., Beme, A. A., Bogush, E. A., Kim, A. I., Polotsky, B. E. y Davydov, M. I. (2010). Estrogen receptors, antiestrogens, and non-small cell lung cancer. *Biochemistry (Moscow)*. 75(12): 1421–1427.
7. Brambilla, E., y Gazdar, A. (2009). Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *European Respiratory Journal*. 33(6): 1485–1497.

8. Bruce, N., Perez-Padilla, R., y Albalak, R. (2000). Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bull. World Health Organ.* 78(9): 1078–1092.
9. Burns, J. M. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *Journal of Experimental Medicine.* 203(9): 2201–2213.
10. Caltagirone, S., Ranelletti, F. O., Rinelli, A., Maggiano, N., Colasante, A., Musiani, P., Aiello, F. B. y Piantelli, M. (1997). Interaction with Type II Estrogen Binding Sites and Antiproliferative Activity of Tamoxifen and Quercetin in Human Non-Small-Cell Lung Cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology.* 17(1): 51–59.
11. Chlebowski, R. T., Schwartz, A. G., Wakelee, H., Anderson, G. L., Stefanick, M. L., Manson, J. E., Rodabough, J. R., Chien, J. W., Wactawski-Wende, J., Gass, M., Kotchen, J. M., Jhonson, K. C., O'Sullivan, M. J., Ockene, J. K., Chen, C. y Allan, F. H. (2010). Estrogen Plus Progestin and Lung Cancer in Postmenopausal Women. *Lancet. Author Manuscript.* 374(9697): 1243–1251.
12. Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. y Matthay, R. A. (2011a). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine.* 32(4): 605–644.
13. Delgado J., Martinez, L. M., Sánchez, T. T., Ramirez, A., Iturria, C y González-Avila, G. (2005). Lung cancer pathogenesis associated with wood smoke exposure. *Chest.* 128(1): 124–131.

14. Domanska, U. M., Kruizinga, R. C., Nagengast, W. B., Timmer-Bosscha, H., Huls, G., De Vries, E. G. E., y Walenkamp, A. M. E. (2013). A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide. *European Journal of Cancer*. 49(1): 219–230.
15. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin DM., Forman D, Bray F. (2012). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 1; 136(5): E359-86.
16. Fricker, S. P., Anastassov, V., Cox, J., Darkes, M. C., Grujic, O., Idzan, S. R., Labrecque, J., Lau, G., Mosi, M. R., Nelson, K. L., Qin, L., Santucci, Z. y Wong, R. S. Y. (2006). Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: A specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochemical Pharmacology*. 72(5): 588–596.
17. Hammoud, Z., Tan, B., Badve, S., y Bigsby, R. M. (2008). Estrogen promotes tumor progression in a genetically defined mouse model of lung adenocarcinoma. *Endocrine-Related Cancer*. 15(2): 475–483.
18. Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144(5): 646–674.
19. Hershberger, P. A., Stabile, L. P., Kanterewicz, B., Rothstein, M. E., Gubish, C. T., Land, S., Shuai, Y., Siegfried, J. M. y Nichols, M. (2009). Estrogen receptor beta (ER β) subtype-specific ligands increase transcription, p44/p42 mitogen activated protein kinase (MAPK) activation and growth in human non-small cell lung cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 116(1-2): 102–109.

20. Ivanova, M. M., Mazhawidza, W., Dougherty, S. M. y Klinge, C. M. (2010). Sex differences in estrogen receptor subcellular location and activity in lung adenocarcinoma cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 42(3): 320–330.
21. Kim, S. Y., Lee, C. H., Midura, B. V., Yeung, C., Mendoza, A., Hong, S. H. Ren, L., Wong, D., Korz, W., Merzouk, A., Salari, H., Zhang, H., Hwang, T. S., Khanna, C., y Helman, L. J. (2008). Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clinical y Experimental Metastasis*. 25(3): 201–211.
22. Lee, Y. L., Kuo, W. H., Lin, C. W., Chen, W., Cheng, W. E., Chen, S. C. y Shih, C. M. (2011). Association of genetic polymorphisms of CXCL12/SDF1 gene and its receptor, CXCR4, to the susceptibility and prognosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 73(2): 147–152.
23. Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y.-W. y Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer*. 1856(2): 189–210.
24. Liu, N. S., Spitz, M. R., Kemp, B. L., Cooksley, C., Fossella, F. V, Lee, J. S. y Khuri, F. R. (2000). Adenocarcinoma of the lung in young patients. *Cancer*. 88(8): 1837–1841.
25. Mah, V., Marquez, D., Alavi, M., Maresh, E. L., Zhang, L., Yoon, N., Horvath, S., Bagryanova, L., Fishbein, M. C., Chia, D., Pietras, R. y Goodglick, L. (2011). Lung Cancer Expression levels of estrogen receptor beta in conjunction with aromatase predict survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 74(2): 318–325.

26. Marino, M., Galluzzo, P. y Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current Genomics*. 7: 497–508.
27. Márquez-Garbán, D. C., y Pietras, R. J. (2008). Estrogen-signaling pathways in lung cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 617: 281–289.
28. Miao, Z., Luker, K. E., Summers, B. C., Berahovich, R., Bhojani, M. S., Rehemtulla, A., Kleer, C. G., Essner, J. J., Nasevicius, A., Luker, G. D., Howard, M. C. y Schall, T. J. (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(40): 15735–40.
29. Miki, Y., Abe, K., Suzuki, S., Suzuki, T. y Sasano, H. (2011a). Suppression of estrogen actions in human lung cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 340(2): 168–174.
30. Mollerup, S., Jørgensen, K., Berge, G. y Haugen, A. (2002). Expression of estrogen receptors [alpha] and [beta] in human lung tissue and cell lines. *Lung Cancer*. 37(2): 153–159.
31. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1-2): 55–63.
32. Nagasawa, T. (2014). CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *Journal of Molecular Medicine*. 92(5): 433–439.
33. Niikawa, H., Suzuki, T., Miki, Y., Suzuki, S., Nagasaki, S., Akahira, J., Honma S., Evans, D. B., Haayashi, S., Kondo, T. y Sasano, H. (2008). Intratumoral

- Estrogens and Estrogen Receptors in Human Non- Small Cell Lung Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 14(14): 4417–4426.
34. North, C. M. y Christiani, D. C. (2013). Women and Lung Cancer: What is New? *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 25(2): 87–94.
35. Omoto, Y., Kobayashi, Y., Nishida, K., Tsuchiya, E., Eguchi, H., Nakagawa, K., Ishikawa, Y., Yamori, T., Iwase, H., Fujii, Y., Warner, M., Gustafsson, A. y Hayashi, S. I. (2001). Expression, function, and clinical implications of the estrogen receptor beta in human lung cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 285(2): 340–347.
36. Paulus, J. K., Zhou, W., Kraft, P., Johnson, B. E., Lin, X. y Christiani, D. C. (2011). Haplotypes of estrogen receptor-beta and risk of non-small cell lung cancer in women. *Lung Cancer*. 71(3): 258–263.
37. Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S. y Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 21(48): 7435–7451.
38. Pinto, M. C. X., Kihara, A. H., Goulart, V. A. M., Tonelli, F. M. P., Gomes, K. N., Ulrich, H. y Resende, R. R. (2015). Calcium signaling and cell proliferation. *Cellular Signalling*. 27(11): 2139–2149.
39. Powell, H. A., Iyen-Omofoman, B., Hubbard, R. B., Baldwin, D. R. y Tata, L. J. (2013). The association between smoking quantity and lung cancer in meand women. *Chest*. 143(1): 123–129.
40. Pozzobon, T., Goldoni, G., Viola, A. y Molon, B. (2016). CXCR4 signaling in health and disease. *Immunology Letters*. 177: 6–15.

41. Rodríguez, V. (2014). Influencia del sexo, el estadio hormonal y los estrógenos en la expresión del eje CXCR4/CXCL12 en el adenocarcinoma pulmonar. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
42. Rodríguez-Lara, V., Peña-Mirabal, E., Baez-Saldaña, R., Esparza-Silva, A. L., García-Zepeda, E., Carbon Cervantes, M. A., Diaz, D. y Fortoul, T. I. (2014). Estrogen receptor beta and CXCR4/CXCL12 expression: Differences by sex and hormonal status in lung adenocarcinoma. *Archives of Medical Research*. 45(2): 158–169.
43. Siegfried, J. M. M. (2001). Women and lung cancer: does oestrogen play a role?, *The Lancet Oncology*. 2(8): 506–513.
44. Slatore, C. G., Chien, J. W., Au, D. H., Satia, J. A. y White, E. (2010). Lung cancer and hormone replacement therapy: Association in the vitamins and lifestyle study. *Journal of Clinical Oncology*. 28(9): 1540–1546.
45. Spano, J. P., Andre, F., Morat, L., Sabatier, L., Besse, B., Combadiere, C., Deterre, P., Martin, A., Azornis, J., Valeyres, D., Khayat, D., Chevalier, T. L. y Soria, J. C. (2004). Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: Pattern of expression and correlation with outcome. *Annals of Oncology*. 15(4): 613–617.
46. Stabile, L. P., Dacic, S., Land, S. R., Lenzner, D. E., Dhir, R., Acquafondata, M. y Siegfried, J. M. (2011). Combined analysis of estrogen receptor ? and progesterone receptor expression identifies lung cancer patients with poor outcome. *Clinical Cancer Research*. 17(1): 154–164.
47. Stabile, L. P., Davis, A. L. G., Gubish, C. T., Hopkins, T. M., Luketich, J. D., Christie, N., Finkelstein, S. y Siegfried, J. M. (2002). Human Non-Small Cell

- Lung Tumors and Cells Derived from Normal Lung Express Both Estrogen Receptor α and β and Show Biological Responses to Estrogen. *Cancer Research*. 62: 2141-2150.
48. Stabile, L. P., y Siegfried, J. M. (2004). Estrogen receptor pathways in lung cancer. *Current Oncology Reports*. 6(4): 259–67.
49. Su, L. (2005). Differential Expression of CXCR4 Is Associated with the Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 11(23): 8273–8280.
50. Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Russell, S. T., Kenneth, J. P. y Wang, J. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 29(4): 709–722.
51. Sun, Y., Mao, X., Fan, C., Liu, C., Guo, A., Guan, S., Jin, Q., Li, B., Yao, F. y Jin, F. (2014). CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumor Biology*. 35(8): 7765–7773.
52. Tam, A., Morrish, D., Wadsworth, S., Dorscheid, D., Man, S. F. P. y Sin, D. D. (2011). The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Women's Health*. 11(1): 24.
53. Tauler, J. y Mulshine, J. L. (2009). Lung cancer and inflammation: interaction of chemokines and hnRNPs. *Current Opinion in Pharmacology*. 9(4): 384–388.
54. Thulasitha, W. S., Umasuthan, N., Whang, I., Lim, B.-S., Jung, H.-B., Noh, J. K. y Lee, J. (2015). A CXC chemokine gene, CXCL12, from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*: Molecular characterization and transcriptional profile. *Fish y Shellfish Immunology*. 45(2): 560–566.

55. Uemae, Y., Ishikawa, E., Osuka, S., Matsuda, M., Sakamoto, N., Takano, S., Nakai, K., Yamamoto, T. y Matsumura, A. (2014). CXCL12 secreted from glioma stem cells regulates their proliferation. *Journal of Neuro-Oncology*. 117(1): 43–51.
56. Vavalà, T., Giaj Levra, M. y Novello, S. (2014). Lung cancer in never smokers: a different disease. *Current Respiratory Care Reports*. 3(1): 26–34.
57. Wagner, P. L., Hyjek, E., Vazquez, M. F., Meherally, D., Liu, Y. F., Chadwick, P. A., Rengifo, T., Sica, G. L., Port, J. L., Lee, P. C., Subroto, P., Altorki, N. K. y Saqi, A. (2009). CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: Association with metastasis and survival. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 137(3): 615–621.
58. Wald, O., Izhar, U., Amir, G., Kirshberg, S., Shlomai, Z., Zamir, G., Peled, A. y Shapira, O. M. (2011). Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: Role in non-small cell lung cancer tumor proliferation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 141(6): 1503–1512.
59. Wald, O., Shapira, O. M. y Izhar, U. (2013). CXCR4/CXCL12 Axis in Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Pathologic Roles and Therapeutic Potential. *Theranostics*. 3(1): 26–33.
60. Zhao, G., Zhao, S., Wang, T., Zhang, S., Lu, K., Yu, L. y Hou, Y. (2011). Estrogen receptor β signaling regulates the progression of Chinese non-small cell lung cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 124(1-2): 47–57.

61. Zhou, Y., Larsen, P. H., Hao, C. y Yong, V. W. (2002). CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *Journal of Biological Chemistry*. 277(51): 49481–49487.
62. Zlotnik, A., Yoshie, O. y Nomiya, H. (2006). The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biology*. 7(12): 243.