



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Papel de la progesterona en la migración e invasión de células derivadas de un
astrocitoma humano grado IV y en la activación de cofilina

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Ana Gabriela Piña Medina

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Angélica Zepeda Rivera, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D.F. julio, 2015



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.

Agradecimientos

Esta tesis se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el apoyo económico del proyecto de PAPIIT IN201414.

La supervisión técnica de este trabajo fue realizada por la Dra. Aliesha Araceli González Arenas del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y por la M. en C. Valeria Hansberg Pastor del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por la Dra. Rocío Salceda Sacanelles y la Dra. Angélica Zepeda Rivera.

Este trabajo fue presentado en el Congreso Neuroscience 2014, Washington DC gracias al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Índice

1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	3
3. Introducción.....	5
4. Antecedentes.....	6
4.1. Tumores cerebrales	6
4.1.1. Los astrocitomas.....	7
4.2. Migración e invasión celulares.....	10
4.3. El citoesqueleto.....	14
4.3.1. Los filamentos de actina.....	15
4.4. El citoesqueleto en los procesos de migración e invasión.....	16
4.5. El papel de las hormonas sexuales en la movilidad celular.....	20
4.6. La progesterona.....	21
4.6.1. Mecanismos de acción de la progesterona.....	23
4.7. Estructura y función del receptor a progesterona.....	25
4.8. Antagonistas de la progesterona.....	27
4.8.1. Características del RU486.....	28
4.9. Efectos de la progesterona en líneas celulares de astrocitomas.....	30
5. Planteamiento del problema.....	30
6. Hipótesis.....	31
7. Objetivos.....	31
7.1. Objetivo general.....	31
7.2. Objetivos particulares.....	31
8. Metodología.....	32
8.1. Cultivos celular.....	32
8.2. Tratamientos hormonales.....	32

8.3. Ensayo de migración	33
8.4. Ensayo de invasión.....	34
8.5. Western Blot	35
9. Resultados.....	36
10. Discusión.....	40
11. Conclusión.....	44
12. Referencias.....	45

1. Abreviaturas

ABP	Proteínas de unión a actina
ADF	Factor despolimerizante de actina
Arp2/3	Proteínas relacionadas con actina
CDK4	Cinasa 4 dependiente de ciclina
DRSP	Drospiredona
EGF	Factor del crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ECM	Matriz extracelular
ERP	Elemento de respuesta a progesterona
F-actina	Actina filamentosa
FAK	Cinasas de adhesión focal
G-actina	Actina globular monomérica
GEFs	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
IGF1	Factor de crecimiento insulínico
INK4	Inhibidor de la cinasa 4 dependiente de ciclina
LIMK	Cinasa con dominios LIM
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular
MPA	Acetato de medroxiprogesterona
NES	Nestorona
P ₄	Progesterona
p53	Proteína tumoral p53
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PI45K	Fosfatidilinositol 4,5 cinasa
PIPs	Fosfoinosítidos
PKC	Proteína cinasa C
RB	Gen del retinoblastoma
RP	Receptor a progesterona

RU486	Mifepristona, antagonista del receptor a progesterona
SNC	Sistema Nervioso Central
TESK	Cinasa específica de testículo
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WASP	Proteína del síndrome de Wiscott-Aldrich

2. Resumen

Los astrocitomas son tumores cerebrales derivados de astrocitos o de células troncales cancerosas que constituyen las neoplasias cerebrales primarias más comunes y agresivas en el ser humano y representan el 45% de todos los tumores del sistema nervioso central. La capacidad invasiva de estos tumores en parte ha sido atribuida a procesos de desregulación de la motilidad celular dependientes de la dinámica del citoesqueleto que involucra a proteínas de unión a actina (ABP) como cofilina, la cual se encuentra sobre-expresada en los astrocitomas. La progesterona (P_4) es un regulador de la morfología celular y organización tisular y se ha observado que induce la migración e invasión de líneas celulares derivadas de cáncer de mama y de células endoteliales en modelos *in vitro*. Además existe evidencia de que estos procesos se llevan a cabo mediante la regulación del citoesqueleto de actina. Sin embargo, el efecto de la P_4 en la migración, invasión y remodelación del citoesqueleto para la formación de estructuras de movimiento como los filopodia y lamelipodia de astrocitomas no se conoce. Por lo anterior, en este proyecto se evaluó en células D54, derivadas de un astrocitoma humano del mayor grado de malignidad, el efecto de la P_4 en la migración mediante el ensayo de "Scratch-wound", la invasión con la técnica de "Transwell" así como el contenido y fosforilación de cofilina mediante "western blot". Nuestros resultados mostraron que la P_4 (10 nM) aumentó significativamente el número de células que migran desde las 3 hasta las 48 horas. El RU486, antagonista del receptor a progesterona (RP), bloqueó significativamente los efectos de la P_4 en todos los tiempos de estudio. Adicionalmente se observó que a las 3 horas el tratamiento con RU486 disminuyó significativamente el número de células que migran en comparación con el tratamiento con vehículo. Con el ensayo de Transwell se encontró que la P_4 a las 24 horas aumentó significativamente el número de células invasivas (células capaces de atravesar una mezcla de proteínas semejantes a las que componen la matriz extracelular) en comparación con los demás tratamientos. Similar a lo que se observó en el ensayo de migración, el RU486 bloqueó el efecto invasivo producido por la P_4 . Finalmente, mediante Western Blot se observó que a los 15 minutos la P_4 aumentó tanto el contenido como la fosforilación de cofilina. La forma desfosforilada de cofilina aumentó a los 30 minutos y disminuyó a los 60 minutos con los tratamientos de P_4 , RU486 y P_4 + RU486. Este resultado nos sugiere que tanto la P_4 , como el RU486 son capaces de modificar la actividad de cofilina y que el efecto podría ser independiente del RP. Todos estos datos apuntan a que la P_4 , a través de su receptor intracelular aumenta la migración e invasión de células derivadas de un

astrocitoma humano de grado IV y que la activación de cofilina, una proteína asociada a actina involucrada en la dinámica de polimerización de los filamentos de actina puede ser regulada por la P_4 independientemente de la interacción con su receptor.

3. Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades resultado de un proceso descontrolado en la división celular y del cese de los mecanismos de muerte celular. A nivel mundial, este padecimiento es el responsable de un número importante de muertes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló que en el 2012 se reportaron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, y que se prevé que el número de nuevos casos aumente aproximadamente un 70% en los próximos 20 años (OMS, 2015). En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (SSA, 2013).

Los astrocitomas son los tumores cerebrales más invasivos que se conocen. Su crecimiento agresivo e infiltrante hacia el tejido cerebral sano adyacente, conduce a una tasa de recurrencia muy alta en un corto periodo de tiempo, incluso después de la resección quirúrgica radical. El tiempo medio de supervivencia después del diagnóstico inicial de un paciente con astrocitoma grado IV es de alrededor de 12 a 18 meses (Louis et al., 2007).

La migración e invasión celulares requieren de la formación de estructuras tales como los filopodia y lamelipodia, los cuales a su vez se forman por el ensamblaje de los monómeros de actina, el cual está regulado por los factores de nucleación. Existe una gran variedad de nucleadores de actina en las células humanas, tales como las proteínas Arp2/3 y las forminas. Además de proteínas de unión a actina como la cofilina, que interactúa activamente con los filamentos de actina induciendo la formación de extremos (+) para iniciar la polimerización (DesMarais et al., 2005). Se ha observado que los procesos de migración e invasión de las células cancerosas están relacionados tanto con los factores de nucleación, como con la dinámica de proteínas de unión a actina (Yahara et al., 1996; Tsukita et al., 1997; van Rheenen et al., 2009; Nürnberg et al., 2011; Hua et al., 2012), así como con la activación de proteasas, las cuales se encargan de la degradación de los elementos de la matriz extracelular (ECM) (Mentlein et al., 2012).

Hasta el momento, se ha encontrado que la progesterona (P_4) es un regulador de la morfología celular y de la organización de los tejidos tanto en el desarrollo como en el adulto y por lo tanto, que es capaz

de inducir la migración e invasión en diversas líneas celulares de cáncer mama y de células endoteliales (Fu et al., 2008b; Fu et al., 2010; Zheng et al., 2012). También existe evidencia que indica que estos procesos se llevan a cabo a través de la regulación del citoesqueleto de actina. Sin embargo, se desconoce el efecto de la P_4 en la migración e invasión de células de astrocitomas.

Una mejor comprensión del papel de la P_4 en los mecanismos de la motilidad celular y en la regulación del citoesqueleto puede permitir el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que reduzcan la infiltración de células tumorales y aumenten la supervivencia del paciente.

4. Antecedentes

4.1. Tumores cerebrales

Aunque en México no se tienen datos estadísticos al respecto, se sabe que la incidencia anual de tumores cerebrales primarios a nivel mundial es de aproximadamente siete por cada 100 mil individuos (Furnari et al., 2007; Xie, 2009), de los cuales los gliomas representan el 70% (Schwartzbaum et al., 2006). Los gliomas son tumores neuroectodérmicos que tienen características de células gliales. Existen diferentes teorías que buscan explicar el origen de estos tumores, una de ellas plantea que existe una ventana de vulnerabilidad neoplásica en la cual ocurren los eventos oncogénicos en las células fetales en proliferación (Louis et al., 2007). En esta teoría, los tumores gliales son más comunes y surgen a una edad más avanzada, debido a que la proliferación glial ocurre en un periodo más largo durante la gestación y la vida postnatal (Louis et al., 2007). Recientemente se ha sugerido que los tumores gliales surgen de células troncales neuroectodérmicas. Estas células se encuentran en el adulto y tienen una alta capacidad de proliferar, diferenciarse y migrar, por lo que son candidatos potenciales a ser progenitores de tumores gliales (Alcántara Llaguno et al., 2009). También se plantea que existen células gliales con alteraciones genéticas previas, provenientes de distintas regiones del cerebro que poseen una mayor susceptibilidad a cambios genéticos que, sumados con el microambiente y las señales de células no neoplásicas, pueden favorecer el desarrollo de gliomas (Chen y Gutmann, 2014). Finalmente, existen reportes de modelos de gliomagénesis que sugieren que células troncales nerviosas, astrocitos o incluso neuronas pueden sufrir

desdiferenciación en respuesta a cambios genéticos inducidos con un sistema lentiviral mediante shRNAs para los genes NF1 y p53 y que estos cambios son suficientes para iniciar la formación de estos tumores, lo cual explicaría la heterogeneidad característica de los gliomas (Friedmann-Morvinski et al., 2012).

4.1.1. Los Astrocitomas

Los gliomas son los tumores más comunes en el Sistema Nervioso Central (SNC), y su tratamiento es uno de los mayores retos oncológicos, ya que a pesar de los avances en la terapia, estos tumores permanecen asociados con una elevada morbilidad y mortalidad (Burnet et al., 2005). Esto exige una mejor comprensión de la patogenicidad y etiología tanto a nivel celular como molecular para diseñar tratamientos terapéuticos novedosos y eficaces.

Con base en sus características histológicas y en la expresión de marcadores asociados al linaje celular, los gliomas pueden clasificarse como astrocitomas, que representan el 60-70%, oligodendrogliomas que se observan en un 10-30% o como ependimomas que son menos del 10% de los gliomas (Giannini et al., 2001; Kros et al., 2007). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los astrocitomas en una escala del I al IV de acuerdo con su creciente grado de malignidad (Louis et al., 2007).

Los astrocitomas de grado I o astrocitomas pilocíticos comprenden 5-6% de todos los gliomas, son más comunes en niños y adultos jóvenes, en los que la mayoría se localizan en el cerebelo, el hipotálamo, nervio y quiasma ópticos, tálamo, ganglios basales y tallo cerebral (Louis et al., 2007; Murakami et al., 2008). Son tumores bien diferenciados y con bajo potencial proliferativo. En cuanto a la histología, se observa una variación mínima en la forma y tamaño de los núcleos y hay tiene un buen pronóstico después de la resección quirúrgica. En la mayoría de los casos donde el tumor ha sido extraído total o parcialmente la sobrevida, del paciente es de 11 a 15 años (Tihan y Bloomer, 2010).

Los astrocitomas de grado II o astrocitomas difusos representan el 10-15% de todos los tumores astrocíticos, tienen un pico de incidencia en adultos de entre 30 y 40 años, muestran un predominio en varones. Se presentan comúnmente en la corteza, seguidos por el tallo cerebral y la médula

espinal. Son generalmente infiltrantes, por lo que es imposible que sean operados, presentan células multinucleadas con actividad proliferativa baja y los bordes son poco definidos. La supervivencia de los pacientes es de 5 a 10 años y estos tumores tienden a avanzar a grados más altos de malignidad (Arko et al., 2010). Los astrocitomas de grados I y II se denominan de bajo grado aunque algunos muestran una rápida evolución clínica. Los astrocitomas de alto grado incluyen a los grados III y IV, son los más comúnmente diagnosticados, son más agresivos y la metástasis fuera del SNC es extremadamente rara (Louis et al., 2007).

Los astrocitomas de grado III o astrocitomas anaplásicos conforman el 25-30% de los astrocitomas, están localizados preferencialmente en los hemisferios cerebrales y usualmente afectan a adultos de entre 40 y 60 años de edad. Los astrocitomas anaplásicos pueden surgir a partir de un astrocitoma difuso o manifestarse *de novo* sin la presencia de un tumor precursor. Estos astrocitomas tienden a progresar a glioblastoma. Se caracterizan por presentar atipia nuclear, alta actividad mitótica y lesiones difusamente infiltrantes. La supervivencia es de 2 a 3 años y generalmente está determinada por el tiempo requerido para la progresión a un tumor de grado IV. Las terapias tanto para los astrocitomas de grado II como para los de grado III son la quimio y/o la radioterapia (Arko et al., 2010; Tihan y Bloomer, 2010).

Los astrocitomas de grado IV o glioblastomas representan el 60-75% de los tumores astrocíticos, afectan predominantemente a adultos con una incidencia máxima entre los 45 y 75 años de edad y se producen con mayor frecuencia en la sustancia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales, ganglios basales y el tálamo (Louis et al., 2007; Scheithauer et al., 2008). Se pueden generar a partir de un astrocitoma difuso o anaplásico, sin embargo, lo más frecuente es que aparezcan *de novo*. Presentan características más avanzadas de cáncer, incluyendo la proliferación celular descontrolada, mayor infiltración hacia otras áreas del cerebro, propensión a la necrosis, angiogénesis, resistencia a la apoptosis e inestabilidad genómica. Estos tumores pueden estar compuestos de células de diversa morfología. Algunos de estos tipos celulares se observan con morfología de tipo estrellado, mientras que otras tienen morfología de células menos diferenciadas, es decir, pequeñas y redondeadas (Hadjipanayis y Van Meir, 2009). Son tumores más resistentes a la quimio y/o radio terapia y son letales en un lapso de 12 meses, por lo que constituyen el tipo de glioma más agresivo (Brandes et al., 2008).

El tratamiento dado a los pacientes que presentan astrocitomas depende del grado de evolución del tumor, de su tamaño, localización, tasa de crecimiento y síntomas. Las terapias para tratar este tipo de tumores incluyen como, ya se había mencionado anteriormente, desde su extirpación por cirugía, hasta la radiación y la quimioterapia. A pesar de los avances en estas terapias, no siempre se aumenta la tasa de supervivencia de los pacientes y además se comprometen muchas funciones cerebrales (Camacho-Arroyo, 2003; De la Fuente et al., 2007), por lo que los astrocitomas siguen siendo de los tumores más letales.

En los astrocitomas humanos se han descrito una variedad de mutaciones que afectan normalmente a aquellos genes que participan en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis, como el gen de la cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4) y el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (INK4A), así como el gen del retinoblastoma (RB) y de la proteína tumoral 53 (p53). También se encuentra alterada la expresión de genes como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que favorece la angiogénesis y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que promueve la división celular (Ichimura et al., 2004; Hernández-Hernández et al., 2012). En la mayoría de los astrocitomas de grado IV se han identificado anomalías cromosómicas como son la presencia de una o más copias del cromosoma 7, pérdida del cromosoma 10, así como deleciones y translocaciones del cromosoma 9. También se han detectado en menor grado pérdidas del cromosoma 22 y deleciones en los cromosomas 1 y 7 (Bigner et al., 1990).

Su frecuente recurrencia se debe principalmente a la resistencia que presentan ante las diferentes terapias. Para explicar su reincidencia se han planteado dos hipótesis: a) evolución clonal (Nowell, 1976) y la b) células troncales cancerosas (Dick, 2008). La primera sugiere que debido a la inestabilidad de los tumores, surgen subpoblaciones de células con diferentes mutaciones que son seleccionadas por el microambiente generado por el propio tumor durante la progresión del cáncer y/o por los tratamientos. La segunda hipótesis, la de las células troncales cancerosas, propone que en los tumores hay células troncales capaces de propagarse, de sostener el crecimiento prolongado del tumor o de iniciar la formación de uno nuevo. Estas células tienen una mayor resistencia al daño al DNA y son muy eficientes exportando moléculas dañinas como las drogas, por lo que son difíciles de eliminar con terapias convencionales que atacan células altamente proliferativas. La hipótesis de las

células troncales cancerosas ha llamado la atención dado que puede llevar a buscar nuevas estrategias terapéuticas (Dietrich et al., 2008; Xie, 2009), para ello se requiere del estudio de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la formación de dichos tumores. Una terapia alternativa podría ser aquella basada en antagonistas de receptores a hormonas esteroides, como la progesterona (P_4), por lo que es indispensable conocer sus mecanismos de acción (Cabrera-Muñoz et al., 2009; Hansberg-Pastor et al., 2013).

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de los gliomas de alta malignidad la media de supervivencia no supera los 15 meses. Se ha observado que después de la resección quirúrgica los tumores reaparecen predominantemente en un radio cercano a 1 centímetro dentro de la cavidad de resección. Esto se debe principalmente al hecho de que en el momento de la cirugía las células de la masa tumoral ya han invadido el tejido cerebral sano (Demuth y Berens, 2004). Matsukado en un trabajo demostró que más del 50% de los tumores cerebrales no tratados alcanzaron el hemisferio contralateral (Matsukado et al., 1961). Los gliomas infiltrantes siguen siendo un problema particularmente difícil en cuanto al manejo clínico. En los últimos 20 años no se ha logrado algún aumento significativo en la supervivencia de estos pacientes. Incluso los fármacos que inhiben metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) u otros objetivos relacionados con la angiogénesis no solo no aumentan la supervivencia, sino que aumentan la invasividad (Lamszus et al., 2003; Tonn y Goldbrunner, 2003), por lo que resulta fundamental ahondar en los mecanismos involucrados durante la migración e invasión de los gliomas.

Para que una célula tumoral pueda invadir, se requiere que desarrolle un borde frontal de avance. La actina es necesaria para el desarrollo de estructuras de protrusión conocidas como lamelipodia, filopodia e invadopodia. La migración de células tumorales es el resultado directo de un complejo equilibrio entre las señales extracelulares e intracelulares que conducen a la regulación dinámica del citoesqueleto de actina y adhesiones asociadas (Nagai et al., 2011).

4.2. Migración e invasión celulares

La invasión de las células tumorales al tejido normal es un proceso multi-factorial que consiste en la interacción de las células con la ECM, de los contactos entre las células adyacentes, así como de los

procesos bioquímicos que se desencadenan en las células en movimiento. Es bien sabido que la motilidad celular no es una característica *de novo* exclusiva de los procesos de carcinogénesis. Diferentes tipos celulares exhiben movimiento activo durante varias etapas del desarrollo embrionario, la cicatrización, y en el curso de las respuestas inmunes. Los procesos involucrados en la movilidad celular se controlan de una manera muy rigurosa, lo que sugiere la reaparición de un fenotipo móvil en las células cancerosas como resultado de la pérdida o el cese de los mecanismos de control (Graham et al., 1994).

Para migrar, las células necesitan modificar su forma y rigidez para interactuar con las estructuras circundantes. La ECM proporciona el sustrato, así como una barrera para la célula en movimiento. La migración e invasión celulares resultan de un ciclo continuo de etapas interdependientes (Abercrombie et al., 1977; Lauffenburger y Horwitz, 1996; Friedl y Brocker, 2000). Se considera que para que esto ocurra se necesita de cinco eventos (**Figura 1**).

1. *La protrusión del citoplasma en el borde frontal de avance.* La polimerización de actina controla la protrusión de la célula en el paradigma actual de la motilidad celular (Pollard y Borisy, 2003). La actina se polimeriza mediante el acoplamiento al complejo de nucleación Arp2/3 que se une a la proteína del síndrome de Wiscott-Aldrich (WASP), una proteína adaptadora multifuncional. El complejo Arp2/3-WASP se une a la membrana plasmática a través de fosfoinosítidos (PIPs) (Rohatgi et al., 1999). Arp2/3 interactúa con los filamentos de actina e induce su ramificación (Blanchoin et al., 2000). Los PIPs también se unen y activan factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) que regulan la actividad de las pequeñas GTPasas RAC, Cdc42 y Rho, así como RAS (Kaibuchi et al., 1999). Quimiocinas y receptores a factores de crecimiento activan a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y a la fosfatidilinositol 4,5-cinasa (PI45K), que son las principales enzimas que generan los PIPs y posteriormente activan (Ren et al., 1996; Leopoldt et al., 1998; Kaibuchi, 1999; Tsutsumi et al., 2002).
2. *Interacción con la ECM y formación de contactos focales.* Las integrinas entran en contacto con ligandos de la ECM (Miyamoto et al., 1995; Zamir y Geiger, 2001). Grupos de integrinas reclutan proteínas adaptadoras y de señalización a través de sus dominios intracelulares,

induciendo señales de fosforilación y desfosforilación (Miyamoto et al., 1995; Hynes, 2002). El dominio citoplásmico de las integrinas interactúa con talina, cinasa de adhesión focal (FAK) y otras proteínas como tensina (Miyamoto et al., 1995; Calderwood et al., 2000; Zamir y Geiger, 2001; Degani et al., 2002). Todas ellas pueden unirse a proteínas adaptadoras a través de sus dominios SH2 o SH3 o dominios ricos en prolina y reclutar proteínas de unión a actina (vinculina, paxilina, moesina y α -actinina), así como moléculas reguladoras (PI3K y la familia Rho GTPasas) a los contactos focales (Miyamoto et al., 1995; Zamir y Geiger, 2001; Degani et al., 2002). La formación de contactos focales está inducida por diversas vías de señalización, tales como PI3K, la proteína cinasa C (PKC) y Rho GTPasas (Ilic et al., 1995; Schwartz y Shattil, 2000; Degani et al., 2002; Hynes, 2002).

3. *Reclutamiento de proteasas y proteólisis focalizada de los contactos con la ECM.* Las proteasas escinden componentes de ECM, tales como colágena, fibronectina, laminina, pro-metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP), y así producen MMP solubles activas, tales como MMP2 (Ohuchi et al., 1997; Sameni et al., 2001; Friedl y Wolf, 2003a). La MMP1 y otras colagenasas degradan colágena, junto con otras macromoléculas de ECM, en fragmentos más pequeños, los cuales, a su vez, se vuelven accesibles para subsecuente degradación por metaloproteinasas (MMP2 y MMP9) o proteasas de serina (Ohuchi et al., 1997; Deryugina et al., 1998; Tam et al., 2002).
4. *Contracción celular por actomiosina.* La miosina II se une a los filamentos de actina (complejo que se denomina actomiosina) y genera la contracción celular (Verkhovsky et al., 1995; Cramer, 1999; Katoh et al., 2001). El complejo Ca^{2+} calmodulina (CaM) activa a la cinasa de cadena ligera de la miosina (MLCK), fosforila la cadena ligera de la miosina (MLC) y así activa a la miosina. Esto es contrarrestado por desfosforilación mediante la fosfatasa MLC (MLCptasa) (Kamm y Stull, 2001). RHO regula la contracción de actomiosina predominantemente a través de su efector, ROCK, que fosforila e inhibe a la MLCptasa (Fukata et al., 2001; Katoh et al., 2001).
5. *Separación de la parte posterior de la célula.* La disociación de los contactos focales en la parte posterior de la célula se produce a través de varios mecanismos. Proteínas de unión a actina

como gelsolina y cofilina inducen la ruptura del filamento (Wear et al., 2000). Proteasas citoplasmáticas como calpaína escinden los componentes de los contactos focales (talina y la porción citoplasmática de las integrinas) (Potter et al., 1998; Pfaff et al., 1999). También la cinasa de adhesión focal (FAK) produce la disociación de los contactos focales aunque los mecanismos aún no se conocen (Ilic et al., 1995; Zeng et al., 2003). Los contactos focales se debilitan aún más mediante escisión proteolítica de los receptores de adhesión y con la acumulación de fragmentos de colágena que se generan mientras la célula se mueve hacia adelante (Carragher et al., 1999). Después del contacto focal, las integrinas se desprenden de la ECM y se internalizan a través de vesículas endocíticas y se reciclan en el borde frontal de avance de la célula o se depositan sobre la ECM (Regen y Horwitz, 1992; Bretscher, 1996; Friedl et al., 1997).

En este proceso de 5 etapas participan más de 125 proteínas y entre ellas están componentes del citoesqueleto (Deakin y Turner, 2008).

Múltiples factores medioambientales pueden promover, dirigir y regular la motilidad de las células tumorales y contribuir a la invasión. Quimiocinas y factores de crecimiento inducen y mantienen la motilidad a través de señales pro-migratorias que activan vías de transducción de señales en las que participan PI3K, RAC y Rho. Las proteasas de ECM generan fragmentos quimiotácticos así como péptidos pro-migratorios (Giannelli et al., 1997; Seftor et al., 2001). Muchos de estos factores promotores de la migración tales como el EGF también promueven otras funciones como la proliferación celular y la supervivencia. Otros como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1) alternativamente parecen activar preferentemente la migración celular (Brooks et al., 1997).

Observaciones realizadas en modelos *in vitro* o *in vivo* han mostrado que las células tumorales infiltran el tejido adyacente con diversos patrones. Las células pueden diseminarse individualmente en lo que se conoce como “migración individual” o expandirse como hebras sólidas de células, en estructuras laminares o en agrupaciones a lo que se denomina “migración colectiva” (Friedl y Wolf, 2003b). En muchos tumores ocurren ambos tipos de migración simultáneamente. Se cree que entre más desdiferenciadas se encuentren las células tumorales, es más probable que el tumor se disperse a través de células individuales (Thiery, 2002).

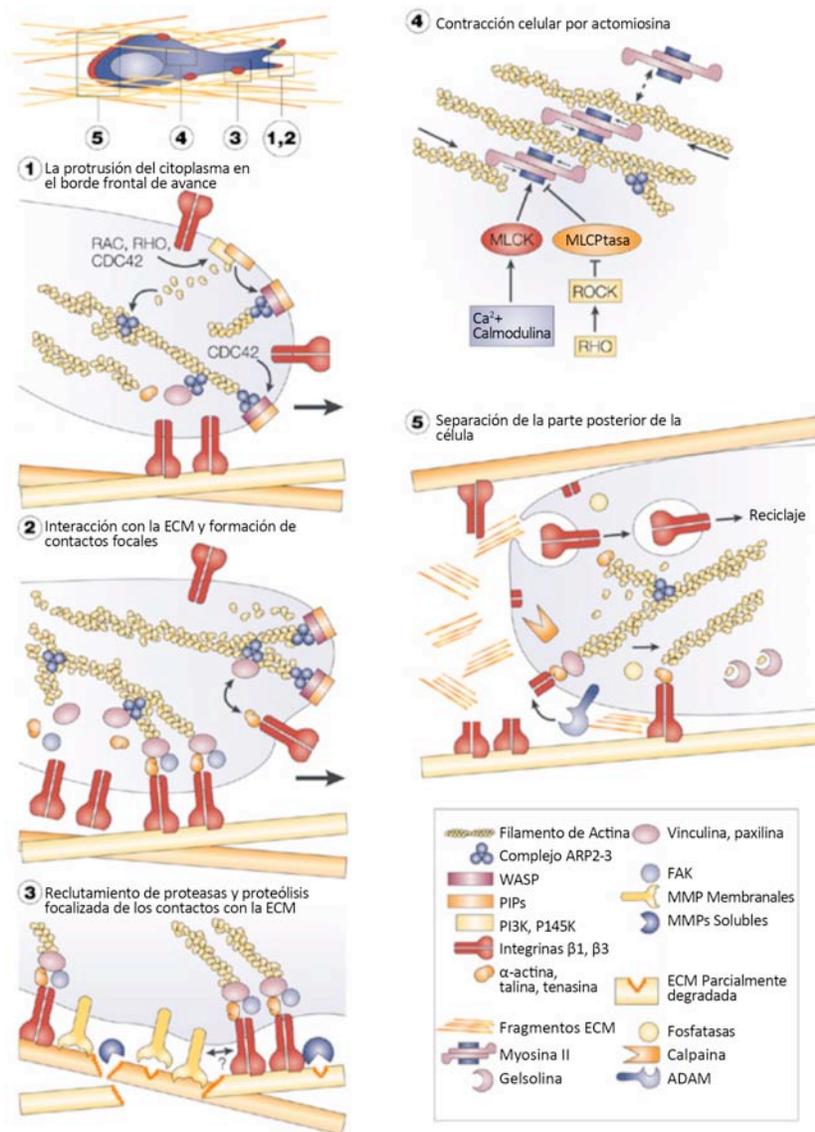


Figura 1. Modelo de cinco etapas de migración-invasión celular. (1) La protrusión del citoplasma en el borde frontal de avance, (2) Interacción con la ECM y formación de contactos focales, (3) Reclutamiento de proteasas y proteólisis focalizada de los contactos con la ECM, (4) Contracción celular por actomiosina y (5) Separación de la parte posterior de la célula. Referirse al texto para la explicación de cada uno de los pasos. Esquema tomado y modificado de (Friedl y Wolf, 2003b).

4.3. El Citoesqueleto

La capacidad de las células de adoptar una gran variedad de formas y de llevar a cabo movimientos direccionados y coordinados depende del citoesqueleto, que es una estructura dinámica que se reorganiza continuamente mientras la célula cambia de forma, se mueve, se divide, etc., en respuesta a los cambios de su entorno (Alberts et al., 2008).

Las diversas funciones del citoesqueleto dependen de tres tipos de filamentos proteicos, los microtúbulos, los filamentos intermedios y los filamentos de actina. Cada tipo de filamento está formado por una proteína distinta, tubulina para los microtúbulos. En el caso de los filamentos intermedios la proteína depende del tejido celular del que se trate, por ejemplo, proteína fibrilar acídica glial (GFAP) en las células gliales o desmina en las células musculares, y la actina que compone a los microfilamentos (Alberts et al., 2008) **(Figura 2)**.



Figura 2. Componentes del citoesqueleto. Esquema tomado y modificado de (Alberts et al., 2008).

4.3.1. Los Filamentos de Actina

La actina es una proteína altamente conservada y es la más abundante en la célula, constituye aproximadamente el 5% de la proteína celular total. Cada molécula de actina es un polipéptido de 373 aminoácidos de longitud y con un peso de 42 kDa. La actina participa en muchos procesos celulares importantes, incluyendo la contracción muscular, la división y la citocinesis, el transporte de vesículas y organelos, procesos de señalización celular, el establecimiento y mantenimiento de las uniones celulares y de la forma de la célula, así como en el movimiento (Alberts et al., 2008; Doherty y McMahon, 2008) **(Figura 3)**.

Existen tres isoformas de actina que se clasifican dependiendo de su punto isoeléctrico, la α -actina que se encuentra en diversos tipos de músculo y es el mayor constituyente del aparato contráctil de la célula, mientras que las β -actina y γ -actina coexisten en muchos tipos de células no musculares y son los mediadores de la motilidad celular (Alberts et al., 2008).

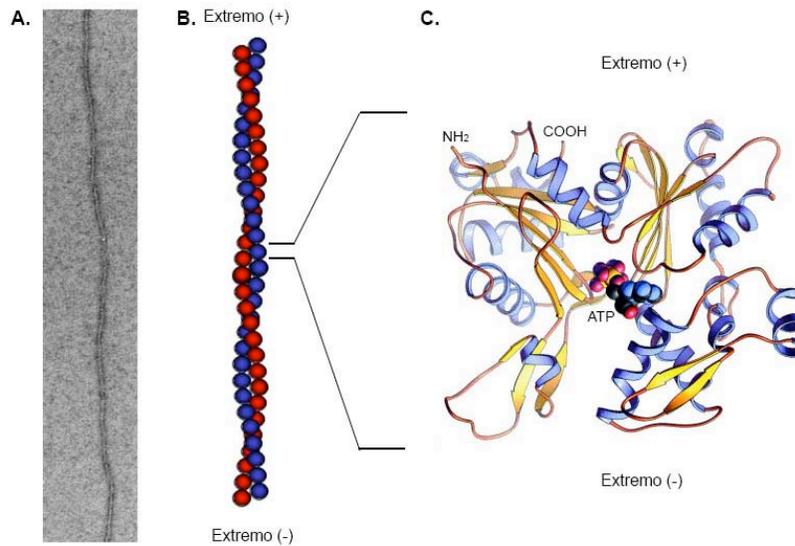


Figura 3. Estructura de la actina. (A) Microfotografía de filamentos de actina. (B) Disposición helicoidal de las moléculas de actina en un filamento. (C) Estructura tridimensional de actina donde se observa que una molécula de ATP se encuentra estrechamente asociada en una fisura entre los dos dominios de la proteína. Esquema tomado y modificado de (Alberts et al., 2008).

4.4. El Citoesqueleto en los procesos de migración e invasión

Como se mencionó anteriormente, los lamelipodia y filopodia se componen de filamentos de actina. Estas estructuras se forman a partir de la polimerización de actina globular monomérica (G-actina) en dobles filamentos helicoidales. La actina filamentosa (F-actina) está estructural y cinéticamente polarizada, presentando un extremo de crecimiento más rápido, el extremo (+) y uno de crecimiento más lento, el extremo (-). Una vez que un monómero de G-actina es incorporado en el extremo (+), el ATP del monómero se hidroliza. Después de la hidrólisis del fosfato inorgánico, la molécula de actina-ADP forma parte del filamento, finalmente, en el extremo (-) se disocia otra molécula de actina-ADP. Los monómeros de actina-ADP disociados posteriormente se vuelven a cargar con ATP y se transportan hacia el extremo (+) para que continúe el proceso de polimerización. La adición de G-actina se produce preferentemente en el extremo (+) y la disociación de moléculas que contienen ADP en el extremo (-). Bajo condiciones de estado estacionario, cuando la concentración de monómero se encuentra entre las concentraciones críticas de los dos extremos, el número de moléculas de actina añadidas en los extremos de crecimiento rápido equilibra el número de moléculas que se disocian de los extremos (-), lo que resulta en un equilibrio dinámico llamado “treadmilling” o intercambio rotatorio (Wegner, 1976) (**Figura 4**).

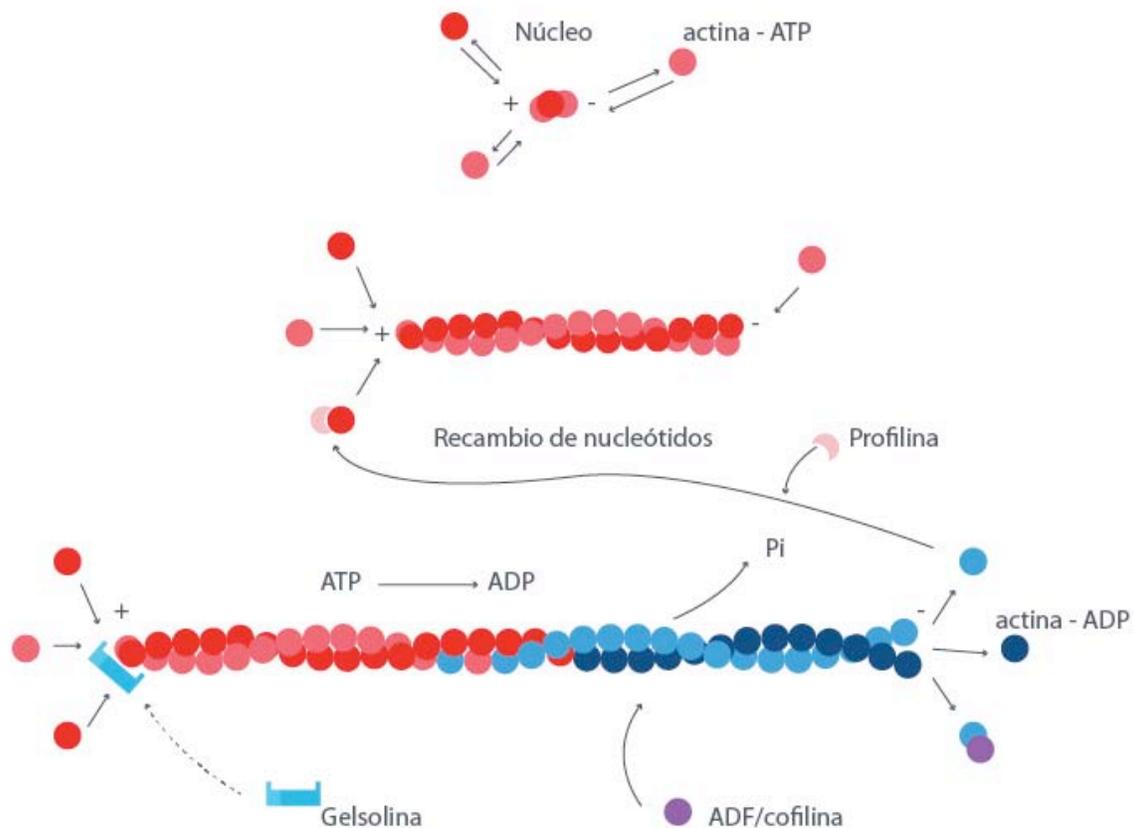


Figura 4. Dinámica de la polimerización de los filamentos de actina. Una vez que el núcleo de actina se ha formado, la asociación de monómeros procede rápidamente, con un extremo, designado como el extremo (+), el cual crece mucho más rápido que el otro, el extremo (-). La hidrólisis de ATP y la disociación de fosfato desestabiliza el filamento haciéndolo más susceptible a la acción de proteínas tales como ADF/cofilina. La ADP-actina se somete a intercambio de nucleótidos, que está facilitado por la profilina. La profilina une actina monomérica y controla la polimerización mediante la interacción con forminas. Proteínas de recubrimiento, tales como la gelsolina, pueden asociarse con el extremo (+) creciente e inhibir el alargamiento del filamento. Esquema tomado y modificado de (Nürnberg et al., 2011).

La incorporación de nuevas subunidades de actina en el extremo (+) proporcionan la fuerza mecánica para la generación del borde frontal de avance en las células que migran. Por lo tanto, la dinámica de actina debe estar estrechamente controlada y regulada *in vivo* (Pollard y Cooper, 2009). Existen proteínas que se pueden asociar con el extremo (+) como la gelsolina impidiendo así la elongación del filamento, o con el extremo (-) como los miembros de la familia del factor despolimerizante de actina y cofilina (ADF/cofilina) induciendo la despolimerización (Dos Remedios et al., 2003; Le Clainche y Carlier, 2008).

El inicio de la migración celular requiere de la polimerización de actina a partir de extremos (+). En respuesta a la estimulación por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la célula empieza a polimerizar filamentos de actina cerca de la membrana plasmática produciendo el borde frontal de avance (Mogilner y Oster 2003; DesMarais et al., 2005). Existen múltiples mecanismos a través de los cuales la célula inicia la polimerización de los filamentos de actina, uno de ellos es a partir de filamentos pre-existentes como en el mecanismo de corte inducido por la cofilina, el cual produce extremos (+) (DesMarais et al., 2005), otro es la nucleación por el complejo Arp2/3 (de las siglas en inglés de Actin-related proteins) y otro es por proteínas de la familia de las forminas que inducen la nucleación *de novo* (Higgs, 2005). Aumentar el número de extremos (+) en una ubicación específica dentro de una célula sirve no solo para iniciar la formación de estructuras de protrusión, sino también para definir la ubicación del borde frontal de avance (Ghosh et al., 2004).

La cofilina es una proteína de 166 aminoácidos y con un peso de 19 kDa que pertenece a la familia ADF/cofilina. La cofilina participa en la dinámica de los filamentos de actina principalmente por unión a F-actina y corte del filamento, lo que produce un incremento en el número de extremos (+) que promueve la polimerización o despolimerización dependiendo de la concentración local de G-actina y de otras proteínas asociadas a actina (ABP) como el complejo Arp2/3 (Ichetovkin et al., 2002).

Muchos estudios han demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* que la cofilina puede ser regulada por varios mecanismos (Arber et al., 1998; van Rheenen et al., 2009), uno de ellos es a través de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación que modula su capacidad para interactuar tanto con G-actina, como con F-actina (Oser y Condeelis, 2009; van Rheenen et al., 2009). Las Rho GTPasas regulan positivamente a LIM cinasas (LIMK) y a TES cinasas (TESK1 y TSK2) que fosforilan a la cofilina en el residuo de Ser-3 (p-cofilina) lo que impide que se una a la actina, es decir, la inactivan impidiendo la formación de extremos (+) y por lo tanto la polimerización de los filamentos de actina y así también de estructuras de movimiento (Moriyama et al., 1996; Arber et al., 1998). Las fosfatasa como Slingshot (SSH) y cronofina activan a la cofilina a través de su desfosforilación permitiéndole interactuar con los filamentos de actina e induciendo la formación de extremos (+) necesarios para la formación del borde frontal de avance de la célula en movimiento (Nagata-Ohashi et al., 2004; Gohla et al., 2005). Así, la cofilina está regulada dinámicamente por ciclos de fosforilación, de tal manera

que las concentraciones locales de cinasas y fosfatasa determinan el balance general de su actividad (Figura 5).

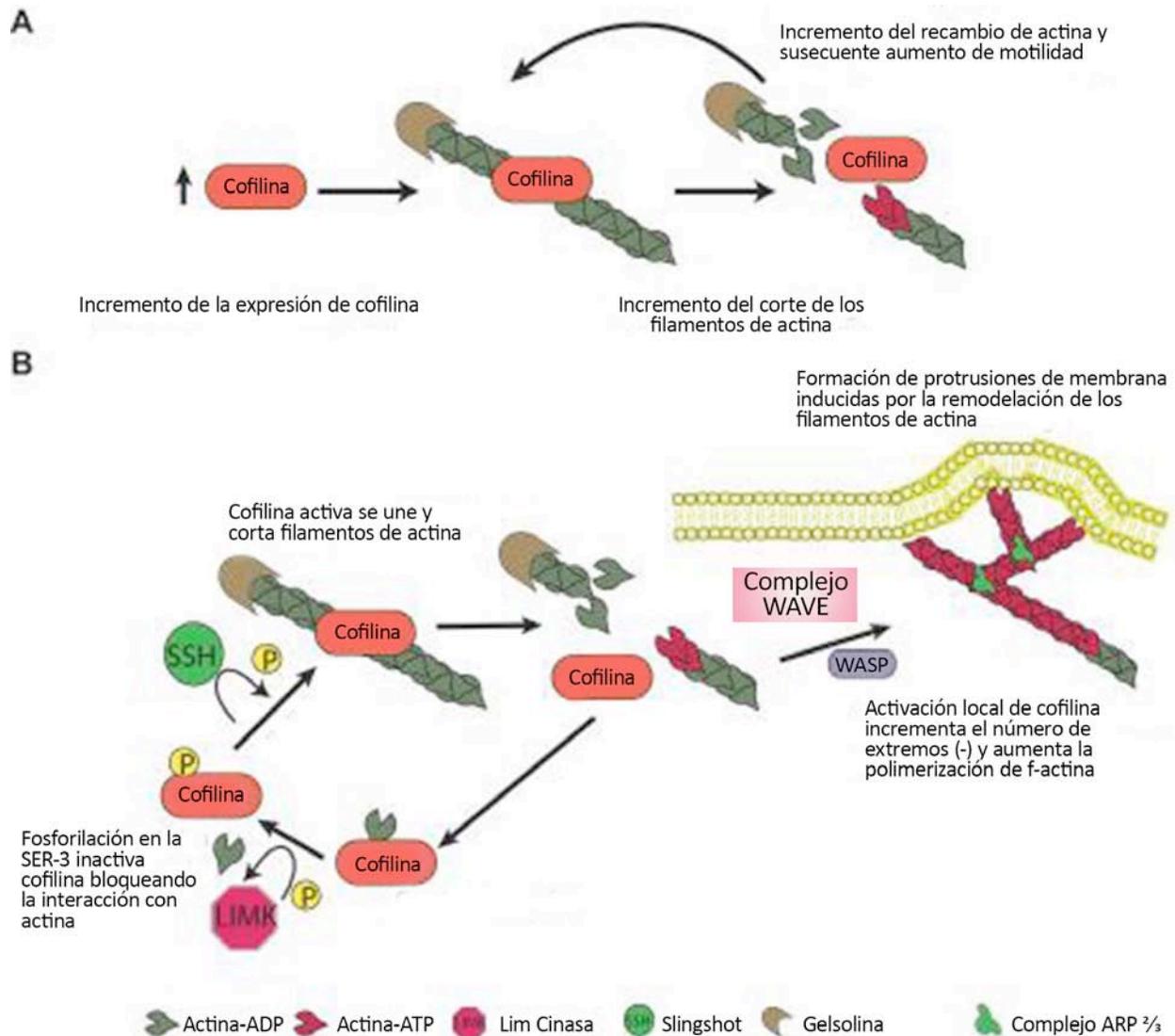


Figura 5. Esquema de la función de la cofilina en la célula. (A) El incremento localizado de la actividad de cofilina incrementa el corte de F-actina y despolimerización, que se traduce en un aumento de G-actina, mayor dinámica de los filamentos y por lo tanto mayor motilidad celular. (B) Modelo de regulación de activación de cofilina mediante ciclos de fosforilación-desfosforilación. Figura tomada y modificada de (Nagai et al., 2011).

Adicionalmente, la cofilina ha sido implicada en la invasión tumoral y la metástasis de diferentes tipos de tumores (Martoglio et al., 2000; Unwin et al., 2003; Turhani et al., 2006). Yap y colaboradores estudiaron el papel de la cofilina en la motilidad de astrocitomas. En su estudio, ellos sobre-expresaron la cofilina en la línea celular U373, y encontraron que esta sobre-expresión aumenta la

motilidad celular (Yap et al., 2005). Nagai y colaboradores analizando microarreglos de tejido de astrocitomas encontraron que el aumento en la expresión de la cofilina correlaciona de manera positiva con el grado de malignidad en líneas celulares derivadas de astrocitomas (Nagai et al., 2011).

4.5. El papel de las hormonas sexuales en la movilidad celular

El movimiento celular es un proceso molecular altamente integrado que desempeña un papel central en una amplia variedad de fenómenos biológicos, lo que representa un aspecto clave de muchos procesos fisiológicos y patológicos (Lauffenburger y Horwitz, 1996). En la embriogénesis, la migración celular es un fenómeno recurrente en los eventos morfogénicos importantes en el desarrollo del SNC (Hua y Smith, 2004). La motilidad celular también es importante en el organismo adulto, tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas. Por ejemplo, en el movimiento celular que se requiere en los procesos inflamatorios, donde los leucocitos o linfocitos migran hacia los tejidos (Egger et al., 1994). También en la cicatrización de heridas se necesita el movimiento de los fibroblastos y de células endoteliales vasculares para lograr la reparación de tejidos. La angiogénesis requiere también del movimiento de las células vasculares. Asimismo, se ha observado que el movimiento celular es la base para la invasión local del cáncer y la metástasis a distancia, que representan la principal razón de la morbilidad y la mortalidad por tumores malignos (Kedrin et al., 2007).

Se ha informado que los esteroides sexuales naturales como la P_4 y el estradiol (E_2) o sintéticos como el acetato de medroxiprogesterona (MPA), la drospiredona (DRSP) o la nestorona (NES), son reguladores fundamentales de la morfología y motilidad en diversos tipos celulares, incluyendo células de cáncer de mama, células endoteliales y neuronas (Simoncini et al., 2006; Fu et al., 2008b; Fu et al., 2008c; Flamini et al., 2009; Sánchez et al., 2009; Sánchez et al., 2010). Aunque no se conocen por completo los mecanismos por los cuales estas hormonas regulan estos procesos, se ha observado que se activan proteínas involucradas en la remodelación del citoesqueleto de actina como la ezrina, moesina o el complejo Arp2/3 (Fu et al., 2008b; Fu et al., 2008c; Sánchez et al., 2009; Zheng et al., 2011). Además de la remodelación del citoesqueleto, también se ha observado la participación de la P_4 y el E_2 en la formación de complejos focales de adhesión, los cuales también son fundamentales en el proceso de movilidad celular (Fu et al., 2008b; Sánchez et al., 2010). Se ha sugerido que las hormonas sexuales participan en estos procesos a través del mecanismo de acción

no genómico debido a la activación de cinasas como c-Src (Gentilini et al., 2007; Fu et al., 2008b; Fu et al., 2008c; Fu et al., 2010; Li et al., 2010; Sánchez et al., 2010; Zheng et al., 2011).

4.6. La Progesterona

La progesterona (P_4) es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono derivada del colesterol (**Figura 6**). Se sintetiza en los ovarios (cuerpo lúteo y folículos), la corteza adrenal, la placenta y en neuronas y células gliales del SNC (Graham y Clarke 1997; Schumacher et al., 2012). La P_4 tiene una vida media de 36.5 horas (Miller et al., 1999) y en el hígado se convierte a pregnandiol, el cual permite la conjugación para formar glucurónidos, que al ser de carácter hidrofílico facilitan su excreción por la orina (Barrett et al., 2010).

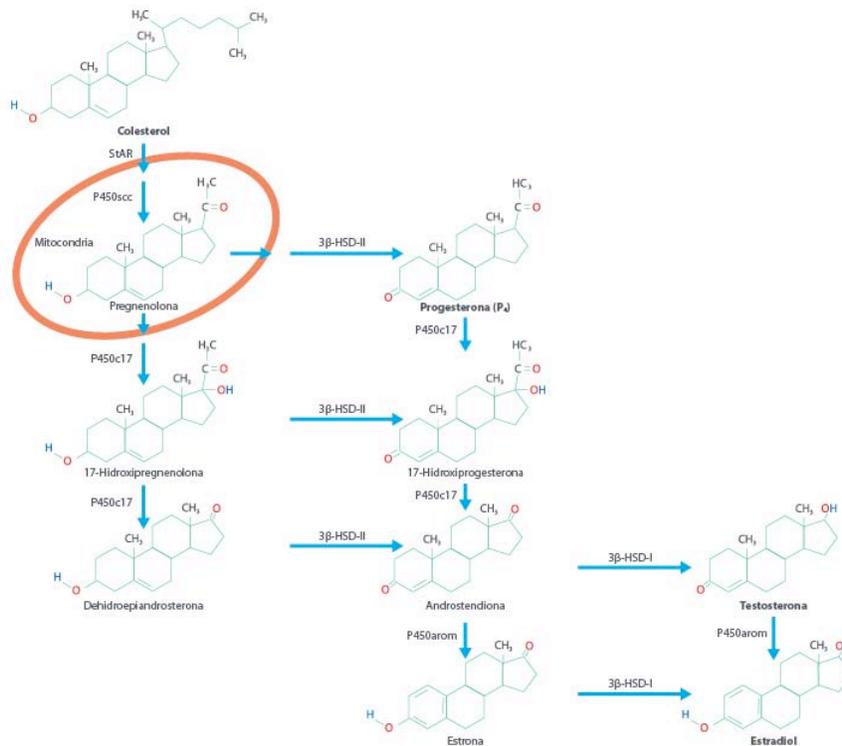


Figura 6. Biosíntesis de la progesterona y sus metabolitos. La P_4 es sintetizada a partir del colesterol, un paso limitante para su síntesis es la entrada del colesterol a la mitocondria por la proteína StAR. Una vez dentro, el colesterol es oxidado por el citocromo P450scc para la conversión de pregnenolona, ésta puede tomar dos rutas: la conversión en P_4 por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD-II) o en 17 α -hidroxipregnenolona por la enzima 17 α -hidroxilasa (P450c17). Las concentraciones biológicamente activas de P_4 se encuentran en el orden de nanomolar (nmol/L) mientras que las de estradiol en el orden de picomolar (pmol/L). Figura tomada y modificada de (Bulun et al., 2005).

Esta hormona participa en la regulación de la ovulación, la implantación del óvulo fecundado, la diferenciación, la conducta sexual, el embarazo, la protección al daño neuronal y el crecimiento tumoral, entre otras funciones. La P₄ actúa en diferentes tejidos como son el cerebro, el útero, el páncreas, el pulmón, el ovario, la glándula mamaria, el hueso, etc, y muchos de los efectos que tiene están regulados por su receptor intracelular, el receptor a progesterona (RP) (Graham y Clarke, 1997; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Scarpin et al., 2009).

En los varones, la concentración plasmática de P₄ es menor a 4.45 nM. En las mujeres, la concentración de P₄ cambia a lo largo del ciclo menstrual, en el embarazo y en la menopausia (Barrett et al., 2010); **Tabla 1**).

Etapa	Progesterona (nM)
Hombres	<4.45
Mujeres (ciclo menstrual)	
Menstruación	0.3 - 1.6
Folicular	0.3 – 3.2
Ovulatoria	3.2 – 6.4
Lútea	12.8 – 48.0
Postmenopausia	< 2.2
Mujeres (embarazo)	
Primer trimestre	32.4 – 139.9
Segundo trimestre	76.5 – 271.2
Tercer trimestre	206.7 – 922.2

Tabla 1. Concentración plasmática de P₄ (Barrett et al., 2010)

Se ha observado que los metabolitos de la P₄ como la alopregnanolona, conocidos como neuroesteroides, participan en la regulación del estrés, neuroprotección, memoria y depresión (Mellon y Griffin, 2002). Estos se sintetizan por células gliales y neuronas en la corteza, hipocampo y amígdala (Baulieu y Robel, 1990) y ejercen sus funciones principalmente a través del mecanismo de acción no clásico (Reddy, 2010).

4.6.1. Mecanismos de acción de la P_4

Los efectos de la P_4 se pueden clasificar como clásicos y no clásicos. El primer mecanismo comprende generalmente, todos los efectos a largo plazo, los cuales están modulados por el receptor a P_4 (RP) que regula la expresión de genes blanco (Conneely et al., 2003). En cambio, el segundo mecanismo ocurre principalmente en la membrana y en el citoplasma, induciendo los efectos a corto plazo (Gellersen et al., 2009). No obstante, existe la posibilidad de que ambos mecanismos se enlacen, permitiendo a la hormona tener una regulación mucho más fina sobre varias funciones celulares (**Figura 7**). Revisado por (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

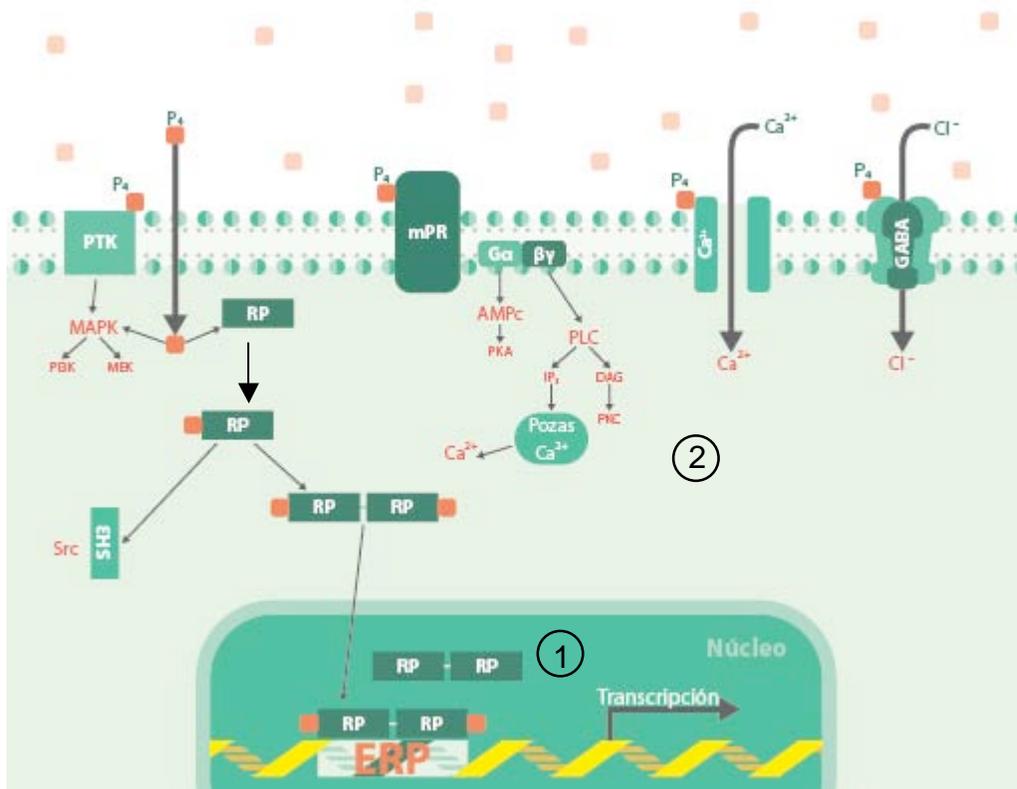


Figura 7. Esquema de los mecanismos de acción de la P_4 . Los efectos de la P_4 ocurren por dos diferentes mecanismos celulares: 1. Genómico, en el que el complejo hormona-receptor (P_4 -RP) se une con elementos de respuesta a P_4 (ERP) ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA, y así se modula directamente la expresión génica. 2. No genómico, que incluye receptores membranales y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. mRP (o mPR); Receptor membranar a P_4 ; G: Proteína G, $\alpha\beta\gamma$: Subunidades de la proteína G; cAMP: Adenosín monofosfato cíclico; PKA: Proteína Cinasas A; GABAAR: Receptor a GABA tipo A; Ca^{2+} : Calcio; Cl^- : Cloro; K^+ : Potasio; PTK: Proteína Tirosina Cinasas; MAPK: Proteína Cinasas Activadas por Mitógenos; MEK: Cinasas de MAPK; PI3-K: Cinasas de Inositol Trifosfato; PLC: Fosfolipasa C; DAG: Diacil glicerol; PKC: Proteína Cinasas C; IP $_3$: Inositol Trifosfato. Basado en (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

El mecanismo clásico implica la regulación de la transcripción de los genes blanco mediada por el RP. Este ocurre en varios pasos donde primero la P_4 entra por difusión simple a la célula e interactúa con su receptor. El receptor en ausencia de ligando se mantiene inactivo gracias a que se encuentra unido a un complejo proteínico conformado por las proteínas de choque térmico Hsp70/Hsp40, la proteína p23, co-chaperonas como las proteínas FKBP 51 y 52. La asociación con chaperonas le confiere una conformación determinada que le permite unir a la hormona con gran afinidad (Schulke et al., 2010). Una vez unido a su ligando, el receptor se disocia de dichas proteínas, se dimeriza con otra molécula de RP y es fosforilado por MAPK en varios residuos como Ser294 y Ser345 (Conneely et al., 2003; Daniel et al., 2009; Ward y Weigel, 2009). El complejo RP:RP interactúa con los elementos de respuesta a P_4 (ERP) localizados en los promotores de los genes blanco de P_4 . Al mismo tiempo se reclutan varios coreguladores como los de la familia p160 como el coactivador SRC-1 y otros factores generales de la transcripción para formar un complejo de iniciación e inducir la expresión de los genes blanco. El RP también puede activar la transcripción de manera indirecta al unirse a otros factores de transcripción como las proteínas Sp1, AP-1 y STATs (Camacho-Arroyo, 2003; Conneely et al., 2003; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Hagan et al., 2009). Tras la transcripción, el RP y los coreguladores se degradan de manera dependiente de ligando a través de la vía ubiquitina-proteosoma (Lange et al., 2000; Villamar-Cruz et al., 2006) (**Figura 8**).

En el mecanismo no clásico, la P_4 o sus metabolitos pueden activar diversas cascadas de señalización. Por ejemplo, la P_4 puede interactuar con el RP citosólico para activar cinasas con dominios SH3 como la cinasa Src (Boonyaratanakornkit et al., 2001). También se ha observado que la hormona interactúa con receptores localizados en la membrana plasmática (mRP), los cuales tienen una estructura y un perfil farmacológico diferente al RP. Todavía se desconocen muchos aspectos de los mRPs aunque se ha observado que actúan acoplados a proteínas G (Singh et al., 2013). La P_4 es capaz de activar canales de Ca^{2+} , puede interactuar con sitios alostéricos localizados en los receptores a neurotransmisores tales como GABA (Henderson, 2007; Lishko et al., 2011). Estas interacciones producen cambios en la conductancia iónica, la activación de cascadas de segundos mensajeros, la producción de AMP cíclico y la activación de cinasas como la proteína cinasa C (PKC) y las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Boonyaratanakornkit et al., 2007; Gellersen et al., 2009).

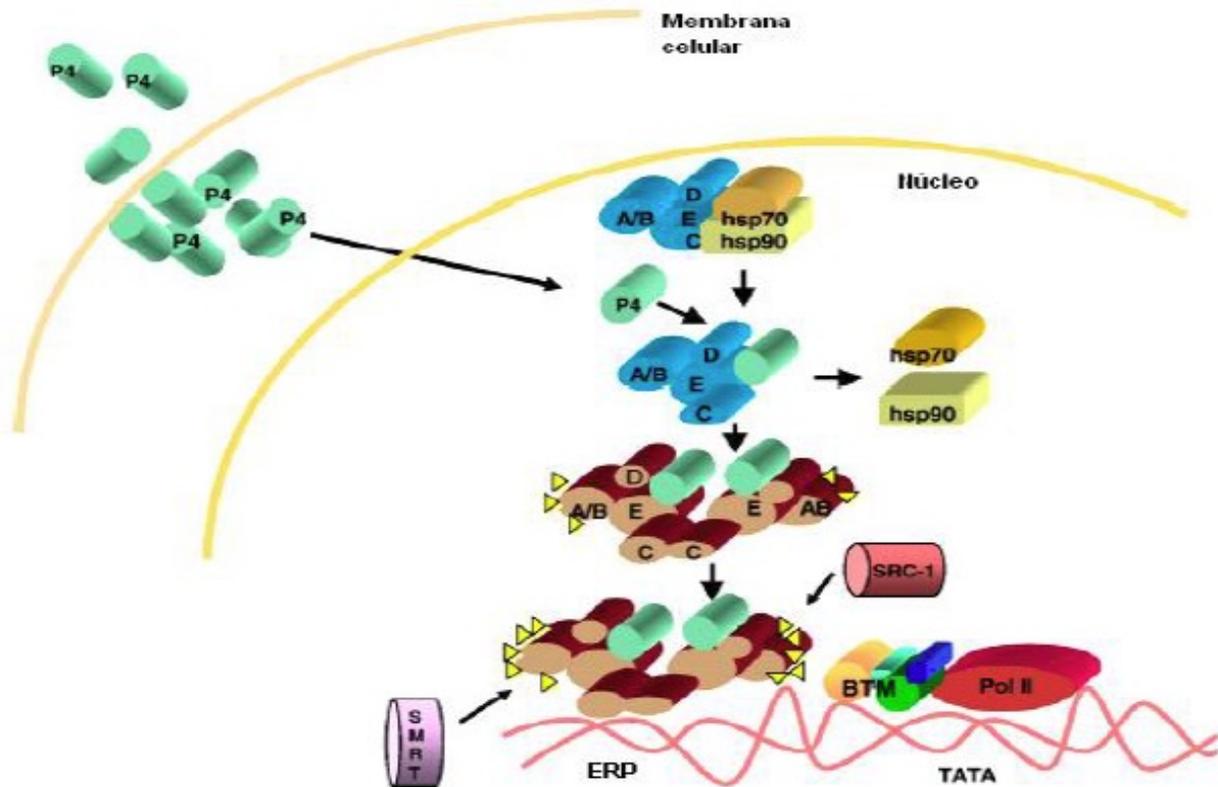


Figura 8. Mecanismo de acción clásico de la P₄. En estado basal, el RP está asociado con proteínas chaperonas como las de choque térmico HSP90 y HSP70. Después de la unión de la P₄ el RP se disocia de las proteínas chaperonas y se dimeriza con otra molécula de RP. El receptor es fosforilado y forma complejos con correguladores como el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT. El RP interactúa con el ERP en la región promotora de los genes blanco de la P₄, lo cual también induce fosforilación del RP y la maquinaria de transcripción basal es reclutada. A/B, C, D y E son dominios del RP. Figura tomada de (Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006).

4.7. Estructura y función del receptor a progesterona

El RP es una proteína clasificada dentro de la superfamilia de receptores nucleares que se catalogan en tres diferentes clases. La primera incluye los 10 receptores a hormonas esteroides, entre los que se encuentran los receptores a estrógenos α y β (RE α/β), el RP-A y RP-B, el receptor a glucocorticoides (RG), el receptor a mineralocorticoides (RM) y el receptor a andrógenos (RA). La segunda clase está representada por los receptores X de retinoides (RXR $\alpha/\beta/\gamma$), el receptor a la vitamina D (RVD), el receptor de activación de la proliferación de peroxisomas (RAPP $\alpha/\beta/\gamma$) y el receptor a hormonas tiroideas (RT α/β). La tercera clase comprende a todos los receptores huérfanos, de los cuales se desconoce su ligando endógeno. Todos ellos son factores de transcripción que se activan al unirse a su ligando y se cree que surgieron de un ancestro común (Edwards, 2000; Ellmann et al., 2009).

La cadena polipeptídica de los receptores a hormonas esteroides está dividida estructural y funcionalmente en varios dominios. El dominio A/B del extremo amino terminal es el más variable en su secuencia y en su longitud. Este dominio tiene funciones de activación (AF) que regulan la transcripción de genes blanco (Nussey y Whitehead, 2001; Ellmann et al., 2009). El dominio C posee la región más conservada que es el dominio de unión al DNA (DBD). El DBD contiene dos dedos de zinc, cada uno con cuatro residuos de cisteína conservados, que participan en la dimerización del receptor y en el reconocimiento del DNA (Edwards, 2000; Nussey y Whitehead, 2001; Ellmann et al., 2009). Por otro lado, el dominio D es una región en forma de horquilla que contiene la secuencia de localización nuclear y los sitios de unión para las proteínas chaperonas que mantienen los receptores en un estado inactivo. El dominio E es multifuncional pues contiene el sitio de unión al ligando, una función de activación (AF-2) dependiente de ligando, una segunda secuencia de localización nuclear y varios sitios de unión a chaperonas y correguladores (Edwards, 2000; Nussey y Whitehead, 2001; Camacho-Arroyo y Rodríguez-Dorantes, 2006; Ellmann et al., 2009) (**Figura 9**).

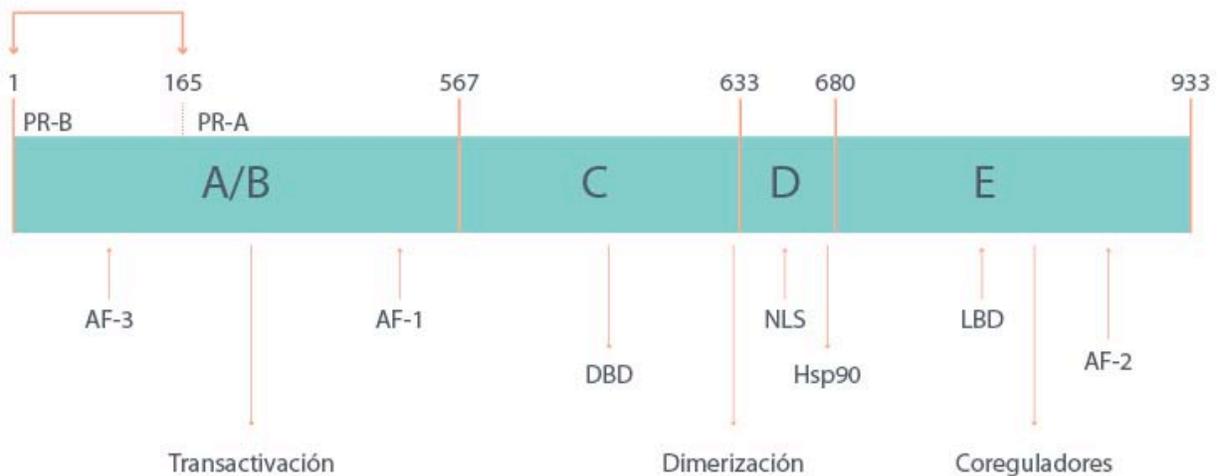


Figura 9. Representación esquemática de los dominios del RP. El receptor consta de cinco dominios denominados de la A a la E. El dominio A/B se encuentra en el extremo amino y tiene dos funciones de activación (AF-3 y AF-1) que participan en la regulación de la transcripción de los genes blanco. El dominio C contiene el dominio de dimerización y el dominio de unión al DNA (DBD) que se caracteriza por tener dos dedos de zinc. El dominio D tiene las secuencias de localización nuclear (NLS) y la de unión a chaperonas (Hsp90). El dominio E tiene la región de unión al ligando (LBD), la de unión a coreguladores y hacia el extremo carboxilo tiene una función de activación (AF- 2). En el esquema también se muestra el número de aminoácidos que tiene cada dominio y las isoformas RP-A y RP-B (Tomada y modificada de(Cabrera-Muñoz et al., 2011).

Uno de los factores críticos involucrados en las respuestas biológicas a la P_4 es la presencia de dos isoformas del receptor. Estas dos especies moleculares regulan la expresión de diferentes genes y por tanto también distintas funciones dentro de la célula. Existen dos principales isoformas, RP-A y RP-B, las cuales han sido descritas en aves, reptiles y mamíferos, incluido el ser humano (González-Agüero et al., 2001; Camacho-Arroyo et al., 2003; Guerra-Araiza et al., 2009; O'Connell et al., 2011). En el humano, la isoforma RP-A pesa 94 kDa y RP-B 116 kDa.

La estructura diferencial de las isoformas del RP, la dimerización, las modificaciones postraduccionales y el reclutamiento de distintos coactivadores confiere respuestas tejido específicas y una regulación diferencial de los genes blanco (Mani, 2008). Las respuestas a la P_4 varían de un tejido a otro y dependen en gran medida de la relación RP-A:RP-B. Los cambios en la proporción de las isoformas del RP se han relacionado con procesos fisiológicos como el ciclo menstrual, el embarazo y post-parto (Mote et al., 1999; Taylor et al., 2009; Tan et al., 2012) y con enfermedades como el cáncer (Graham y Clarke, 2002).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el RP se expresa de manera diferencial en los astrocitomas dependiendo del grado de evolución del tumor. Se encontró en astrocitomas de grado III y IV obtenidos a partir de biopsias que, aunque la mayoría expresan ambas isoformas del RP, la predominante es RP-B (González-Agüero et al., 2001). También se ha observado en estudios realizados en líneas celulares de grado III (U373) que se expresa principalmente la isoforma RP-B en una proporción RP-B/RP-A de 3:1, mientras que RP-A se expresa mayoritariamente en las de grado IV (D54) en una relación RP-B/RP-A de 0.66:1 (Cabrera-Muñoz et al., 2009).

4.8. Antagonistas de la P_4

Se han desarrollado diversos ligandos sintéticos que pueden competir con la P_4 en su unión con el RP, y de esta manera son capaces de inhibir la actividad del receptor. El primero que se desarrolló fue la mifepristona (RU486), que es un antagonista de progestinas y glucocorticoides. A partir de ésta, numerosos ligandos relacionados han sido sintetizados, los cuales exhiben un amplio espectro en su rango de actividad, que va desde antagonistas del RP puros, hasta ligandos con actividad agonista-antagonista (Spitz, 2003). Debido a este rango de actividad, los antagonistas del RP se han clasificado

como moduladores del receptor a P₄ (PRMs), moduladores selectivos del receptor a P₄ (SPRMs), mesoprogestinas o agonistas-antagonistas parciales (Chwalisz et al., 2000; Spitz, 2003).

Las antiprogestinas se clasifican en dos grupos basándose en sus efectos sobre la función del RP *in vitro*. Los compuestos de tipo I, que incluyen la onapristona (ZK98299), previenen la asociación del RP con los ERP y actúan como antagonistas puros, mientras que los compuestos de tipo II cuyo ejemplo principal es el RU486, que pueden promover la disociación entre el RP y las proteínas de choque térmico, la dimerización del RP y la unión al ERP, por lo cual se ha propuesto que el mecanismo antagonista de dichos compuestos implica un cambio conformacional en la estructura del RP, el cual impedirá la unión de la P₄ a su receptor y la consecuente activación de la transcripción (Edwards et al., 1995). Se dice que éstos son antagonistas impuros o agonistas-antagonistas parciales, ya que también pueden activar al receptor. Se ha observado que en presencia de AMPc, el RU486 tiene actividad de agonista (Chwalisz et al., 2000).

Asimismo se sabe que las antiprogestinas bloquean la interacción de los receptores con coactivadores y permiten el reclutamiento de correpresores. Se ha sugerido que la relación entre el reclutamiento de coactivadores y correpresores por cada antiprogestina en cada tipo celular determina si un compuesto es agonista, antagonista o un agonista-antagonista (Liu y Ogle, 2002), de la misma forma, también es posible que las antiprogestinas actúen vía heterodimerización y competencia por la unión a ERP (Spitz, 2003).

4.8.1. Características del RU486

La principal característica estructural del RU486 es el grupo femil-aminodimetil en la posición 11β del esqueleto esteroide, el cual permite mayor interacción con una región específica del sitio de unión al receptor (Cadepond et al., 1997). El RU486 es un antagonista de la P₄, que compite por el sitio de unión al RP, al que se une con una constante de afinidad media de 1.4 nM, mientras que la constante de unión de la P₄ por el RP-A y RP-B es de 1.2 nM y 0.9 nM, respectivamente (Raaijmakers et al., 2009). Aunque la activación del RP no se ve afectada al unirse el RU486, estudios con coactivadores de la familia p160 y de la estructura del sitio de unión al ligando, han demostrado que el RU486 no se une a las mismas regiones que un agonista y que induce una conformación diferente de su extremo

carboxilo terminal (Leonhardt y Edwards, 2002). Esta conformación alterna no permite la interacción con coactivadores y promueve el reclutamiento de correpresores (**Figura 10**).

Los antagonistas del RP tienen diversos efectos sobre el sistema reproductivo. Además pueden ser utilizados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, por ejemplo, estudios recientes demuestran que el RU486 puede prevenir la tumorigénesis mamaria en ratones deficientes de Brca1/p53 por lo que podría ser utilizado como terapia alternativa contra el cáncer de mama (Pooley et al., 2006). Asimismo, investigaciones realizadas en nuestro laboratorio revelan que el RU486 disminuye la proliferación celular inducida por P_4 en las líneas celulares U373 y D54 derivadas de astrocitomas humanos de grados III y IV respectivamente (Cabrera-Muñoz et al., 2009).

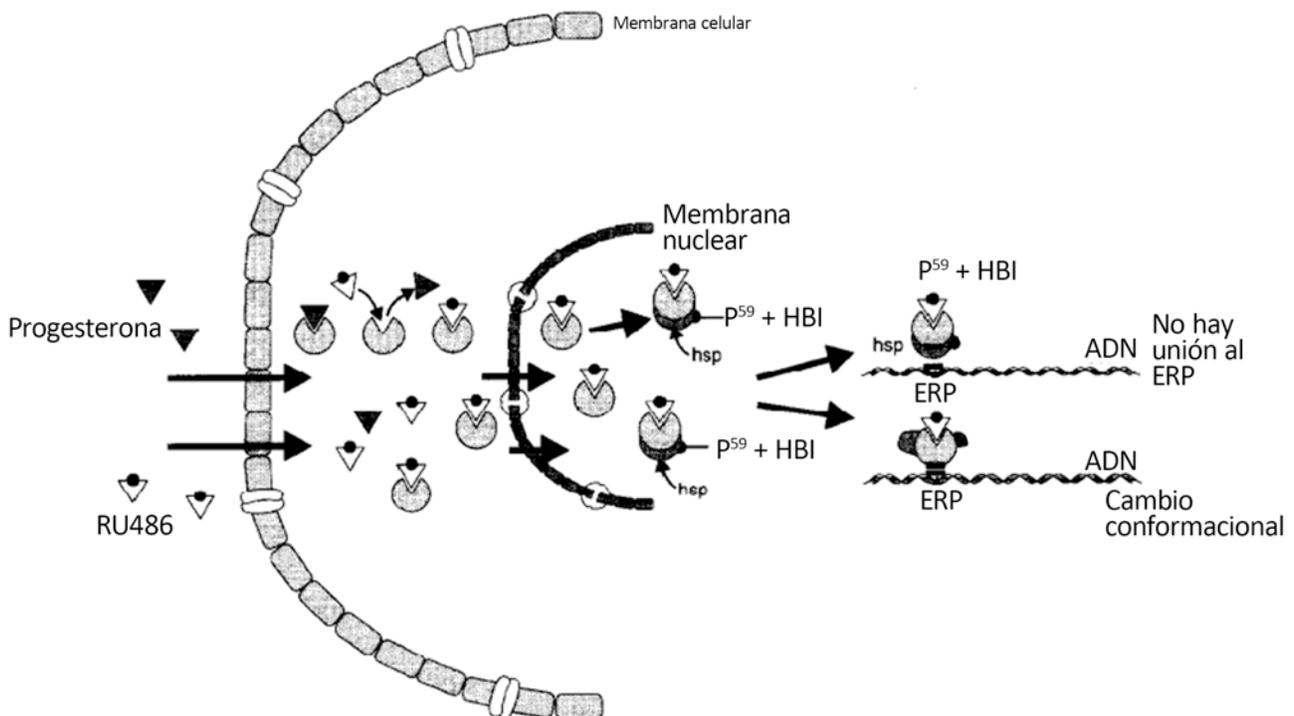


Figura 10. Mecanismo de acción del RU486. En ausencia de ligando el RP se encuentra unido a proteínas chaperonas, las cuales cubren el dominio de unión al DNA. El RU486 presenta mayor afinidad por el RP que la P_4 , por lo cual se une preferentemente al receptor. Una vez que el RU486 se ha unido al RP, la interacción del receptor con la proteína de choque térmico 90 y p59 se hace más fuerte y a partir de ahí puede ocurrir que las proteínas chaperonas no permitan que el RP se una al ERP o que el RP sí se una al ERP pero que sufra un cambio conformacional que no permita reclutar a la maquinaria transcripcional. La conformación adquirida al unirse el antagonista no permite la interacción con coactivadores y promueve el reclutamiento de correpresores. Chaperonas: proteínas de choque térmico (hsp), p59, complejo hsp-inmunofilina (HBI). ERP: elemento de respuesta a P_4 . Tomado y modificado de (Mahajan y London, 1997).

4.9. Efectos de la P₄ en líneas celulares de astrocitomas.

Se ha observado que la P₄ (10 nM) induce la proliferación de las células U373 y D54 y el tratamiento con el antagonista del RP (RU486, 10 μM) bloquea el efecto de la hormona, lo que sugiere que el efecto de la P₄ es a través de sus receptores intracelulares (González-Agüero et al., 2007). Además, la sobre-expresión de la isoforma RP-A en la línea U373 disminuye el aumento en el número de células inducido por P₄, lo que sugiere que el RP-A tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento celular, cuando es activado por su ligando (Cabrera-Muñoz et al., 2009). Aunado a esto, hemos reportado que en la línea celular D54, la P₄ (10 nM) induce la expresión de genes que participan en la regulación del ciclo celular, la proliferación y la angiogénesis como ciclina D1, EGFR y VEGF (Hernández-Hernández et al., 2012).

5. Planteamiento del problema

Los astrocitomas constituyen las neoplasias cerebrales más frecuentes y agresivas en el ser humano. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con alguna estrategia terapéutica que disminuya de manera efectiva el crecimiento de estos tumores y mejore la calidad de vida de los pacientes que los presentan.

Se sabe que la P₄ a través del RP incrementa el número de células en líneas derivadas de astrocitomas humanos de los máximos grados de evolución (III y IV), a través de un incremento en la proliferación celular y en la expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular y la angiogénesis como ciclina D1, el receptor al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Sin embargo, se desconoce la participación de la P₄ y del RP en la infiltración de los astrocitomas humanos, que es una de las causas más comunes en el fracaso del tratamiento y la alta mortalidad producida por estos tumores. La infiltración involucra procesos de migración e invasión que dependen de la remodelación del citoesqueleto de actina. Por lo anterior, en este trabajo estudiamos los efectos de la P₄ sobre la migración e invasión celulares y la activación de cofilina.

6. Hipótesis

Ya que los procesos de migración e invasión en células tumorales dependen en gran medida de la remodelación del citoesqueleto de actina y que ésta puede ser regulada por P_4 , se espera que esta hormona promueva la migración e invasión de células derivadas de astrocitomas humanos mediante rearrreglos del citoesqueleto de actina en el que participarán proteínas de unión a ésta como la cofilina, que será activada por P_4 .

Si los efectos de la P_4 en las modificaciones del citoesqueleto de actina y la migración e invasión de células derivadas de astrocitomas humanos están mediados por el receptor intracelular a progesterona (RP), entonces la administración del RU486, antagonista del RP, bloqueará los efectos de la hormona.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

- Conocer los efectos de la P_4 en los procesos de migración e invasión de células derivadas de un astrocitoma humano grado IV y su efecto en la activación de cofilina, una proteína asociada a actina.

7.1 Objetivos particulares

- Evaluar la participación de la P_4 y del RU486 en la regulación de la migración e invasión de células D54 derivadas de un astrocitoma humano grado IV en un sistema “in vitro”.
- Analizar el papel de la P_4 y el RU486 en contenido y fosforilación de la cofilina en células D54.

8. Metodología

8.1. Cultivo celular

Para el procedimiento experimental se utilizó la línea celular D54, derivada de astrocitoma de grado IV proveniente de una biopsia de un hombre de 53 años generosamente donada por el Dr. Andrés Gutiérrez (INR, México) del laboratorio del Dr. Sontheimer (Birmingham, Alabama). La línea D54 o D54-MG es una sub-línea de la A-172 mantenida por la Universidad de Duke y que tiene la misma distribución cromosómica, es decir, tiene un número cromosómico de 77 y un fenotipo mixto en el cual dos células no son exactamente iguales. No tiene copias normales de los cromosomas 1, 6, 9 y 14. La D54 tiene además otros cinco marcadores caracterizados que son translocación del cromosoma 1 al 18, del 17 al 23 y del 1 al 19, delección del cromosoma 7 y del brazo largo del cromosoma 33 y la presencia de un isocromosoma (Bigner et al., 1983). Además, basándonos en que la línea D54 es derivada de un glioblastoma, se sugiere que podría tener los marcadores generalmente identificados en este tipo de tumores que son: mutaciones de la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1), de la proteína p53 y del receptor al factor de crecimiento A derivado de plaquetas (PDGFRA), amplificación del EGFR y delección o mutación del gen de neurofibromina (NF1) (Le Mercier et al., 2012).

La línea celular se cultivó en cajas de Petri con medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) alto en glucosa con rojo fenol suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, piruvato de sodio 1 mM, antibióticos 1 mM (Biowest, Francia), aminoácidos no-esenciales 0.1 mM (In Vitro, México D.F.) y Bicarbonato de Sodio en una atmósfera de aire al 95 % y CO₂ al 5% a 37 °C.

8.2. Tratamientos hormonales

Para estudiar el efecto de la P₄ en la migración e invasión y en la activación de cofilina en células D54, se utilizaron los siguientes tratamientos: vehículo (ciclodextrina CDX, 0.02%); P₄ (10 nM); RU486 (10 μM); y el tratamiento conjunto de P₄ + RU486. La CDX, P₄ y el RU486 se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Se ha observado que esta concentración de P₄ modifica la disposición de los filamentos de actina en células derivadas de cáncer de mama (Fu et al., 2010). Además, también se ha reportado que el RU486 en una concentración de 10 μM tiene efectos en la proliferación en células

D54 y U373 derivadas de astrocitomas de grados III y IV respectivamente (González-Agüero et al., 2007)

8.3. Ensayo de migración

Para determinar el efecto de la P_4 sobre la migración de las células D54 se utilizó el ensayo de "Scratch" destinado al estudio del movimiento colectivo y direccional de poblaciones celulares (Etienne-Manneville y Hall, 2001; Magdalena et al., 2003). En cajas de 6 pozos se sembraron 200,000 células por pozo en medio DMEM completo (descrito en la sección b de metodología) y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 60-70%, posteriormente se realizó el cambio de medio por DMEM sin rojo fenol (Invitro, México, D.F.) suplementado con SFB sin hormonas al 10% (HyClone, Logan, Utah). Transcurridas 24 horas (confluencia del 80-90%), las células se lavaron con PBS, se agregó 500 μ l de PBS-EDTA (1 mM) a cada pozo e inmediatamente, con una punta de pipeta desechable de 200 μ l, se retiró una estría la monocapa de células. Posteriormente, se realizó 1 lavado con PBS para eliminar a las células desprendidas. A continuación se colocaron 2 ml de medio DMEM sin rojo fenol y SFB sin hormonas y se agregó clorhidrato de citosina β -D-arabinofuranósido (Ara-C, inhibidor de la síntesis de DNA) a una concentración final de 10 μ M para descartar que los cambios observados en el número de células que migran se debieran a un aumento en la proliferación, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Sin retirar el medio, se adicionaron los tratamientos hormonales mencionados en la sección b) y se tomaron fotografías con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X de la zona de "Scratch" a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. A las 24 horas el medio y los tratamientos fueron reemplazados por medio y tratamientos frescos.

Se cuantificó con el software ImageJ el número de células migratorias y se analizaron mediante ANOVA y posteriormente una prueba de t-student con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) para calcular los valores de probabilidad.

8.4. Ensayo de invasión

Para evaluar el efecto de la P_4 en la invasión de las células D54 se realizó el ensayo de invasión en Transwell, que se realiza en cámaras de Boyden (Boyden, 1962; Grem et al., 1995). En este ensayo hay un cámara de cultivo adicional llamada inserto, el cual contiene una membrana de policarbonato en la parte inferior con un tamaño de poro definido, dicho inserto es colocado dentro de un pozo de una caja de cultivo. Las células se siembran en el inserto con medio libre de suero, mientras que en el pozo se coloca medio con suero o algún otro quimioatrayente (Chen, 2005).

Las células se cultivaron en las condiciones antes mencionadas y 24 horas antes de los tratamientos, se realizó el cambio de medio a las células por medio DMEM sin rojo fenol y suero sin hormonas. Simultáneamente se descongeló el gel de ECM (Sigma-Aldrich, USA) durante toda a noche a 4°C, una vez descongelado se realizó una dilución con medio DMEM sin rojo fenol y sin SFB a una concentración final de 2 mg/ml. El gel de ECM es una mezcla de proteínas gelatinosas secretadas por las células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), esta mezcla asemeja el medio ambiente extracelular complejo que se encuentra en muchos tejidos (Kleinman y Martin, 2005). Se colocaron los insertos (Corning, USA) en cajas de cultivo de 6 pozos. Posteriormente se colocó 1 ml de ECM en cada inserto. Se incubaron los pozos (con el inserto) a 37°C y 5% CO₂ 2 horas para permitir la gelificación. Se lavaron las células con 3 ml de PBS y posteriormente se despegaron con 1 ml de PBS-EDTA, las células se resuspendieron en medio DMEM sin rojo fenol y sin SFB y se sembraron 300,000 células por inserto en 1.5 ml del mismo medio y se colocaron los tratamientos antes mencionados. Se colocaron 2 ml de medio DMEM sin rojo fenol suplementado con SFB al 10% libre de hormonas en los pozos. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo se eliminó el medio y el gel de ECM del inserto y se realizó un lavado con PBS. Se fijaron las células con paraformaldehído (PFA, 4%) por 20 minutos, para quitar el excedente de PFA se realizó un lavado con PBS por 5 minutos. Las células se tiñeron con cristal violeta al 1% durante 20 minutos y después se realizaron tres lavados con PBS por 10 minutos. Finalmente se dejó secar y el inserto se observó al microscopio y se tomaron las fotografías correspondientes con una cámara Infinity1-2C acoplada a un microscopio invertido Olympus CKX41 a un aumento de 10X.

Se cuantificó el número de células invasoras, las que atravesaron el Matrigel, en 5 campos tomados al azar y se analizaron mediante ANOVA y posteriormente una prueba de t-student, se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) para calcular los valores de probabilidad.

8.5. Western Blot

Para evaluar el efecto de la P_4 sobre el contenido y la fosforilación de cofilina en las células D54 se realizó la técnica de Western Blot. Se sembraron 200,000 células en cajas de 6 pozos en las condiciones antes mencionadas y al alcanzar una confluencia del 80% se realizó un cambio de medio por DMEM sin rojo fenol y suplementado con SFB al 10% libre de hormonas. Tras 24 horas se administraron los tratamientos mencionados en la sección b) durante 15, 30 y 60 minutos. Las células se lisaron con buffer RIPA (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 1% y SDS 0.1%) que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas (AEBSF, aprotinina, clorhidrato de bestatina, E-64 y leupeptina; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y EDTA (1 mM). Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la absorbancia a 280 nm en un NanoDrop (Thermo Scientific, USA). Las muestras se hirvieron durante diez minutos y se tomaron 70 µg de proteínas totales en buffer de carga para separarlas por electroforesis en un gel SDS-desnaturalizante a 80 V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara semihúmeda durante durante 1 hora a 40 mA. Posteriormente, la membrana se incubó con una solución de leche libre de grasa al 3% y BSA al 2% en TBS-Tween (0.05%) 2 horas a 37°C. A continuación se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-p-cofilina (Ser-3) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) en una concentración de 0.2 µg/ml durante 24 h a 4°C. La membrana se lavó con TBS-Tween (0.1%) durante 7 minutos para luego incubarla durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa en una dilución de 1:7500. Se realizaron nuevamente tres lavados de 10 minutos con TBS-Tween y después se detectaron las proteínas mediante quimioluminiscencia (Millipore, USA) y se revelaron en placas sensibles a quimioluminiscencia (BioMax Light Film, Kodak). Posteriormente la membrana se lavó con amortiguador de glicina (0.1 M, pH 2.5) 1 hora a temperatura ambiente y se bloqueó nuevamente en las condiciones antes mencionadas para después incubarla con un anticuerpo policlonal de conejo anti-cofilina (FL-166) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) en una concentración de 0.2 µg/ml durante 24 horas a 4°C. Transcurrido ese tiempo se continuó el protocolo antes mencionado para p-cofilina.

Finalmente se realizó la detección de α -tubulina como control de carga, para esto se lavó nuevamente la membrana con buffer de glicina y se bloqueó en las condiciones antes mencionadas, posteriormente se incubó la membrana con un anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -tubulina (B-7) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) en una concentración de 0.2 μ g/ml durante 24 horas a 4°C y se continuó con el protocolo antes mencionado.

La densidad de las bandas se cuantificó mediante un análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ. Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA y posteriormente una prueba de t-student, se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA) para calcular los valores de probabilidad.

9. Resultados

Inicialmente se decidió evaluar el efecto de la P_4 sobre la migración de células derivadas de un astrocitoma humano de grado IV por medio del ensayo de "Scratch". En éste se observó que la P_4 aumentó significativamente el número de células que migran desde las 3 hasta las 48 horas con respecto a los demás tratamientos. El RU486, antagonista del RP, bloqueó significativamente los efectos de la hormona en todos los tiempos de estudio. Adicionalmente se observó que a las 3 horas el tratamiento sólo con el antagonista disminuyó significativamente el número de células que migran en comparación con los tratamientos con P_4 , P_4 +RU486 e incluso con el de vehículo (**Figuras 11 y 12**).

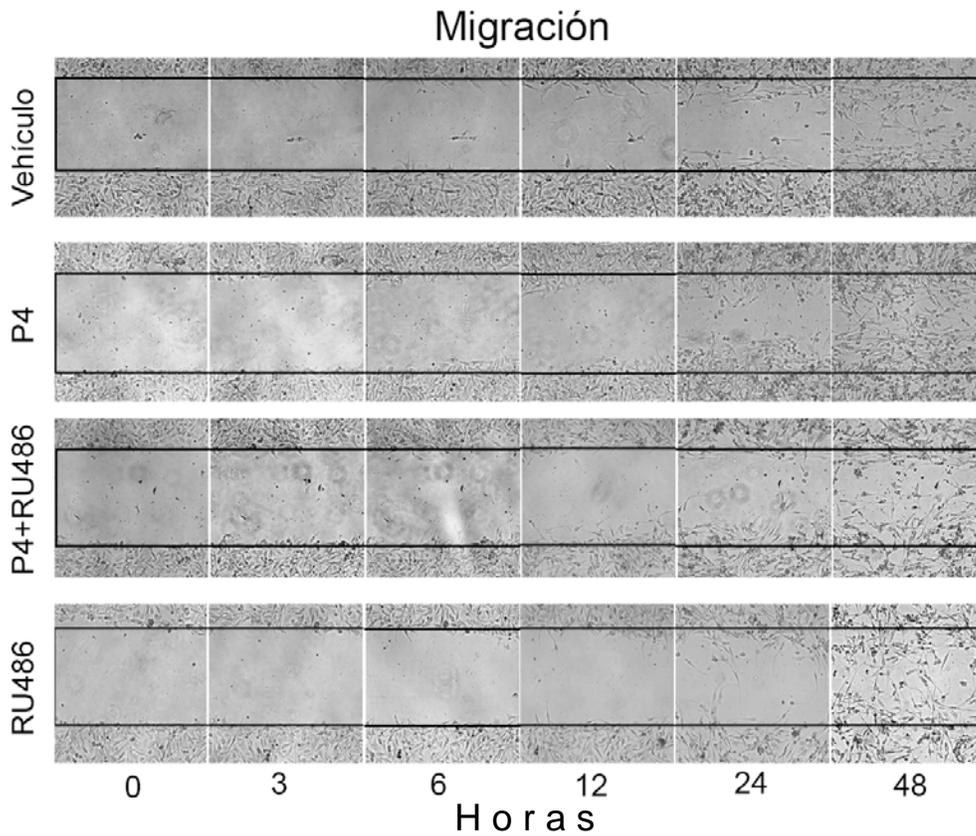


Figura 11. Efecto de la P_4 en la migración de células D54. Fotografías representativas del ensayo de Scratch tomadas a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas con tratamiento con Vehículo (ciclodextrina, CDX 0.02%), P_4 10 nM, el tratamiento conjunto (P_4 10 nM y RU486 10 μ M) y RU486 10 μ M.

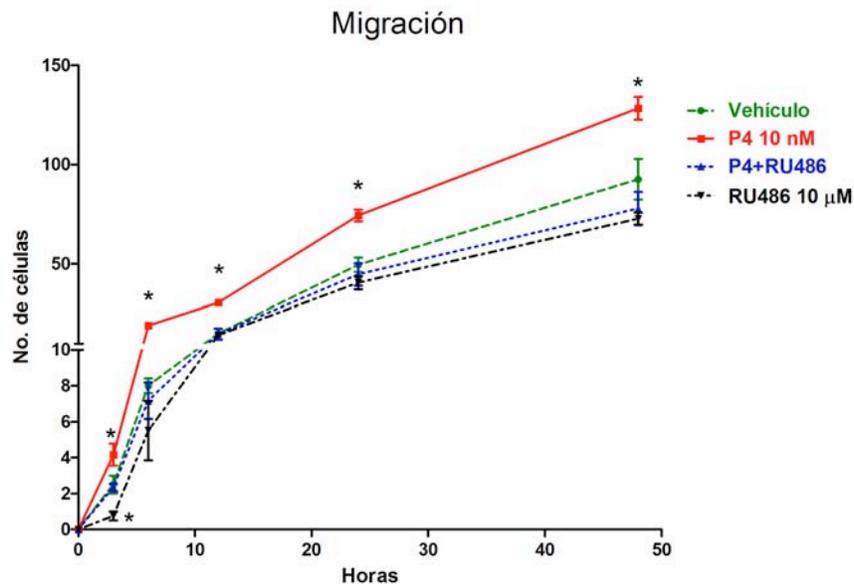


Figura 12. Efecto de la P_4 en la migración de células D54. Gráfica representativa del ensayo de "Scratch" del número de células que migran a las 0, 3, 6, 12, 24 y 48 horas con tratamiento con Vehículo (ciclodextrina, CDX 0.02%), P_4 10 nM, el tratamiento conjunto (P_4 10 nM y RU486 10 μ M) y RU486 10 μ M. (*) $P < 0.05$ vs los otros grupos. Media \pm EEM, $n=5$.

A continuación se evaluó el efecto de la P_4 en la invasión celular mediante el ensayo en “Transwell” y se encontró que la P_4 aumentó significativamente el número de células invasivas en comparación con los demás tratamientos a las 24 horas. Similar a lo que se observó en el ensayo de migración, el RU486 bloqueó el efecto invasivo producido por la P_4 en las células. De manera interesante se observó que el tratamiento sólo con el antagonista RU486 en una concentración de 10 μ M aumentó significativamente el número de células que invaden en comparación con el tratamiento con vehículo, aunque este aumento fue 51% menor en comparación al producido con el tratamiento con la P_4 (Figuras 13 y 14).

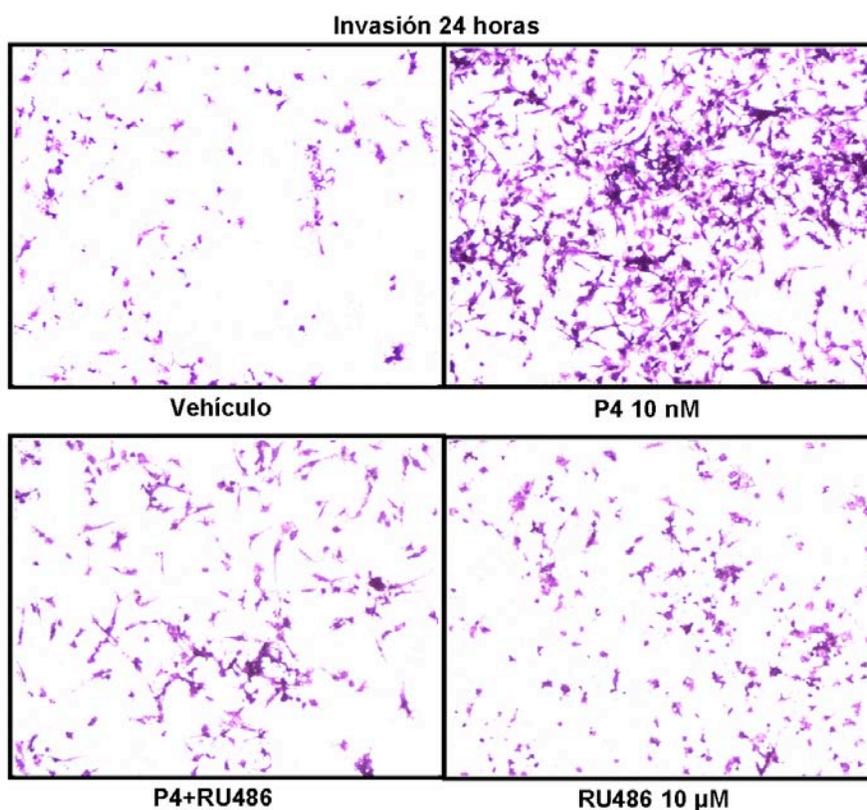


Figura 13. Efecto de la P_4 en la invasión de células D54. Fotografías representativas del ensayo de Transwell tomadas a las 24 horas con tratamiento con Vehículo (ciclodextrina, CDX 0.02%), P_4 10 nM, el tratamiento conjunto (P_4 10 nM y RU486 10 μ M) y RU486 10 μ M.

Invasión 24 horas

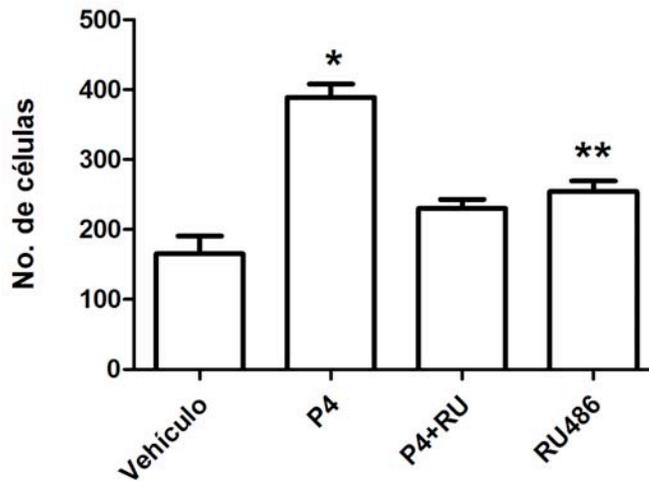


Figura 14. Efecto de la P_4 en la invasión de células D54. Gráfica representativa del ensayo de “Transwell” del número de células que invaden a las 24 horas con tratamiento con Vehículo (CDX 0.02%), P_4 10 nM, el tratamiento conjunto (P_4 10 nM y RU486 10 μ M) y RU486 10 μ M. (*) $P < 0.05$ vs los otros grupos. (**) $P < 0.05$ vs Vehículo. Media \pm EEM, $n=3$.

Finalmente, para determinar el efecto de la P_4 sobre el contenido y fosforilación de una proteína involucrada en la remodelación de los filamentos de actina durante los procesos de migración e invasión celular se realizó la técnica de Western Blot. Tanto la forma no fosforilada como la fosforilada de cofilina fueron detectadas por esta técnica. Es importante recordar que la cofilina, se encuentra activa al desfosforilarse, por lo que tomando esto en consideración se realizó la relación cofilina/p-cofilina para determinar indirectamente mediante el estado de fosforilación, la actividad de esta proteína.

La tasa cofilina/p-cofilina a los 15 minutos se observó sin cambios aunque el tratamiento con P_4 aumentó tanto el contenido como la fosforilación de cofilina (**Figura 15a**). A los 30 minutos la actividad de cofilina aumentó significativamente con todos los tratamientos (P_4 , RU486 y P_4 +RU486) respecto al vehículo, para los tres casos este aumento se debió a la disminución en la fosforilación de cofilina (**Figura 15b**). Por el contrario a los 60 minutos la actividad de cofilina disminuyó significativamente con todos los tratamientos con respecto al vehículo a consecuencia del aumento en la fosforilación (**Figura 15c**).

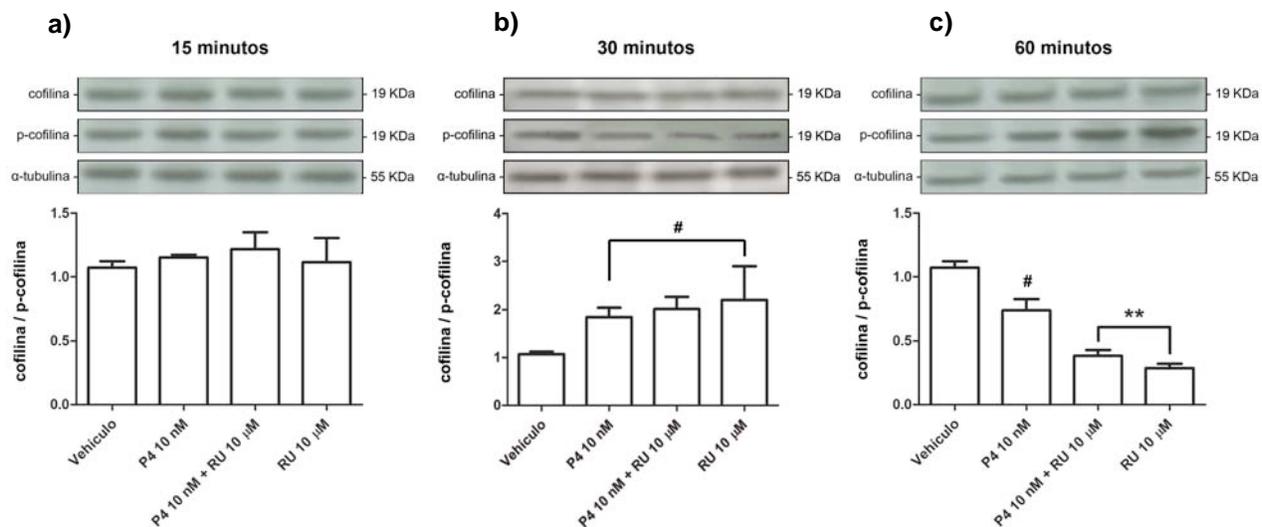


Figura 15. Efectos de la P_4 sobre el contenido y fosforilación de cofilina en células D54. Western Blots y gráficas representativas del análisis densitométrico de cofilina y p-cofilina con tratamiento con vehículo (CDX 0.02%), P_4 10 nM, el tratamiento conjunto (P_4 10 nM y RU486 10 µM) y RU486 10 µM a los 15, 30 y 60 minutos en células D54. Tanto cofilina como p-cofilina se normalizaron con α -tubulina antes de calcular el cociente de actividad. (#) $P < 0.05$ vs Vehículo. () $P < 0.05$ vs Vehículo y P_4 . Los resultados están representados como la media \pm EEM, $n=4$.**

10. Discusión

La migración celular es un término amplio que se utiliza para referirse a aquellos procesos que implican el traslado de las células de un lugar a otro. Las células migran en respuesta a múltiples estímulos a los que se encuentran sometidas. Algunos ejemplos de estos estímulos incluyen la búsqueda de nutrientes, eventos morfogénicos que requieren la movilización a distancia de células precursoras para generar nuevas estructuras, capas embrionarias u órganos durante la embriogénesis, organogénesis y regeneración, o la presencia de señales medioambientales que informan a las células la necesidad de su movimiento para la curación de heridas o la respuesta inmune (Horwitz y Webb, 2003; Janetopoulos y Firtel, 2008; Petrie et al., 2009). En patología, la producción anormal de señales migratorias puede inducir el movimiento del tipo de célula equivocada en el lugar equivocado que puede tener efectos perjudiciales en la homeostasis de los tejidos o de la salud del individuo en general. Algunos ejemplos incluyen síndromes autoinmunes como en la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple (Luster et al., 2005; Mackay, 2008).

La invasión celular involucra la penetración a través de las barreras de los tejidos como la membrana basal o del estroma intersticial. La invasión requiere adhesión, proteólisis de los componentes de la ECM y migración (Friedl y Wolf, 2003b). La migración e invasión celulares están estrechamente relacionadas por lo que no es posible invadir sin migrar, aunque la migración sin invasión si es posible.

En la mayoría de los diferentes tipos de cáncer, incluyendo los gliomas el principal obstáculo para la cura es la infiltración, proceso en el que se involucran tanto la migración como la invasión, lo cual permite a los tumores prevalecer a pesar de la resección quirúrgica completa y la quimioterapia y la radiación. Es por eso que en este trabajo se estudió el efecto de la P_4 en la migración e invasión en células D54 derivadas de un astrocitoma humano del mayor grado de malignidad.

Observamos que la P_4 induce la migración y que este fenómeno ocurre a través del RP, debido a que el tratamiento conjunto de P_4 +RU486 bloquea el efecto de la hormona reduciendo el número de células que migraron. Es importante mencionar que el aumento en el número de células que migraron con el tratamiento con P_4 , se debió solo a una mayor motilidad y no al aumento de la proliferación celular, ya que para este ensayo se utilizó Ara-C que es un inhibidor de la síntesis de DNA. El Ara-C entra a las células a través de un mecanismo transportador de nucleósidos, en el citoplasma el primer paso es la conversión a Ara-CMP mediante la enzima desoxicitidina cinasa, posteriormente es fosforilado a Ara-CTP, quien compite con el dCTP en la incorporación al DNA. La incorporación de AraC funciona como un potente inhibidor las DNA polimerasas α , β y δ , lo que interfiere con la elongación, tanto durante la replicación como con la reparación de las cadenas. Aunque la vida media de Ara-C es de menos de 1 hora en la mayoría de las líneas celulares, más del 80% de Ara-C se mantiene en el DNA hasta 24 horas (Grem et al., 1995; Grant, 1998).

Como se ha mencionado, debido a que para la infiltración de células de los glioblastomas a zonas del tejido cerebral sano involucra no sólo la motilidad de las células, sino que es un proceso más complejo en el que también se ha visto involucrada la acción de proteínas como las MMP, se decidió evaluar el efecto de la hormona también en un modelo *in vitro* de invasión celular, en el que indirectamente se observa la acción de estas proteínas. Cómo se describió en los resultados, la P_4 aumentó el número de células invasora y similar a lo que se observó en la migración, el efecto invasivo producido por la

hormona fue bloqueado por el RU486, lo que indica que también en la invasión participa el RP. En datos preliminares, hemos observado que tratamientos con P₄ y RU486 no modifican el contenido de la MMP-9, por lo que posiblemente esta proteína no participe en el efecto de invasión que observamos.

Efectos similares se han observado en células endoteliales y células de cáncer de mama, en los que tanto la P₄ como progestinas sintéticas como el acetato de medroxiprogesterona (MPA), drospirenona y nesterona promueven la migración e invasión (Fu et al., 2008a; Fu et al., 2008c). Adicionalmente, trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio han encontrado que la P₄ induce la proliferación y la infiltración de un tumor inducido mediante la implantación de células derivadas de un astrocitoma humano de grado III en la corteza motora de la rata a través de la interacción con el RP (Germán-Castelán et al., 2014). Este efecto puede ocurrir a través de diversos mecanismos, incluyendo la sobreexpresión de proteínas tales como la superóxido dismutasa, el factor tisular y los receptores activados por proteasas (Kato et al., 2005; Holley et al., 2009; Díaz et al., 2012), el aumento de la actividad de MMPs y del activador del factor de plasminógeno tipo urocinasa (Carnevale et al., 2007), la activación de cinasas de adhesión focal (Fu et al., 2010; Zheng et al., 2012), y la activación de cascadas de señalización que conducen a rápidos cambios en el citoesqueleto de actina y la membrana celular que se requieren para el movimiento celular (Fu et al., 2008b).

Con respecto a estos dos últimos eventos se ha demostrado que la P₄ promueve el movimiento celular facilitando la formación de complejos focales de adhesión mediante la fosforilación de cinasas de adhesión focal, así como la activación de ABP como moesina mediante una cascada de señalización que involucra la interacción del RP con la tirosina cinasa c-Src que activa a la vía fosfatilinositol-3 cinasa/Akt y al complejo de pequeñas GTPasas asociado a RhoA/Rho cinasas (Fu et al., 2008b; Fu et al., 2010; Zheng et al., 2012).

De manera muy interesante se encontró que el tratamiento con RU486 aumentó significativamente el número de células invasoras, aunque este aumento no es de una magnitud comparable como el que se observó con el tratamiento con P₄, es importante considerarlo. Existen dos tipos de motilidad de células individuales, el mesenquimal y el ameboide, en el mesenquimal se sigue el modelo de los cinco pasos de motilidad celular, en el tipo ameboide las células presentan menos adhesión por lo que

el movimiento depende en su mayor parte de re-arreglos del citoesqueleto. Las células cancerosas pueden modificar sus mecanismos de migración en respuesta a diferentes condiciones (Friedl y Wolf, 2003b). Estudios recientes han demostrado que el tratamiento con RU486 en células derivadas de tumores de cáncer de ovario, mama, próstata, y gliales aumenta la formación de *ruffles* de actina (protrusiones de actina de baja adhesión) y disminuye la capacidad de adhesión a diversos componentes de la ECM (Brandhagen et al., 2013). Tomando esto en consideración nuestros resultados podrían indicar que, la P_4 promueve una mayor invasión mediante el mecanismo mesenquimal, sin embargo, el RU486 en menor medida induce invasión por un mecanismo ameboide.

Para conocer los efectos de la P_4 sobre la organización del citoesqueleto de actina en células derivadas de astrocitoma humano de grado IV en los procesos de migración e invasión de estas células la estrategia utilizada fue mediante la detección por Western Blot de proteínas que participan en la dinámica de polimerización de actina como la cofilina que induce la formación de extremos (+) en los filamentos de actina (Ichetovkin et al., 2002; Arpin et al., 2011). Cofilina se ha visto implicada en procesos metastáticos en tumores como los de mama, ovario y páncreas, entre otros (Yahara et al., 1996; Tsukita et al., 1997; Martoglio et al., 2000; Unwin et al., 2003; Turhani et al., 2006; van Rheenen et al., 2009; Hua et al., 2012). Aunado a esto, hay evidencia de que la cofilina se expresa en astrocitomas y que su expresión se correlaciona con el grado de evolución tumoral (Nagai et al., 2011; Wu et al., 2013).

La activación de la vía de cofilina juega un papel central en la regulación de la polimerización de actina y la formación de estructuras en la membrana celular como los filopodia y lamelipodia, que son esenciales para la migración celular. La sobre-expresión de la cofilina se ha relacionado con la agresividad en diferentes tipos de cáncer. En líneas celulares derivadas de astrocitomas, la fosforilación de la cofilina en la Ser-3 es un modulador negativo clave en la función de la proteína (Nagai et al., 2011). Los resultados mostraron que la actividad de cofilina aumentó a los 30 minutos y disminuyó a los 60 minutos con los tratamientos de P_4 , P_4 +RU486 y RU486. Esto nos sugiere que tanto la P_4 , como el RU486 son capaces de modificar la actividad de cofilina y que en el caso de la P_4 el efecto podría ser independiente del RP.

Estudios realizados hasta el momento en células T47-D han demostrado, que en presencia de P_4 , el RP interactúa con la proteína $G\alpha$ lo que activa a la cascada de RhoA/ROCK, esto resulta en la activación de ABP y en cambios morfológicos en las células los cuales se han relacionado con migración e invasión (Fu et al., 2008b).

Tomando esto en consideración y nuestros resultados se puede sugerir que tanto la P_4 como el RU486, por distintos mecanismos, pueden inducir cambios en la morfología celular, sin embargo, otros componentes como los complejos de adhesión focal son determinantes para la motilidad.

El hecho de que el RU486 tenga efecto tanto en la invasión como en la activación de cofilina lleva a la necesidad plantear estrategias para definir mejor los efectos de la P_4 . Considerando que el RU486 es un antagonista parcial del RP, ya que aunque con menor afinidad, también antagoniza los efectos del receptor a glucocorticoides (Spitz 2003), se sugiere que podría utilizarse un antagonista puro de RP como la onapristona (ZK98299) o bien realizar el silenciamiento del RP.

11. Conclusión

- 1) La P_4 aumenta la migración e invasión de células derivadas de un astrocitoma humano de grado IV, a través de la interacción con su receptor intracelular.
- 2) La activación de cofilina, una proteína asociada a actina involucrada en la dinámica de polimerización de los filamentos de actina puede ser modulada, tanto por la P_4 , como por el antagonista RU486.

11. Referencias

- Abercrombie M, Dunn GA, Heath JP (1977) The shape and movement of fibroblasts in culture. *Soc Gen Physiol Ser*: 57-70.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K et al., (2008) *Molecular Biology of the Cell*. New York NY 10016, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 1601 p.
- Alcántara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li Y et al., (2009) Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell*: 45-56.
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA et al., (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*: 805-809.
- Arko L, Katsyv I, Park GE, Luan WP, Park JK (2010) Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacol Ther*: 1-36.
- Arpin M, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I (2011) Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr*: 199-206.
- Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL (2010) *Ganong, Fisiología médica*. México: Mc Graw Hill education. 720 p.
- Baulieu EE, Robel P (1990) Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(3): 395-403.
- Bigner SH, Mark J, Bigner DD (1983) Chromosomal composition of four permanent cultured cell lines derived from human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*: 335-349.
- Bigner SH, Mark J, Bigner DD (1990) Cytogenetics of human brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet*: 141-154.
- Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA et al., (2000) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature*: 1007-1011.
- Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ et al., (2007) The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol*: 359-375.
- Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM et al., (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell*: 269-280.
- Boyden S (1962) The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115: 453-466.
- Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G et al., (2008) Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*: 139-152.
- Brandhagen BN, Tieszen CR, Ulmer TM, Tracy MS, Goyeneche AA et al., (2013) Cytostasis and morphological changes induced by mifepristone in human metastatic cancer cells involve cytoskeletal filamentous actin reorganization and impairment of cell adhesion dynamics. *BMC Cancer*: 35.
- Bretscher MS (1996) Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell*: 601-606.
- Brooks PC, Klemke RL, Schon S, Lewis JM, Schwartz MA et al., (1997) Insulin-like growth factor receptor cooperates with integrin α v β 5 to promote tumor cell dissemination in vivo. *J Clin Invest*: 1390-1398.

- Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M et al., (2005) Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev*: 359-383.
- Burnet NG, Jefferies SJ, Benson RJ, Hunt DP, Treasure FP (2005) Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden--and should be considered when allocating research funds. *Br J Cancer*: 241-245.
- Cabrera-Muñoz E, Hernandez-Hernandez OT, Camacho-Arroyo I (2009) Role of progesterone in human astrocytomas growth. *Curr Top Med Chem*: 1663-1667.
- Cabrera-Muñoz E, González-Arenas A, Saqui-Salces M, Camacho J, Larrea F et al., (2011) Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*: 80-84.
- Cadepond F, Ulmann A, Baulieu EE (1997) RU486 (mifepristone): mechanisms of action and clinical uses. *Annu Rev Med*: 129-156.
- Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH (2000) Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*: 22607-22610.
- Camacho-Arroyo I (2003) Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in the brain. *Recent Research Developments in Life Sciences, Research Signpost*: : 221-242.
- Camacho-Arroyo I, Rodríguez-Dorantes M (2006) Transcriptional activity regulated by progesterone receptor isoforms. *Molecular Endocrinology, Research Signpost*: 25-38.
- Camacho-Arroyo I, González-Arenas A, González-Aguero G, Guerra-Araiza C, González-Moran G (2003) Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*: 447-452.
- Carnevale RP, Proietti CJ, Salatino M, Urtreger A, Peluffo G et al., (2007) Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways. *Mol Endocrinol*: 1335-1358.
- Carragher NO, Levkau B, Ross R, Raines EW (1999) Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin. *J Cell Biol*: 619-630.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP (2003) Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*: 771-778.
- Cramer LP (1999) Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp*: 173-205.
- Chen HC (2005) Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*: 15-22.
- Chen YH, Gutmann DH (2014) The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene*: 2019-2026.
- Chwalisz K, Brenner RM, Fuhrmann UU, Hess-Stumpp H, Elger W (2000) Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids*: 741-751.
- Daniel AR, Knutson TP, Lange CA (2009) Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity. *Mol Cell Endocrinol*: 47-52.
- De la Fuente BP, Dalmau J, Rosenfeld M (2007) [Glioma therapy up-date]. *Neurologia*: 159-169.
- Deakin NO, Turner CE (2008) Paxillin comes of age. *J Cell Sci*: 2435-2444.

- Degani S, Balzac F, Brancaccio M, Guazzone S, Retta SF et al., (2002) The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol*: 377-387.
- Demuth T, Berens ME (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol*: 217-228.
- Deryugina EI, Bourdon MA, Reisfeld RA, Strongin A (1998) Remodeling of collagen matrix by human tumor cells requires activation and cell surface association of matrix metalloproteinase-2. *Cancer Res*: 3743-3750.
- DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J (2005) Cofilin takes the lead. *J Cell Sci*: 19-26.
- Diaz J, Aranda E, Henriquez S, Quezada M, Espinoza E et al., (2012) Progesterone promotes focal adhesion formation and migration in breast cancer cells through induction of protease-activated receptor-1. *J Endocrinol*: 165-175.
- Dick JE (2008) Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*: 4793-4807.
- Dietrich J, Imitola J, Kesari S (2008) Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nat Clin Pract Oncol*: 393-404.
- Doherty GJ, McMahon HT (2008) Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annu Rev Biophys* 37.
- Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M et al., (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*: 433-473.
- Edwards DP (2000) The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*: 307-324.
- Edwards DP, Altmann M, DeMarzo A, Zhang Y, Weigel NL et al., (1995) Progesterone receptor and the mechanism of action of progesterone antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol*: 449-458.
- Egger G, Klemm C, Spindel S, Kaulfersch W, Kenzian H (1994) Migratory activity of blood polymorphonuclear leukocytes during juvenile rheumatoid arthritis, demonstrated with a new whole-blood membrane filter assay. *Inflammation*: 427-441.
- Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R et al., (2009) Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci*: 2405-2426.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell*: 489-498.
- Flamini MI, Sanchez AM, Goglia L, Tosi V, Genazzani AR et al., (2009) Differential actions of estrogen and SERMs in regulation of the actin cytoskeleton of endometrial cells. *Mol Hum Reprod*: 675-685.
- Friedl P, Brocker EB (2000) The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*: 41-64.
- Friedl P, Wolf K (2003a) Proteolytic and non-proteolytic migration of tumour cells and leucocytes. *Biochem Soc Symp*: 277-285.
- Friedl P, Wolf K (2003b) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*: 362-374.
- Friedl P, Maaser K, Klein CE, Niggemann B, Krohne G et al., (1997) Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44. *Cancer Res*: 2061-2070.
- Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T et al., (2012) Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*: 1080-1084.

- Fu XD, Flamini M, Sanchez AM, Goglia L, Giretti MS et al., (2008a) Progesterone regulates endothelial actin cytoskeleton and cell movement via the actin-binding protein moesin. *Mol Hum Reprod*: 225-234.
- Fu XD, Goglia L, Sanchez AM, Flamini M, Giretti MS et al., (2010) Progesterone receptor enhances breast cancer cell motility and invasion via extranuclear activation of focal adhesion kinase. *Endocr Relat Cancer*: 431-443.
- Fu XD, Giretti MS, Baldacci C, Garibaldi S, Flamini M et al., (2008b) Extra-nuclear signaling of progesterone receptor to breast cancer cell movement and invasion through the actin cytoskeleton. *PLoS One*: e2790.
- Fu XD, Giretti MS, Goglia L, Flamini MI, Sanchez AM et al., (2008c) Comparative actions of progesterone, medroxyprogesterone acetate, drospirenone and nesterone on breast cancer cell migration and invasion. *BMC Cancer*: 166.
- Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K (2001) Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*: 32-39.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM et al., (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*: 2683-2710.
- Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ (2009) Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update*: 119-138.
- Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Vignani P et al., (2007) PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod*: 317-322.
- Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Moran MG, Camacho-Arroyo I (2014) Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res Int*: 393174.
- Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS et al., (2004) Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science*: 743-746.
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V (1997) Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science*: 225-228.
- Giannini C, Scheithauer BW, Weaver AL, Burger PC, Kros JM et al., (2001) Oligodendrogliomas: reproducibility and prognostic value of histologic diagnosis and grading. *J Neuropathol Exp Neurol*: 248-262.
- Gohla A, Birkenfeld J, Bokoch GM (2005) Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol*: 21-29.
- González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón MA, Camacho-Arroyo I (2001) Progesterone receptor isoforms expression pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull*: 43-48.
- González-Agüero G, Gutiérrez AA, González-Espinosa D, Solano JD, Morales R et al., (2007) Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine*: 129-135.
- Graham CH, Connelly I, MacDougall JR, Kerbel RS, Stetler-Stevenson WG et al., (1994) Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-beta. *Exp Cell Res*: 93-99.
- Graham JD, Clarke CL (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*: 502-519.
- Graham JD, Clarke CL (2002) Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res*: 187-190.

- Grant S (1998) Ara-C: cellular and molecular pharmacology. *Adv Cancer Res* 72: 197-233.
- Grem JL, Geoffroy F, Politi PM, Cuddy DP, Ross DD et al., (1995) Determinants of sensitivity to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in HCT 116 and NCI-H630 human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol*: 305-315.
- Guerra-Araiza C, Gomora-Arrati P, Garcia-Juarez M, Armengual-Villegas A, Miranda-Martinez A et al., (2009) Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology*: 73-81.
- Hadjipanayis CG, Van Meir EG (2009) Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med*: 519-530.
- Hagan CR, Faivre EJ, Lange CA (2009) Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. *Steroids*: 568-572.
- Hansberg-Pastor V, Gonzalez-Arenas A, Pena-Ortiz MA, Garcia-Gomez E, Rodriguez-Dorantes M et al., (2013) The role of DNA methylation and histone acetylation in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in human astrocytoma cell lines. *Steroids*: 500-507.
- Henderson LP (2007) Steroid modulation of GABAA receptor-mediated transmission in the hypothalamus: effects on reproductive function. *Neuropharmacology*: 1439-1453.
- Hernández-Hernández OT, González-García TK, Camacho-Arroyo I (2012) Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*: 127-134.
- Higgs HN (2005) Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci*: 342-353.
- Holley AK, Kinningham KK, Spitz DR, Edwards DP, Jenkins JT et al., (2009) Progestin stimulation of manganese superoxide dismutase and invasive properties in T47D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*: 23-30.
- Horwitz R, Webb D (2003) Cell migration. *Curr Biol*: R756-759.
- Hua D, Ding D, Han X, Zhang W, Zhao N et al., (2012) Human miR-31 targets radixin and inhibits migration and invasion of glioma cells. *Oncol Rep*: 700-706.
- Hua JY, Smith SJ (2004) Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nat Neurosci*: 327-332.
- Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*: 673-687.
- Ichetovkin I, Grant W, Condeelis J (2002) Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr Biol*: 79-84.
- Ichimura K, Ohgaki H, Kleihues P, Collins VP (2004) Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. *J Neurooncol*: 137-160.
- Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K et al., (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*: 539-544.
- Janetopoulos C, Firtel RA (2008) Directional sensing during chemotaxis. *FEBS Lett*: 2075-2085.
- Kaibuchi K (1999) Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by Rho targets. *Prog Mol Subcell Biol*: 23-38.
- Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*: 459-486.
- Kamm KE, Stull JT (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276(7): 4527-4530.
- Kato S, Pinto M, Carvajal A, Espinoza N, Monso C et al., (2005) Progesterone increases tissue factor gene expression, procoagulant activity, and invasion in the breast cancer cell line ZR-75-1. *J Clin Endocrinol Metab*: 1181-1188.

- Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K et al., (2001) Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. *J Cell Biol*: 569-584.
- Kedrin D, van Rheenen J, Hernandez L, Condeelis J, Segall JE (2007) Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*: 143-152.
- Kleinman HK, Martin GR (2005) Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15(5): 378-386.
- Kros JM, Gorlia T, Kouwenhoven MC, Zheng PP, Collins VP et al., (2007) Panel review of anaplastic oligodendroglioma from European Organization For Research and Treatment of Cancer Trial 26951: assessment of consensus in diagnosis, influence of 1p/19q loss, and correlations with outcome. *J Neuropathol Exp Neurol*: 545-551.
- Lamszus K, Kunkel P, Westphal M (2003) Invasion as limitation to anti-angiogenic glioma therapy. *Acta Neurochir Suppl*: 169-177.
- Lange CA, Shen T, Horwitz KB (2000) Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 1032-1037.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*: 359-369.
- Le Clainche C, Carlier MF (2008) Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*: 489-513.
- Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, De Neve N, Maris C et al., (2012) A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One*: e45475.
- Leonhardt SA, Edwards DP (2002) Mechanism of action of progesterone antagonists. *Exp Biol Med (Maywood)*: 969-980.
- Leopoldt D, Hanck T, Exner T, Maier U, Wetzker R et al., (1998) Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem*: 7024-7029.
- Li Y, Wang JP, Santen RJ, Kim TH, Park H et al., (2010) Estrogen stimulation of cell migration involves multiple signaling pathway interactions. *Endocrinology*: 5146-5156.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y (2011) Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*: 387-391.
- Liu T, Ogle TF (2002) Signal transducer and activator of transcription 3 is expressed in the decidualized mesometrium of pregnancy and associates with the progesterone receptor through protein-protein interactions. *Biol Reprod*: 114-118.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC et al., (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*: 97-109.
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*: 1182-1190.
- Mackay CR (2008) Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol*: 988-998.
- Magdalena J, Millard TH, Etienne-Manneville S, Launay S, Warwick HK et al., (2003) Involvement of the Arp2/3 complex and Scar2 in Golgi polarity in scratch wound models. *Mol Biol Cell*: 670-684.
- Mahajan DK, London SN (1997) Mifepristone (RU486): a review. *Fertil Steril*: 967-976.
- Mani S (2008) Progesterin receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology*: 2750-2756.

- Martoglio AM, Tom BD, Starkey M, Corps AN, Charnock-Jones DS et al., (2000) Changes in tumorigenesis- and angiogenesis-related gene transcript abundance profiles in ovarian cancer detected by tailored high density cDNA arrays. *Mol Med*: 750-765.
- Matsukado Y, Maccarty CS, Kernohan JW (1961) The growth of glioblastoma multiforme (astrocytomas, grades 3 and 4) in neurosurgical practice. *J Neurosurg*: 636-644.
- Mellon SH, Griffin LD (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab*: 35-43.
- Mentlein R, Hattermann K, Held-Feindt J (2012) Lost in disruption: role of proteases in glioma invasion and progression. *Biochim Biophys Acta*: 178-185.
- Miller HM, Foxcroft GR, Squires J, Aherne FX (1999) The effects of feed intake and body fatness on progesterone metabolism in ovariectomized gilts. *J Anim Sci*: 3253-3261.
- Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD et al., (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol*: 791-805.
- Mogilner A, Oster G (2003) Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys J*: 1591-1605.
- Moriyama K, Iida K, Yahara I (1996) Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells*: 73-86.
- Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL (1999) Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*: 2963-2971.
- Murakami R, Hirai T, Kitajima M, Fukuoka H, Toya R et al., (2008) Magnetic resonance imaging of pilocytic astrocytomas: usefulness of the minimum apparent diffusion coefficient (ADC) value for differentiation from high-grade gliomas. *Acta Radiol*: 462-467.
- Nagai S, Moreno O, Smith CA, Ivanchuk S, Romagnuolo R et al., (2011) Role of the cofilin activity cycle in astrocytoma migration and invasion. *Genes Cancer*: 859-869.
- Nagata-Ohashi K, Ohta Y, Goto K, Chiba S, Mori R et al., (2004) A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J Cell Biol*: 465-471.
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*: 23-28.
- Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R (2011) Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer*: 177-187.
- Nussey S, Whitehead S (2001) *Endocrinology: An Integrated Approach*. UK: BIOS Scientific Publishers Limited. 365 p.
- O'Connell LA, Matthews BJ, Patel SB, O'Connell JD, Crews D (2011) Molecular characterization and brain distribution of the progesterone receptor in whiptail lizards. *Gen Comp Endocrinol*: 64-74.
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M et al., (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem*: 2446-2451.
- OMS OMdIS (2015) Cáncer. Nota Descriptiva 297. Centro de Prensa.
- Oser M, Condeelis J (2009) The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J Cell Biochem*: 1252-1262.
- Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM (2009) Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 538-549.
- Pfaff M, Du X, Ginsberg MH (1999) Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains. *FEBS Lett*: 17-22.
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*: 453-465.

- Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*: 1208-1212.
- Pooley KA, Healey CS, Smith PL, Pharoah PD, Thompson D et al., (2006) Association of the progesterone receptor gene with breast cancer risk: a single-nucleotide polymorphism tagging approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*: 675-682.
- Potter DA, Tirnauer JS, Janssen R, Croall DE, Hughes CN et al., (1998) Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol*: 647-662.
- Raaijmakers HC, Versteegh JE, Uitdehaag JC (2009) The X-ray structure of RU486 bound to the progesterone receptor in a destabilized agonistic conformation. *J Biol Chem*: 19572-19579.
- Reddy DS (2010) Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res* 186: 113-137.
- Regen CM, Horwitz AF (1992) Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol*: 1347-1359.
- Ren XD, Bokoch GM, Traynor-Kaplan A, Jenkins GH, Anderson RA et al., (1996) Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Mol Biol Cell*: 435-442.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T et al., (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*: 221-231.
- Sameni M, Doseescu J, Sloane BF (2001) Imaging proteolysis by living human glioma cells. *Biol Chem*: 785-788.
- Sánchez AM, Flamini MI, Baldacci C, Goglia L, Genazzani AR et al., (2010) Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. *Mol Endocrinol*: 2114-2125.
- Sánchez AM, Flamini MI, Fu XD, Mannella P, Giretti MS et al., (2009) Rapid signaling of estrogen to WAVE1 and moesin controls neuronal spine formation via the actin cytoskeleton. *Mol Endocrinol*: 1193-1202.
- Scarpin KM, Graham JD, Mote PA, Clarke CL (2009) Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal*: e009.
- Scheithauer BW, Fuller GN, VandenBerg SR (2008) The 2007 WHO classification of tumors of the nervous system: controversies in surgical neuropathology. *Brain Pathol*: 307-316.
- Schulke JP, Wochnik GM, Lang-Rollin I, Gassen NC, Knapp RT et al., (2010) Differential impact of tetratricopeptide repeat proteins on the steroid hormone receptors. *PLoS One*: e11717.
- Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C et al., (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci*: 10.
- Schwartz MA, Shattil SJ (2000) Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci*: 388-391.
- Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M (2006) Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nat Clin Pract Neurol*: 494-503; quiz 491 p following 516.
- Seftor RE, Seftor EA, Koshikawa N, Meltzer PS, Gardner LM et al., (2001) Cooperative interactions of laminin 5 gamma2 chain, matrix metalloproteinase-2, and membrane type-1-matrix/metalloproteinase are required for mimicry of embryonic vasculogenesis by aggressive melanoma. *Cancer Res*: 6322-6327.
- Simoncini T, Scorticati C, Mannella P, Fadiel A, Giretti MS et al., (2006) Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/moesin pathway. *Mol Endocrinol*: 1756-1771.

- Singh M, Su C, Ng S (2013) Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. *Front Neurosci*: 159.
- Spitz IM (2003) Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. *Steroids*: 981-993.
- SSA SdS (2013) Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. In: SPPS SdPyPdIS, editor.
- Tam EM, Wu YI, Butler GS, Stack MS, Overall CM (2002) Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. *J Biol Chem*: 39005-39014.
- Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, Mesiano S (2012) Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*: E719-730.
- Taylor D, Pearce CL, Hovanessian-Larsen L, Downey S, Spicer DV et al., (2009) Progesterone and estrogen receptors in pregnant and premenopausal non-pregnant normal human breast. *Breast Cancer Res Treat*: 161-168.
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*: 442-454.
- Tihan T, Bloomer MM (2010) Astrocytic neoplasms of the central nervous system and orbit: a morphologic perspective. *Semin Diagn Pathol*: 114-121.
- Tonn JC, Goldbrunner R (2003) Mechanisms of glioma cell invasion. *Acta Neurochir Suppl*: 163-167.
- Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S (1997) ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem Sci*: 53-58.
- Tsutsumi S, Gupta SK, Hogan V, Collard JG, Raz A (2002) Activation of small GTPase Rho is required for autocrine motility factor signaling. *Cancer Res*: 4484-4490.
- Turhani D, Krapfenbauer K, Thurnher D, Langen H, Fountoulakis M (2006) Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *Electrophoresis*: 1417-1423.
- Unwin RD, Craven RA, Harnden P, Hanrahan S, Totty N et al., (2003) Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics*: 1620-1632.
- van Rheenen J, Condeelis J, Glogauer M (2009) A common cofilin activity cycle in invasive tumor cells and inflammatory cells. *J Cell Sci*: 305-311.
- Verkhovskiy AB, Svitkina TM, Borisy GG (1995) Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *J Cell Biol*: 989-1002.
- Villamar-Cruz O, Manjarrez-Marmolejo J, Alvarado R, Camacho-Arroyo I (2006) Regulation of the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors SRC-1 and SMRT by the 26S proteasome in the rat brain during the estrous cycle. *Brain Res Bull*: 276-281.
- Ward RD, Weigel NL (2009) Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation. *Biofactors*: 528-536.
- Wear MA, Schafer DA, Cooper JA (2000) Actin dynamics: assembly and disassembly of actin networks. *Curr Biol*: R891-895.
- Wegner A (1976) Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*: 139-150.
- Wu M, Liu DY, Yuan XR, Liu Q, Jiang XJ et al., (2013) The expression of moesin in astrocytoma: correlation with pathologic grade and poor clinical outcome. *Med Oncol*: 372.
- Xie Z (2009) Brain tumor stem cells. *Neurochem Res*: 2055-2066.

- Yahara I, Aizawa H, Moriyama K, Iida K, Yonezawa N et al., (1996) A role of cofilin/destrin in reorganization of actin cytoskeleton in response to stresses and cell stimuli. *Cell Struct Funct*: 421-424.
- Yap CT, Simpson TI, Pratt T, Price DJ, Maciver SK (2005) The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner. *Cell Motil Cytoskeleton*: 153-165.
- Zamir E, Geiger B (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*: 3583-3590.
- Zeng L, Si X, Yu WP, Le HT, Ng KP et al., (2003) PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol*: 137-146.
- Zheng S, Huang J, Zhou K, Zhang C, Xiang Q et al., (2011) 17beta-Estradiol enhances breast cancer cell motility and invasion via extra-nuclear activation of actin-binding protein ezrin. *PLoS One*: e22439.
- Zheng S, Huang J, Zhou K, Xiang Q, Zhang Y et al., (2012) Progesterone enhances vascular endothelial cell migration via activation of focal adhesion kinase. *J Cell Mol Med*: 296-305.