



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE

FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Participación de las cinasas MLCK y ROCK, en la tensión cortical,
organización del citoesqueleto de actina y migración de la línea celular
GH3”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Dulce Guadalupe Ávila Rodríguez

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

Fisiología Celular y Molecular

Directoras de Tesis: Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido

Dra. Alma Ortiz Plata

Ciudad de México

Febrero, 2017

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de becario: 244955). Así mismo con el apoyo del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro De Investigación y De Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el programa de doctorado en la especialidad de Fisiología, Celular y Molecular. El trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias y de la Dra. Alma Ortiz plata del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.



AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias todos los que están y estuvieron para que al fin llegará este momento.

A la Dra. Malú por abrirme las puertas de su laboratorio y por siempre estar disponible para cualquier duda, comentario o chisme.

A la Dra. Alma Ortiz Plata por su buena disposición, sus comentarios y sugerencias en el desarrollo del proyecto.

Gracias a mi comité tutorial: Dra. Liora shohani y Dra. Febe Cázares por siempre mantenerme en el camino, y sus críticas constructivas para mejorar el proyecto. A la Dra. Laura Arreola y al Dr. Gerardo Contreras por los comentarios al trabajo.

A mi familia por estar al pendiente, y darme aliento cuando lo necesitaba.

Gracias a mis compañeros de laboratorio: Cesar Toríz, Alejandro García, Jorge Castañeda y Giovanhi Gómez, los cuales hicieron más amenas las horas de trabajo en el laboratorio. Gracias Ale y César por las experiencias compartidas y por los tantos cafés (negros como nuestra alma).

Gracias a la Bióloga Carmen solano Agama por siempre estar en la mejor disposición para apoyarme en la realización del proyecto y por siempre tener una sonrisa incluso cuando las circunstancias no eran las mejores, gracias a la Q.F.B. Teresa de la vega por los momentos agradables que compartimos, espero sigan siendo muchos. Gracias al Sr. Osvaldo Ríos, por siempre brindarme ayuda cuando la necesité y sobre todo por su amistad.

A mis amigos: Elizabeth bautista, José Luis Cortés y Justino Hernández por los consejos, las críticas, las grandes platicas ya sean de momentos buenos o de frustración, nadie más que nosotros entendemos realmente como es este proceso dulce-amargo de obtener nuestro título de doctor en ciencias.

RESUMEN

La organización del citoesqueleto de actina y la arquitectura de la membrana regulan la forma celular en respuesta al microambiente donde la matriz extracelular es un componente indispensable. La habilidad de las células de cambiar entre los diferentes modos de migración se denomina plasticidad celular y les permite a las células “elegir” el tipo de migración que presentan de acuerdo al microambiente en el que se encuentran. La línea celular GH3, derivada de un adenoma hipofisiario de rata, responde diferente ante distintas proteínas de matriz extracelular, adquiriendo una forma redonda cuando son sembradas sobre la Colágena tipo I-III y una elongada cuando son sembradas sobre la Colágena tipo IV. Sin embargo, la identidad de las moléculas que participan en esta respuesta permanece sin elucidarse por completo. Considerando que la contracción de la actina-miosina es crucial para el mantenimiento de la forma, analizamos la participación de la MLCK y la ROCK en la adquisición de la forma celular, la generación de tensión y el tipo de migración. Nuestros resultados muestran que las células redondas tienen una mayor tensión, y que esta es dependiente de ambas cinasas, MLCK y ROCK, mientras que en las células que presentan forma alargada, la MLCK es la principal cinasa responsable de la extensión sobre el sustrato. Además, la función de MLCK predomina en células con un movimiento lento y persistente en dirección, mientras que la actividad de la ROCK favorece un movimiento rápido y azaroso, este comportamiento también se relaciona con la activación de las Rho GTPasas. Las células sobre Colágena tipo I-III presentaron una mayor actividad de Rho que células sobre C IV y al contrario que Rho, Rac aumento su actividad en células cultivadas sobre C IV, mostrando una respuesta plástica de las células las células GH3 a su microambiente, favoreciendo la generación de diferentes arreglos del citoesqueleto de actina y membrana plasmática y por lo tanto, resultado en dos estrategias de movimiento, una similar a la ameboidea y otra similar a la fibroblastoide.

SUMMARY

Cytoskeletal organization and the cell membrane architecture together regulate cell morphology in response to the cell environment, wherein the extracellular matrix is an indispensable component. The ability to change between the different modes of cell migration is named plasticity, and this plasticity enables cells to adapt their migration mode to their surroundings. GH3 endocrine cells respond to different ECM proteins, acquiring a rounded morphology on Collagen type I-III and an elongated morphology on Collagen type IV. However, the identities of the molecules that participate in these responses remain unknown. Considering that actin-myosin contractility is crucial to maintaining cell shape, we analyzed the participation of MLCK and ROCK in the acquisition of cell shape, the generation of cellular tension and the development of the cell motility mode. We found that a rounded shape with high cortical tension depends on both, MLCK and ROCK, whereas in cells with an elongated shape, MLCK is the primary protein responsible for cell spreading. Further, MLCK function predominated in cells with a slow and directionally persistent motility, while ROCK activity correlated with a rapid and erratic movement. This behavior also correlates with Rho GTPase activation. Cells on Collagen type I-III exhibited higher Rho activity than cells on Collagen type IV, and contrary to Rho, Rac activity is higher on Collagen type IV showing a plastic response of GH3 cells to their environment, leading to the generation of different cytoskeleton and membrane organizations and resulting in two movement strategies, amoeboid-like and fibroblastoid-like.

Índice de figuras

Figura 1. La polimerización de la actina ocurre en tres fases.	2
Figura 2. Arquitecturas de la actina.	5
Figura 3. Tensión del córtex	7
Figura 4. Estructura de la miosina II.	9
Figura 5. Dominios estructurales de la MLCK (isoforma larga) y mecanismo de activación.	11
Figura 6. Dominios estructurales de la ROCK.	12
Figura 7. Migración mesenquimatososa.	14
Figura 8. Formación de los blebs.	18
Figura 9. Reguladores río abajo de la familia de proteínas Rho GTPasas.	21
Figura 10. Estructura de las colágenas.	24
Figura 11. Colágena tipo I-III y colágena tipo IV.	25
Figura 12. Afinidad de los heterodímeros de integrinas.	26
Figura 13. Vía de señalización de la cinasa Src.	29
Figura 14. Vía de señalización de NEDD9.	30
Figura 15. Vías de señalización que regulan el tipo de motilidad ameboidea y mesenquimatososa.	31
Figura 16. Cambios en las colágenas en los adenomas hipofisarios.	32
Figura 17. El arreglo del citoesqueleto de actina de células provenientes de adenomas hipofisarios.	34
Figura 18. Organización de la membrana de células GH3 sembradas sobre Colágena tipo I-III y Colágena IV.	35
Figura 19. Viabilidad celular.	50
Figura 20. La inhibición farmacológica de la MLCK y la ROCK induce diferentes efectos en la forma celular.	52
Figura 21. La inhibición farmacológica de Rac induce una forma redonda.	54
Figura 22. El silenciamiento de la MLCK y la ROCK induce cambios en la forma celular.	56
Figura 23. Localización subcelular de la MLCK y la ROCK.	57
Figura 24. Organización y dinámica de la membrana.	60
Figura 25. Tensión del córtex.	61
Figura 26. Fosforilación de la cadena ligera de la miosina.	63
Figura 27. Efecto de la inhibición de la MLCK y la ROCK en la regulación espacial de la fosforilación de la MLC y la F-actina.	66
Figura 28. Arreglo del citoesqueleto de actina.	68
Figura 29. Efectos de la inhibición de la MLCK y la ROCK en la migración	70

celular.	
Figura 30. Migración de células deficientes de la MLCK y la ROCK	72
Figura 31. Efectos de la inhibición de las Rho-GTPasas en la migración celular.	75
Figura 32. Células de cultivo primario de adenohipófisis de rata adulta.	77
Figura 33. Modelo esquemático de la participación de la MLCK y la ROCK en células GH3 sembradas sobre C I-III y sobre C IV.	85

Índice de tablas

Tabla 1. Participación de MLCK y ROCK en proceso celulares.	13
Tabla 2. clasificación de adenomas hipofisarios	33
Tabla 3. Secreción de la Prolactina y de la hormona de crecimiento en el medio de cultivo	76

Índice de cajas

Caja 1. Proteínas reguladoras de la actina.	3
Caja 2. Proteínas clave que unen a las integrinas con el citoesqueleto de actina	27
Caja 3. Adenomas hipofisarios	33

Índice de contenido

Agradecimientos al CONACYT	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Summary	IV
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VI
Índice de cajas	VI
Índice de contenido	VII
I. Introducción	1
• Forma celular y citoesqueleto de actina	1
• Diversidad de las arquitecturas de actina	4
• Interacciones del citoesqueleto de actina y de la membrana plasmática	5
• Tensión de la membrana y del citoesqueleto de actina	6
• Miosina II (no muscular)	7
• Regulación de la miosina II por la fosforilación de la cadena ligera de la miosina	8
• Cinasas que regulan la fosforilación de la cadena ligera de la miosina	10
• La MLCK	
• La ROCK	11
• Participación de la MLCK y la ROCK	13
• Migración celular	13
• Migración mesenquimatososa	14
• 1. Protrusiones de membrana	14
2. Adhesión al sustrato	15
3. Translocación y retracción	15
• Migración ameboidea	16
• Ciclo de vida de los blebs	17
1. Iniciación y expansión	17
2. Polimerización de la actina y retracción	18
• Migración ameboidea en tres dimensiones	19
• Plasticidad en los modos de migración	19
• Familia de proteínas Rho GTPasas	20
• Rho GTPasas en la migración celular	20

• Hipófisis	22
• Matriz extracelular en las células adenohipofisarias	22
• Las Colágenas	23
• La Colágena tipo I y la colágena tipo III	24
• La Colágena tipo IV	25
• Adhesión célula-sustrato mediada por las integrinas.	26
• Vía de señalización de las integrinas	27
• Señalización de proteínas tirosina cinasa	28
• Vía de señalización de Src	28
• Vía de señalización de EphA2	29
• Señalización de miembros de la familia Cas	30
• Reguladores de las Rho GTPasas	31
• Cambios en la síntesis de colágena en los adenomas hipofisarios	32
• Arreglo del citoesqueleto de adenomas hipofisarios	34
• La matriz extracelular regula la forma de las células GH3	34
II. Planteamiento del problema	36
III. Hipótesis	37
IV. Objetivo general	37
V. Objetivos específicos	37
VI. Materiales y métodos	38
1.Reactivos, proteínas y anticuerpos	38
2. Preparación de superficies cubiertas con C I-III y C IV.	39
3.Cultivo de la línea celular GH3 y cultivo primario de adenohipófisis	40
4. Tratamiento farmacológico.	41
5.Tratamiento con pequeños RNAs de interferencia	41
6.Migración celular	41
7. Evaluación de la forma celular.	42
8. Evaluación del área celular	42
9. Activación de RhoA y Rac 1/2/3	43
10. Inmunocitoquímica	44
11. Lisados celulares, SDS-PAGE y Western blot	45
12. Adhesión celular (Método de cristal violeta)	46
13. Viabilidad celular (método de MTT)	47
14.Microscopia electrónica de barrido	47

15. Microscopia de fuerza atómica	47
16. Secreción de la prolactina y hormona de crecimiento	48
17. Análisis estadístico	48
VII. Resultados	49
• La MLCK regula la forma alargada de las células y el área adosada al sustrato; mientras que ROCK participa en el mantenimiento de la forma redonda de las células GH3	50
• El silenciamiento de la MLCK y la ROCK	55
• Las cinasas MLCK y ROCK se localizan en sitios distintos	57
• Participación de la MLCK y la ROCK en la organización y dinámica de la membrana	58
• La fosforilación de la MLC es dependiente de la colágena	62
• El arreglo del citoesqueleto de actina depende del sustrato y de la participación de las cinasas	67
• La actividad de la MLCK y la ROCK es diferencial en la motilidad de las células GH3	68
• La participación de las Rho-GTPasas en la motilidad de las células GH3 depende del sustrato	73
• La secreción de las hormonas es modulada por el tipo de colágena y la participación de las cinasas	75
• Cultivo primario de hipófisis	76
VIII. Discusión	77
• Papel de la MLCK y la ROCK en la definición de la forma celular	77
• Participación de la MLCK y la ROCK en la tensión cortical y la dinámica de las protrusiones de membrana	79
• Participación de las cinasas MLCK y ROCK en la motilidad celular	81
• Participación de las Rho-GTPasas en la migración celular	82
• Secreción de hormonas y tensión del córtex	83
• Señalización de las colágenas a través de las Integrinas	84
IX. Conclusiones	85
X. Perspectivas	86
XI. Referencias	87

I. Introducción

La forma de las células es dinámica y depende del balance de fuerzas de contracción que favorecen una forma más compacta y fuerzas de extensión que favorecen el aumento de los límites de las células y les permiten asumir una forma menos compacta. Ambos tipos de fuerza son importantes durante procesos celulares, como la locomoción y la remodelación de la matriz extracelular (MEC) ya sea en condiciones fisiológicas normales o en condiciones patológicas.

Forma celular y citoesqueleto de actina

Las células animales tienen la capacidad de modificar su forma para adaptarse a su microambiente durante los procesos celulares de locomoción, adhesión, y división celular (Blanchoin *et al.*, 2014; Bergert *et al.*, 2012). La capacidad de modificar dicha forma recae en el proceso dinámico de polimerización y despolimerización de la actina. La polimerización y despolimerización de la actina son procesos bioquímicos en los cuales los monómeros de actina globular se unen o se separan en un proceso que requiere hidrólisis de ATP (Figura 1). Los filamentos de actina son polares, con un extremo más (+) donde se une preferentemente la actina globular (actina-G) y un extremo menos (-) donde los monómeros preferentemente se disocian de los filamentos (actina-F; Pollard y Borisy, 2003).

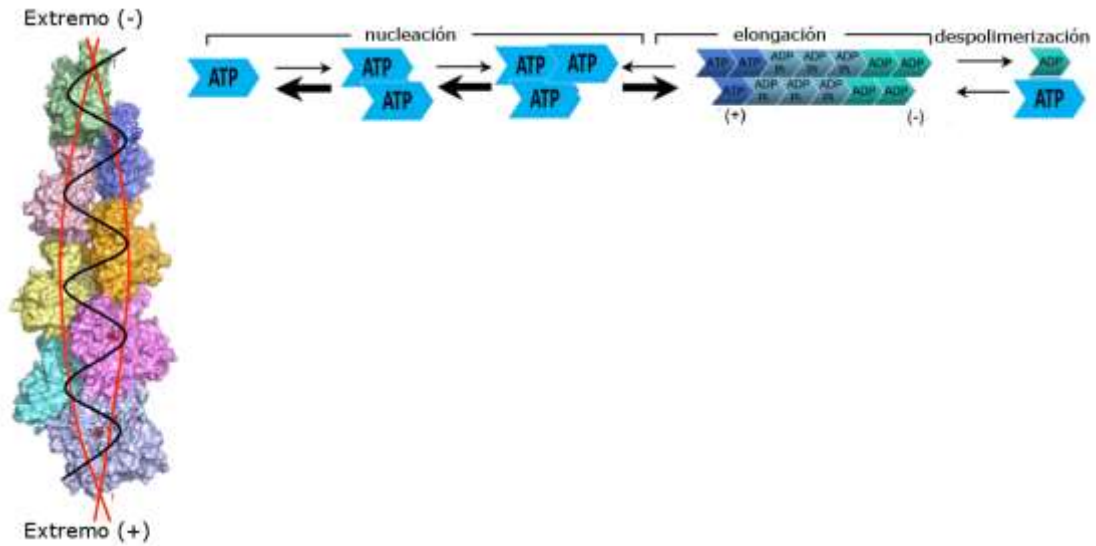


Figura 1. La polimerización de la actina ocurre en tres fases. En la fase inicial de nucleación los monómeros de ATP-actina globular (ATP) forman complejos estables de actina. Esto núcleo se alarga con mayor rapidez en la segunda fase mediante la adición de subunidades a ambos extremos del filamento. Los monómeros de ATP-actina se unen más rápido en el extremo (+) que en el extremo (-). En la tercera fase, los extremos de los filamentos de actina se encuentran en un estado estacionario con el complejo ATP-actina globular. Después de la incorporación en los filamentos, las subunidades se hidrolizan lentamente y se transforman en complejos estables de actina ADP-actina filamentosos. Modificada de Dominguez R, 2009.

El citoesqueleto de actina forma parte de un sistema que detecta tanto las fuerzas externas aplicadas a la célula como las propiedades mecánicas del entorno de la misma. Este sistema puede influir en diversos aspectos de la función celular, incluyendo la expresión de genes y la diferenciación (Discher *et al.*, 2009). El citoesqueleto de actina es regulado por diversas proteínas que controlan la nucleación, la polimerización, la estabilidad y la arquitectura de los filamentos de actina (Caja 1; Kaksonen *et al.*, 2006; Pollard y Cooper, 2009).

Caja 1. Proteínas reguladoras de la actina.

Proteínas involucradas en la nucleación de los filamentos de actina.

Existen principalmente dos tipos de proteínas nucleadoras de la polimerización de la actina: el complejo Arp2/3 (acrónimo en inglés para Actin-Related Proteins) y la familia de las forminas, mDia1 y mDia2 (acrónimo en inglés para Mammalian Diaphanous-related formin 1 y 2) (Bovellan *et al.*, 2014). El complejo Arp2/3 está formado por siete subunidades conservadas incluyendo las dos proteínas asociadas a la actina Arp2 y Arp3 además de ArpC1, ArpC2, ArpC3, ArpC4 y ArpC5 (Higgs *et al.*, 2001). El complejo Arp2/3 se localiza en el frente de migración celular donde se une a filamentos de actina existentes y promueve la extensión de nuevos filamentos con un ángulo de 70 ° con respecto al filamento de actina previamente existente (Weaver *et al.*, 2003). Este complejo está bajo el control de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) (acrónimo en inglés para Wiskott-Aldrich syn-drome protein), que a su vez están bajo el control de la familia de proteínas Rho-GTPasas, Rac y CDC42 (Pollitt e Insall, 2009).

Las forminas, mDia1 y mDia2, contienen un dominio homólogo a formina 1, un dominio homólogo a formina 2 y un dominio de unión a la GTPasa Rho (Waller *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2010). A diferencia del complejo Arp2/3, las forminas promueven la nucleación y polimerización de filamentos lineales de actina. mDia1 y mDia2 están bajo el control de la GTPasa Rho y participa en la formación de fibras de estrés (Watanabe *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2010)

Proteínas polimerizadoras y despolimerizadoras.

ADF/Cofilina

ADF/cofilina (acrónimo en inglés para Actin-depolymerizing factor) es una familia de proteínas pequeñas (15–20 kDa) que interactúan con la actina, promoviendo la despolimerización de la misma y regulando la longitud de los filamentos de actina (Carrier *et al.*, 1997). La cofilina se une a los filamentos de actina el extremo (-), despolimerizándolos y creando más extremos (+). La ADF/Cofilina realiza una función de corte de microfilamentos que no están protegidos mediante proteínas Cap (las cuales se unen a los extremos barbados libres bloqueando su crecimiento y contracción) y posee afinidad por la ADP-actina. Los monómeros resultantes pueden ser reciclados por la profilina, otra proteína asociada a actina que facilita el cambio de ADP a ATP de los monómeros de actina, lo cual facilita su polimerización (Ghosh *et al.*, 2004).

Profilina

Profilina es una proteína globular (15 kDa) de unión a actina involucrada en el equilibrio dinámico del ensamblaje del citoesqueleto de actina, profilina promueve el ensamblaje de filamentos de actina actuando como intercambiador de nucleótidos, sin embargo dependiendo del contexto celular profilina puede inhibir o promover la polimerización de la actina (Pantaloni *et al.*, 1993; Witke *et al.*, 2004). La profilina es la única proteína de unión a actina que permite el intercambio de ATP por ADP.

Gelsolina

La superfamilia de gelsolina consiste en siete proteínas diferentes: gelsolina, adseverina, villina, capG, advillina, supervillina y flightless. El miembro más representativo de la familia, gelsolina, es una proteína de 82 a 84 kDa. Gelsolina promueve la despolimerización de la actina y promueve la cubierta (capping) en el extremo (+) (Kwiatkowski, 1999).

Diversidad de las arquitecturas de actina

La actina se polimeriza en filamentos con distintos tipos de organización. Dependiendo del número de filamentos y las proteínas asociadas se forman estructuras de actina como arcos, diferentes tipos de fibras de estrés (dorsales, ventrales), lamelipodios y filopodios (Figura 2). Estas estructuras se interconectan, son altamente dinámicas y se encuentran en un estado de remodelación constante influenciado por el microambiente. Además actúan como elementos mecánicos para que se lleven a cabo los cambios en la forma celular que permiten la adquisición de un modo de migración (Blanchoin *et al.*, 2014).

Los **arcos de actina** son estructuras largas formadas por haces gruesos de filamentos de actina que proveen soporte estructural a la célula. Las **fibras de estrés** son haces gruesos de filamentos (aproximadamente entre 10 y 30 filamentos de actina) organizadas de manera paralela. Estas fibras de estrés generalmente se anclan en la región ventral de la célula y terminan en estructuras de adhesión conocidas como adhesiones focales, las cuales conectan a las proteínas de matriz extracelular con el citoesqueleto de actina. La GTPasa Rho-A es un regulador crucial de la formación de las fibras de estrés (Hotulainen *et al.*, 2006). Los **lamelipodios** son estructuras parecidas a abanicos, que contienen filamentos de actina en redes entrecruzadas y ramificadas. Generalmente detrás del lamelipodio hay una estructura denominada lamela en donde los filamentos de actina se organizan en haces en lugar de estar ramificados (Ponti *et al.*, 2004). La formación del lamelipodio comienza con la despolimerización de actina por la proteína despolimerizadora, cofilina, lo que provee fragmentos libres de actina que actúan como sitios de polimerización y nucleación para nuevos filamentos. El complejo Arp2/3 promueve la formación de redes ramificadas (Ridley, 2011). Los **filopodios** son estructuras largas y delgadas que emerge de la membrana, están formadas por actina filamentosa organizada en haces

paralelos de actina. Los filopodios son principalmente regulados por la GTPasa Cdc42.

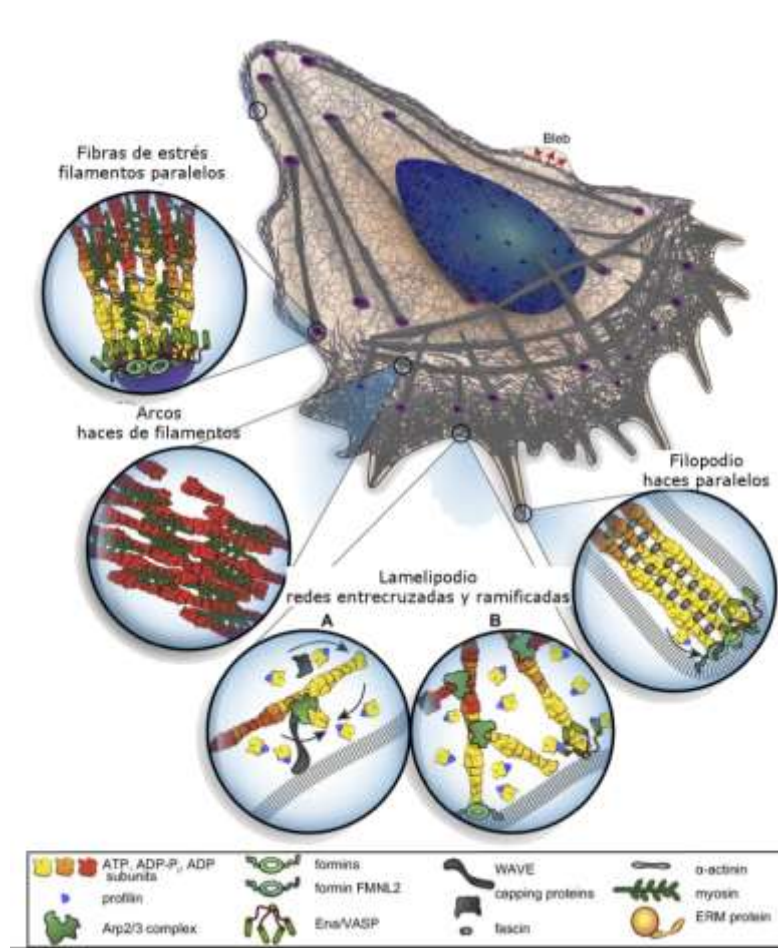


Figura 2. Arquitecturas de la actina. La actina se polimeriza en filamentos con distintos tipos de organización. Dependiendo del número de filamentos y las proteínas asociadas se forman estructuras de actina como arcos, diferentes tipos de fibras de estrés (dorsales, ventrales), lamelipodios y filopodios o bien la despolimerización de la actina da pie a unas estructuras particulares denominadas blebs. Modificada de Blanchoin *et al.*, 2014.

Interacciones del citoesqueleto de actina y de la membrana plasmática

La membrana plasmática es una bicapa lipídica que delimita a las células y es la barrera física entre el espacio intracelular y extracelular. La membrana está compuesta por lípidos, fosfolípidos, glicolípidos, colesterol y proteínas (Spector y Yorek, 1985). La organización de la membrana está íntimamente ligada con la forma celular y las protrusiones de membrana (Keren *et al.*, 2011; Sheetz *et al.*, 2001; Diz-Muñoz *et al.*, 2013; Gauthier *et al.*, 2012).

Todas las estructuras de la actina descritas previamente (Figura 2), existen en cercana yuxtaposición a la membrana plasmática. Una estructura de filamentos de actina, que no se mencionó anteriormente, donde se asocian el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática es el córtex celular. El córtex celular es una estructura contráctil que está formada por una red de filamentos de actina y miosina que subyace cerca de la membrana celular, ambas estructuras se unen mediante proteínas que participan como intermediarios (Morone *et al.*, 2006; Bovellan *et al.*, 2014). Esta simple asociación entre la membrana y citoesqueleto de actina nos sugiere que ambas estructuras pueden regularse por sus propiedades mecánicas generando fuerza mecánica o tensión de membrana.

Tensión de la membrana y del citoesqueleto de actina

La tensión de la membrana es un factor importante en la fisiología de la célula ya que regula la motilidad, las transiciones de la forma y la dinámica en la extensión de las protrusiones de membrana (Bergert *et al.*, 2012; Keren *et al.*, 2008). Así mismo, la tensión de la membrana regula la actividad de muchas proteínas incluyendo la polimerización de la actina y el equilibrio entre la endocitosis y exocitosis. (Keren *et al.*, 2008; Mogilner y Keren, 2009; Sheetz, 2001; Sheetz y Dai, 1996). Al hablar de tensión es importante poner especial atención a algunos conceptos, ya que la tensión de la membrana, tensión cortical y tensión de la célula son diferentes mecanismos de fuerza que pueden llegar a confundirse. La tensión cortical refleja la participación de la red de actina y miosina (Figura 3), donde la contracción depende de la actividad de la proteína motora miosina (Gauthier *et al.*, 2012). Por otro lado, la tensión de la membrana refleja las propiedades de la bicapa de fosfolípidos, independientemente de cómo ésta interactúe con la red de actina-miosina subyacente (Sens y Plastino, 2015; Dai y Sheetz, 1999; Sheetz *et al.*, 2006). De acuerdo a Blanchoin y colaboradores (2014), la suma de estas dos tensiones, es decir, la tensión de la membrana y la

tensión cortical da como resultado la tensión del córtex. Sin embargo, la contribución exacta de cada elemento dependerá del contexto celular.

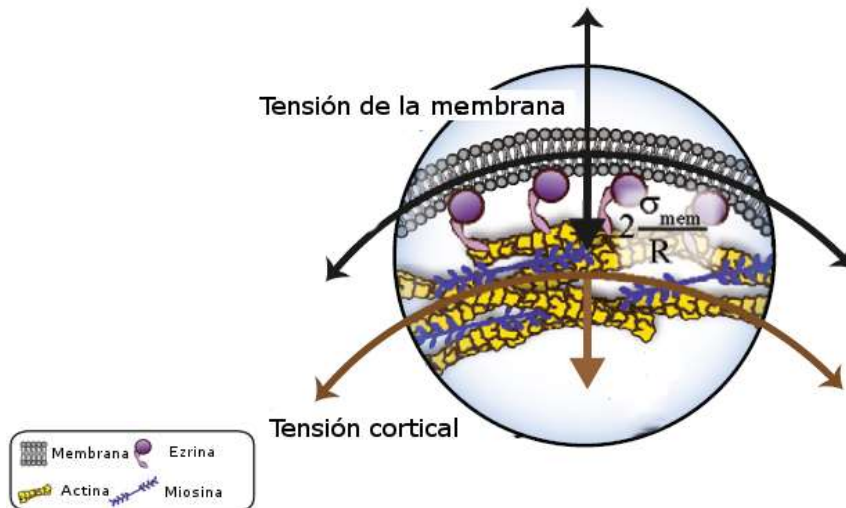


Figura 3. Tensión del córtex. La tensión del córtex es la suma de la tensión cortical (flecha café) generada por la red de actina y miosina y la tensión de la membrana (flecha negra) generada por la bicapa de fosfolípidos. Modificada de Sens y Plastino, 2015.

La tensión de la membrana y la tensión de la actina cortical se influyen y regulan la una a la otra. Por lo tanto, la polimerización en el frente de migración dependerá de la tensión de la membrana (Raucher y Sheetz, 2000; Keren *et al.*, 2008), y de igual manera, la tensión de la membrana dependerá del conjunto de fuerzas ejercidas por el citoesqueleto de actina y la miosina. Se ha observado que el silenciamiento de la proteína Ezrina, la cual une directamente el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática (Bretscher *et al.*, 2002), conlleva a una caída en la tensión de la membrana (Rouven *et al.*, 2015).

Miosina II (no muscular)

La proteína motora miosina II no muscular actúa como un regulador maestro de la forma de la células a través de la generación de tensión interna. La miosina II está compuesta por dos cadenas pesadas de 230 kDa, que contienen el dominio globular que une a la actina y al ATP, una región de

cuello que une a las cadenas ligeras y las cadenas esenciales (Winkelmann *et al.*, 1984), dos cadenas ligeras MLC1 y MLC2 de 20 kDa (acrónimo en inglés para Mynosin Light Chain), las cuales modulan la actividad de la miosina; dos cadenas ligeras esenciales de 17 kDa que estabilizan la estructura de las cadenas pesadas (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009) y una región de cola la cual se homodimeriza en hélice (Figura 4).

Regulación de la miosina II por la fosforilación de la cadena ligera de la miosina

La regulación de la miosina II involucra la fosforilación reversible de aminoácidos específicos presentes en las cadenas ligeras. La miosina se encuentra en un estado inactivo con las cadenas pesadas dobladas y el dominio de unión a la actina oculto, cuando ocurre la fosforilación de la MLC, ésta adquiere una conformación activa, con el dominio de cola extendido, los sitios de unión a la actina expuestos y con la capacidad de unirse a la actina (Figura 4). Diversas cinasas fosforilan a la MLC, incluyendo a la cinasa de la cadena ligera de la miosina, MLCK (acrónimo en inglés para Mynosin light chain kinase) y la cinasa asociada a la proteína Rho, ROCK (acrónimo en inglés para Rho-associated protein kinase).

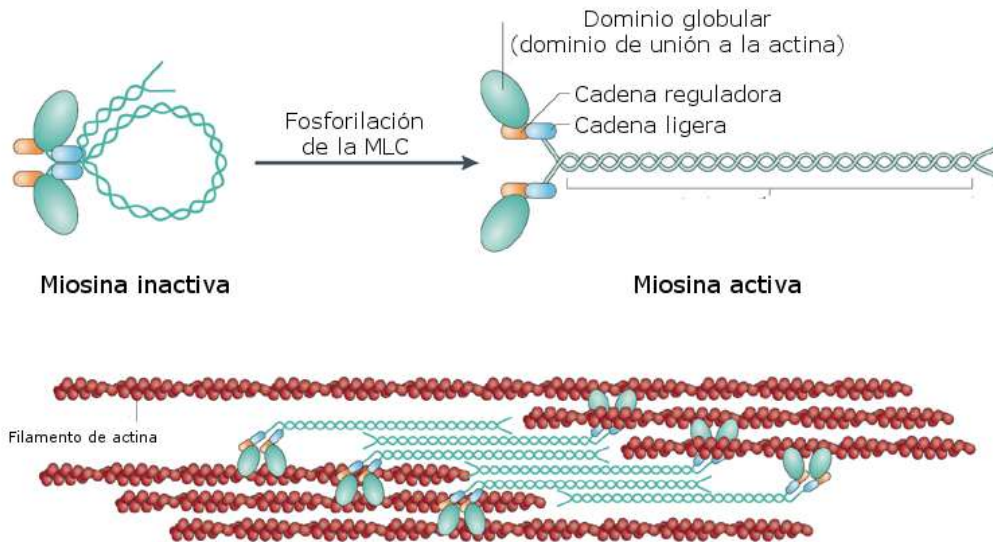


Figura 4. Estructura de la miosina II. La miosina está formada por dos cadenas pesadas (230 kDa), 2 cadenas ligeras (20 kDa) y 2 cadenas esenciales (17 kDa). La miosina se encuentra en un estado inactivo con el dominio de unión a la actina oculto, cuando ocurre la fosforilación de la MLC, la miosina adquiere una conformación activa en la cual se asocia con los filamentos de actina y mediante la hidrólisis de ATP, genera tensión entre ellos. Modificada de Vicente-manzanares *et al.*, 2009.

La fosforilación de la MLC es crucial para la regulación de la contracción de la actina-miosina (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009). Sin embargo, el estatus de fosforilación de la MLC, no sólo depende de la actividad de las cinasas, sino del balance entre la actividad de las cinasas y la fosfatasa de la subunidad reguladora de la miosina, MYPT1 (acrónimo en inglés para myosin phosphatase-targeting sub unit 1; Alessi *et al.*, 1992). Esta fosfatasa es una holoenzima que consiste de tres subunidades: una grande (130 kDa) capaz de unirse a la miosina, una subunidad catalítica de 38 kDa (PP1c δ) y una subunidad pequeña de 20 kDa cuya función no se conoce. En algunos casos, la actividad de la MLC es regulada principalmente a través de la inactivación de la fosfatasa (Somlyo y Somlyo, 2003).

Cinasas que regulan la fosforilación de la cadena ligera de la miosina

La MLCK

La MLCK es una cinasa serina/treonina dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, codificada por el gen *Mylk*. La MLCK fosforila a la MLC principalmente en el residuo de Serina 19 (Ser-19) y, secundariamente, el de Treonina 18 (Tre-18), el cual se fosforila más lento que el primero y cuya fosforilación requiere mayor concentración de la MLCK (Ikebe *et al.*, 1986). De acuerdo a Ikebe y Hartshorne (1985), la actividad de ATPasa de la miosina es diferente cuando se fosforila únicamente el residuo de Ser-19 que cuando se fosforilan ambos residuos, siendo mayor la actividad enzimática de la miosina cuando está bifosforilada.

Isoformas de la MLCK

Diferentes isoformas de la MLCK se generan por el procesamiento alternativo del gen *Mylk*. Se conocen la isoforma corta y la larga. Además, se puede generar una región C-terminal que contiene un módulo de inmunoglobulina, denominada Telokina (Gallagher y Herring, 1991; Lazar y Garcia, 1999; Kamm y Stull, 2001). La isoforma corta o “muscular” que pesa de 125 a 155 kDa, contiene un dominio catalítico que une Mg^{2+} -ATP, estructuralmente relacionado con cinasas de serina y treonina, como las de la familia PAK (acrónimo en inglés para p21 activated kinases; Gallagher *et al.*, 1997), un segmento regulador involucrado en la activación dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, un dominio involucrado en la autoinhibición, tres dominios semejantes a inmunoglobulina, un motivo semejante a fibronectina y finalmente una secuencia de unión a la actina en la región N-terminal. La isoforma larga “no muscular” pesa de 206 a 220 kDa y es idéntica a la corta, además de contener una extensión en tándem de dos motivos más de unión a la actina y seis dominios más semejantes a inmunoglobulina (Figura 5; Kamm y Stull, 2001).

El regulador más importante de la actividad de la MLCK es el Ca^{2+} . La actividad de esta cinasa se aumenta aproximadamente 1,000 veces en respuesta a un incremento de calcio intracelular (Tsukamoto y Kitakaze, 2013). El calcio se une a la calmodulina, formando el complejo Ca^{2+} /calmodulina, enseguida la calmodulina sufre un cambio de conformación que le permite interactuar con el dominio de unión a la calmodulina presente en la MLCK, lo cual desplaza el dominio de autoinhibición y permite que se exponga el sitio catalítico (Chin y Means, 2000).

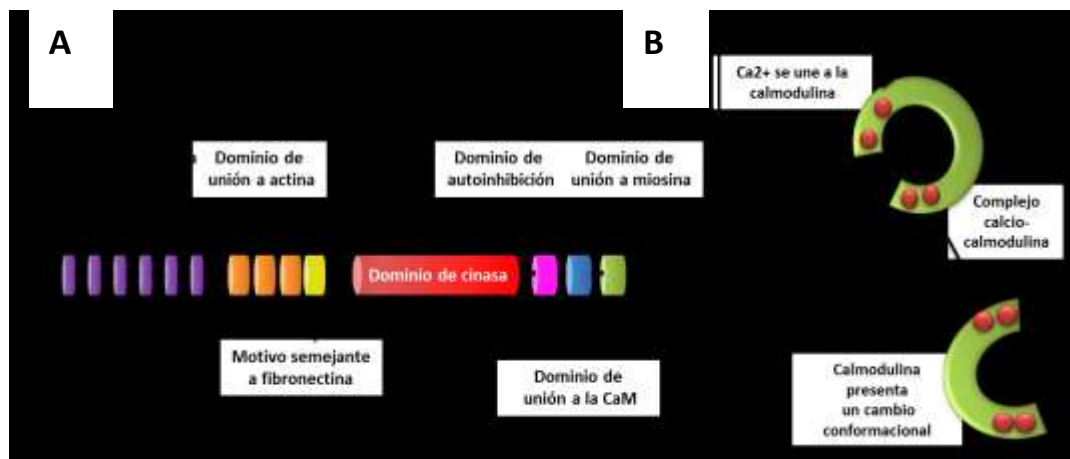


Figura 5. Dominios estructurales de la MLCK (isoforma larga) y mecanismo propuesto de la activación de la MLCK. (A) dominios de la MLCK. (B) El calcio se une a la calmodulina, formando el complejo Ca^{2+} /calmodulina, enseguida la calmodulina sufre un cambio de conformacional que le permite interactuar con el dominio de unión a la calmodulina presente en la MLCK, lo cual desplaza el dominio de autoinhibición y permite que se exponga el sitio catalítico. Kamm y Stull, 2001.

La ROCK

La ROCK es una cinasa de serina/treonina dependiente de la GTPasa Rho. Existen dos isoformas de la cinasa ROCK I y ROCK II, con un 65 % y un 92 % de identidad en su secuencia de aminoácidos y en su dominio de cinasa, respectivamente. ROCK contiene su dominio de cinasa en el amino terminal,

en seguida el dominio enrollado (Coiled-coil) que contiene el sitio de unión a Rho RBD (acrónimo del inglés para Rho binding domain), un dominio de unión a plecstrina (PH) y un domino rico en cisteínas (CRD; Figura 6; Riento y Ridley, 2003; Mueller *et al.*, 2005). El dominio del carboxilo terminal forma un asa de autoinhibición que se pliega en el dominio catalítico y reduce la actividad de cinasa (Amano *et al.*, 1999). Se ha sugerido que la forma activa de la GTPasa Rho (Rho-GTP) activa a la ROCK mediante su unión al sitio RBD exponiendo la interacción del dominio catalítico con la MLC.

La ROCK ejerce sus funciones sobre la cadena ligera de la miosina mediante dos acciones: fosforilando a la subunidad de unión de la miosina de la fosfatasa de cadena ligera de la miosina (MYPT1); inactivándola (Kimura *et al.*, 1996), o bien, fosforilando directamente a la MLC. Ambas acciones conllevan a un aumento en la fosforilación de la MLC y la generación de contracción.

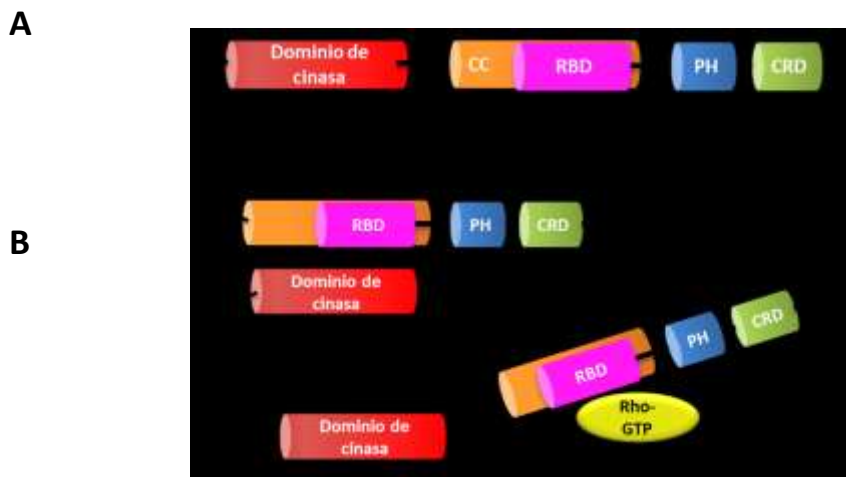


Figura 6. Dominios estructurales de la ROCK. (A) Dominio de cinasa, CC: dominio enrollado que contiene al dominio RBD: Dominio de unión a Rho, PH: dominio de peckstrina, CRD: dominio rico en cisteínas. (B) mecanismo propuesto de la activación de ROCK. El dominio del carboxilo terminal forma un asa de autoinhibición que se pliega en el dominio catalítico y reduce la actividad de cinasa. Se ha sugerido que la forma activa de la GTPasa Rho (Rho-GTP) activa a la ROCK mediante su unión al sitio RBD exponiendo la interacción del dominio catalítico con la MLC. Riento y Ridley, 2003.

Participación de la MLCK y la ROCK

Las cinasas de la cadena ligera de la miosina regulan la forma celular a través de la generación de tensión de la actina-miosina (Tabla 1).

Tabla 1. Participación de MLCK y ROCK en proceso celulares.			
Tipo celular	Participación de la MLCK	Participación de la ROCK	Referencia
Queratinocitos de embriones de pez cebra	Influencia la polaridad aumentando la fosforilación de la MLC en el lamelipodio	Fosforila a la MLC en la parte trasera de la célula.	Lou <i>et al.</i> , 2015
Queratinocitos humanos	Induce la formación de los lamelipodios y favorece un aumento en la migración	Disminuye las protrusiones de membrana y la migración	Sarkar <i>et al.</i> , 2009
Fibroblastos	Fosforila a la MLC en los lamelipodios.	Fosforila a la MLC en la región central de la célula, promoviendo la formación de fibras de estrés	Totsukawa <i>et al.</i> , 2004; Katoh <i>et al.</i> , 2001.
Células T humanas	Se activa en el frente de migración e induce extensión sobre el sustrato	Regula la fosforilación de la MLC en la parte trasera de la célula	Smith <i>et al.</i> , 2003
Adenocarcinoma de rata	La inhibición de la MLCK reduce la invasión	-	Tohtong <i>et al.</i> , 2003.
Células de musculo liso	Aumenta la estabilidad de las protrusiones de membrana	-	Chen <i>et al.</i> , 2014
Línea celular MDA-MB-231	Aumenta la migración celular a través de la vía de señalización p38/MAPK	-	Wang <i>et al.</i> , 2013

Migración celular

La migración celular es un proceso esencial en el desarrollo de órganos y tejidos, la reparación de heridas, la respuesta inmune (Luster *et al.*, 2005) y la invasión y diseminación de células tumorales a tejidos (Bravo-Cordero *et al.*, 2012), entre otros procesos biológicos.

Las células que migran individualmente lo pueden hacer utilizando dos formas distintas de migración: mesenquimatosa o ameboidea, dependiendo del microambiente en el que se encuentra la célula.

Migración mesenquimatososa

Las células que migran utilizando el tipo de migración mesenquimatososa, típicamente, son alargadas y ejercen tracción en el sustrato mediante adhesiones focales asociadas a lamelipodios o filopodios.

El proceso de migración mesenquimatoso “tradicionalmente” se presenta en ciclos de cuatro etapas: protrusión, adhesión, translocación y retracción.

1. Protrusiones de membrana

Para migrar eficientemente, las células deben estar polarizadas, es decir, presentar una organización asimétrica del citoesqueleto para generar un frente y una parte posterior, por lo cual el primer evento que se presenta en una célula en movimiento es la polarización y generación de un frente de migración. La formación de protrusiones de membrana requiere la integración de diversos procesos celulares, la fuerza para deformar la membrana es provista por el citoesqueleto de actina, la polimerización de la actina es el evento que empuja la membrana hacia el frente. Además ocurre una reorganización del núcleo, del aparato de Golgi y del centro organizador de los microtúbulos (COMT), hacia la dirección de movimiento, esta reorganización de estas estructuras define la direccionalidad durante la migración (Vicente-Manzanares, 2005).

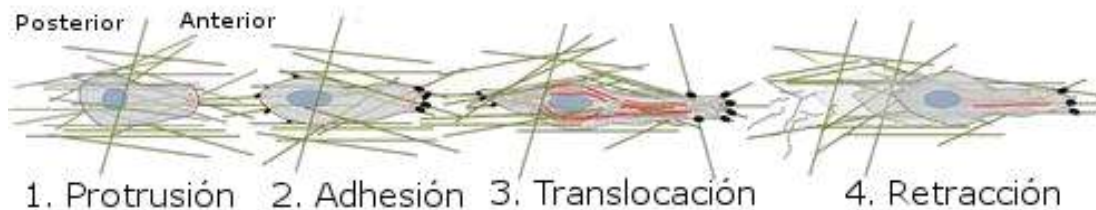


Figura 7. Migración mesenquimatososa. 1. Protrusión: la célula extiende protrusiones de membrana hacia la dirección del movimiento. 2. Adhesión: Las extensiones se adhieren al sustrato y forman complejos de adhesión. 3. Translocación: El cuerpo de la célula se mueve hacia la dirección del movimiento. 4. Retracción: se desensamblan las adhesiones focales en la región posterior de la célula y retracción de la célula hacia la dirección del movimiento. La imagen muestra fibroblastos en un sistema de dos dimensiones. Modificada de https://www1.ethz.ch/ltnt/research/interface/cell_migration

2. Adhesión al sustrato

Las protrusiones de membrana recién generadas deben ser capaces de generar fuerza y formar adhesiones con el sustrato mediante proteínas de la familia de las integrinas (Giannone *et al.*, 2007). Las primeras adhesiones en formarse en el frente de migración se denominan nacientes y son pequeñas y transitorias. En fibroblastos las adhesiones nacientes pueden desensamblarse rápidamente, en aproximadamente 60 segundos, y recambiarse o bien madurar hasta formar complejos focales (Parsons *et al.*, 2010). Los complejos focales, son adhesiones maduras de aproximadamente un 1 μm de diámetro y están físicamente unidas a través de haces robustos de actina y miosina (Alexandrova *et al.*, 2008). Conforme el ciclo de migración continua, los complejos focales pueden desensamblarse o seguir madurando en adhesiones focales, típicamente de 2 μm de ancho y de 3-10 μm de largo, que se localizan al final de las fibras de estrés que se extienden del frente al centro o bien atraviesan todo el cuerpo de la célula (Zimmerman *et al.*, 2004).

La presencia de adhesiones nacientes y complejos focales es una característica de células altamente motiles, el recambio de estas adhesiones se correlaciona directamente con la velocidad de protrusión y por lo tanto del movimiento. Los componentes moleculares de los complejos de adhesión y de las adhesiones nacientes son similares, sin embargo, algunas proteínas cambian cuando las adhesiones maduran en respuesta a la tensión por ejemplo zixina y tensina. La formación, maduración y recambio en el frente de migración ocurre en respuesta a diferentes señales como la composición de la MEC y factores de crecimiento (Zamir *et al.*, 1999).

3. Translocación y retracción

En la última etapa de la migración celular la contracción mediada por la actina-miosina genera la fuerza necesaria para retraer el cuerpo de la célula

hacia la dirección de movimiento y para desensamblar las adhesiones que permanecen en la parte posterior de la célula (Ridley *et al.*, 2003). Posteriormente ocurre la retracción de la parte distal de la célula anclada al substrato y el desplazamiento neto de la célula. La tensión necesaria para que este paso ocurra, se lleva a cabo mediante la contracción coordinada del citoesqueleto de actina-miosina (Lauffenburger, 1996). Morfológicamente, para que una célula se mueva de un modo direccionado, la nueva protrusión y las nuevas adhesiones se deben formar en el mismo frente de la célula, es decir, si la nueva protrusión se forma distante de la protrusión previa, la célula se moverá cambiando la dirección de la línea original de migración. Múltiples ciclos de protrusiones no direccionadas llevaría a un movimiento azaroso (Petrie *et al.*, 2009). Además se ha descrito que la habilidad de las células de migrar de un modo direccionado, está estrechamente regulada por el citoesqueleto de actina y la distribución de fuerzas. Harn y colaboradores (2016) observaron que para que una célula presente un movimiento direccionado y persiste los filamentos de actina del frente de migración deben presentar una mayor tensión que los de la parte posterior.

Migración ameboidea

El otro modo de migración individual es la ameboidea, este se presenta en los leucocitos, durante la diapédesis. La migración ameboidea se caracteriza por la formación de protrusiones de membrana esféricas, denominadas blebs. Mientras que los lamelipodios se generan por la polimerización de la actina, los blebs se forman por la contracción de la actina-miosina, por lo tanto es más un evento físico que químico (Charras *et al.*, 2005). Estas protrusiones de membrana se han observado en células en migración principalmente en cultivos en tres dimensiones. Originalmente, se consideraban indicadores de la apoptosis, sin embargo, en los últimos años se reconocen como protrusiones de membrana involucradas en la homeostasis de la forma celular (Charras y Paluch, 2008). Para un número de células tumorales, la migración mediada por blebs es una alternativa

común a la motilidad basada en lamelipodios. Las células que adoptan la migración dependiente de blebs, forman adhesiones focales débiles y transitorias con la MEC y una mayor capacidad de movimiento (Yoshida y Soldati, 2006). La velocidad de migración de una célula con el patrón de migración ameboidea es a menudo mayor que la presentada por las células con el patrón de migración mesenquimatoso (Pankova *et al.*, 2010). Adicionalmente, las células con migración ameboidea organizan al citoesqueleto de actina en una malla de actina cortical que les permite tener la tensión necesaria para mantener su forma redonda (Yoshida y Soldati, 2006).

Ciclo de vida de los blebs

Durante la migración ameboidea, la formación de los blebs se lleva a cabo en ciclos de dos etapas: iniciación y expansión, y polimerización de la actina y retracción (Figura 8).

1. Iniciación y expansión

Los blebs se generan en respuesta a dos acontecimientos: despolimerización local de la actina cortical o bien separación localizada de la membrana plasmática y la actina. Esta separación de la membrana y la actina cortical se lleva a cabo por la contracción local del córtex de actina y está mediada por la miosina II (Cunningham *et al.*, 1995; Paluch *et al.*, 2005). La presión hidrostática del citoplasma empuja a la membrana plasmática permitiendo que esta región se expanda rápidamente (dentro de los primeros 30 segundos), entonces el citoplasma fluye hacia la protrusión recién generada, aumentando el volumen de los blebs. Estas protrusiones de membrana tienen entre 1 y 10 μm de diámetro, cuando se están formando carecen de actina u otras estructuras del citoesqueleto (Charras *et al.*, 2005). Una vez que la presión se equilibra, los blebs dejan de crecer. Se ha observado que el volumen final de los blebs es dependiente de la tensión de la membrana (Tinevez *et al.*, 2009; Charras *et al.*, 2008).

2. Polimerización de la actina y retracción

En este paso se reclutan al bleb proteínas que unen la membrana del bleb al citoesqueleto de actina, como la ezrina, y enseguida, la actina comienza a re-polimerizarse y la expansión del bleb se detiene. Finalmente, la contracción de la actina-miosina, genera la tensión necesaria para retraer el bleb (Charras y Paluch, 2008) y continuar el ciclo de formación de los blebs.

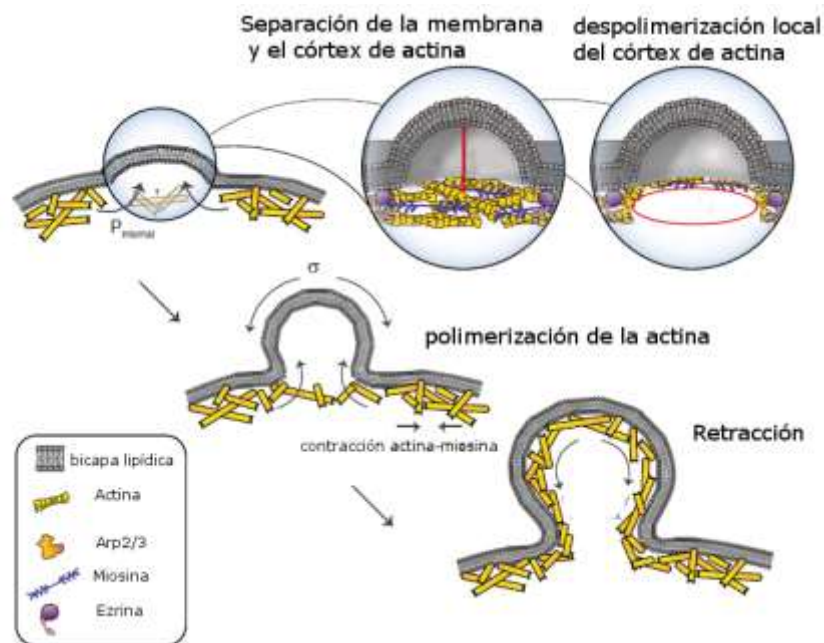


Figura 8. Formación de los blebs. La formación de los blebs puede ocurrir como resultado de una separación de la membrana y el córtex de actina o por una despolimerización local del córtex de actina. La presión hidrostática del citoplasma empuja la membrana incrementando el volumen del bleb. Enseguida, ocurre re-polimerización de la actina y la expansión del bleb se detiene, se recluta la miosina y la contracción de actina-miosina permite que el bleb se retraiga. Modificada de Sens y Plastino, 2015.

Cabe mencionar que el término “ameboideo” es frecuentemente usado para describir un tipo de motilidad de células sin protrusiones típico de *Dictyostelium discoideum*, sin embargo este término es confuso ya que la motilidad de este organismo es dependiente de la polimerización de la actina en el frente de migración, por lo anterior se ha considerado usar el término

de “movimiento de células redondas” en lugar del término ameboideo para denominar el modo de motilidad dependiente de la contracción de la actina-miosina. De igual modo se ha propuesto el término de “motilidad de células alargadas” para describir el movimiento de tipo fibroblastoide (Sanz-Moreno y Marshall, 2010)

Migración ameboidea en tres dimensiones

En un sistema tridimensional de fibras de colágeno, las células tumorales de fibrosarcoma (línea celular HT-1080) no requieren degradación de la MEC, más bien la contracción del citoesqueleto de actina-miosina en un extremo de las células les permite introducirse entre los espacios que dejan las fibras de la colágena (Wolf *et al.*, 2003).

Plasticidad en los modos de migración

La habilidad de las células de cambiar el modo de migración se denomina plasticidad celular. Con esta plasticidad las células pueden “elegir” el tipo de migración más adecuado al microambiente en el que se encuentran. Liu y colaboradores (2015) mostraron que una célula cambia de un tipo de migración mesenquimatoso, en condiciones de fuerte adhesión en un espacio no confinado, a un tipo de migración ameboidea, en un espacio confinado y en condiciones de baja adhesión. Por otro lado, Bergert y colaboradores (2012) demostraron que la transición de blebs a lamelipodios ocurre, principalmente, cuando se favorece la polimerización de la actina y se disminuye la tensión de la membrana, mientras que la transición de lamelipodios a blebs se favorece si la adhesión disminuye, y aumenta la tensión de la membrana.

Familia de proteínas Rho GTPasas

La familia de proteínas Rho GTPasas está constituida por Rho (A, B y C), Rac (1 y 2) y Cdc42, y son cruciales para la migración porque regulan la polimerización del citoesqueleto de actina (Hall, 1998; Riento y Ridley 2003). Las Rho GTPasas hidrolizan GTP, e intercambian GDP (estado inactivo) por GTP (estado activo). Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs, Guanine nucleotide exchange factors, por sus siglas en inglés) favorecen la conversión de la forma inactiva (unida a GDP) por la forma activa (unida a GTP), lo cual resulta en la activación de las proteínas. Por el contrario, las proteínas activadoras de las GTPasas (GAPs, GTPase activating proteins, por sus siglas en inglés), estimulan la actividad de GTPasa, lo cual lleva a una conversión de la forma unida a GTP a su forma unida a GDP. Además, existen otros reguladores de las Rho GTPasas, los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs, guanine nucleotide dissociation inhibitors, por sus siglas en inglés) los cuales mantienen a las GTPasas en una forma inactiva en el citosol (Ridley *et al.*, 2001).

Rho GTPasas en la migración celular

La actividad de la GTPasa Rho, se ha relacionado con la formación de fibras de estrés y la generación de contracción. La GTPasa Rho ejerce sus efectos de contracción a través de la activación de sus efectores, la cinasa ROCK y la proteína nucleadora mDia (Leung *et al.*, 1996; Ishizaki *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 1996). En células con migración mesenquimatosa, Rac se localiza en el frente de migración donde favorece la polimerización de la actina. (Nobes *et al.*, 1999). La GTPasa Rac ejerce sus efectos en la polimerización de la actina a través del complejo WAVE/Scar, el cual activa a Arp2/3 o a la cinasa de serina-treonina PAK, que fosforila a proteínas implicadas en la migración, como la MLCK, disminuyendo la contracción y favoreciendo la extensión de

la célula. Sin embargo, PAK también fosforila directamente a la cadena ligera de la miosina, lo cual induce un aumento en la contracción. La predominancia de uno u otro mecanismo parece depender de la diferente regulación de la actividad de PAK (Vicente-Manzanares *et al.*, 2005). Por otro lado, la GTPasa Cdc42 es un mediador de la polaridad de la célula y también participa en la polimerización de la actina, generando filopodios. Algunos de los efectores de Cdc42 son PAK, así como las proteínas WASp/N-WASp, que activan al complejo Arp2/3 y permiten la polimerización de la actina (Figura 9). Además, Cdc42 controla la dirección de migración (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Se ha descrito que en las células con migración mesenquimatosa, las GTPasas, Rac y Cdc42 favorecen la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente. En las células que adoptan el tipo de migración ameboso, como los leucocitos y macrófagos, la GTPasa Rho es esencial para la generación de tensión necesaria para la retracción de los blebs y el mantenimiento del anillo cortical (Worthylake *et al.*, 2001).

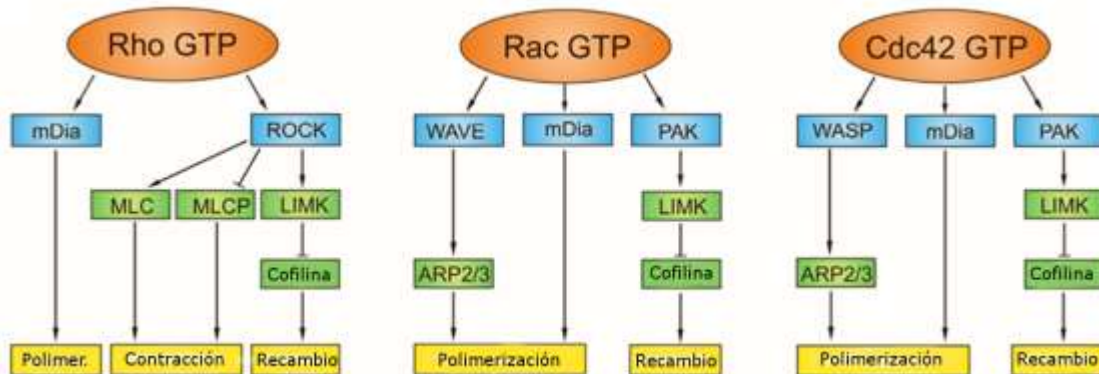


Figura 9. Reguladores río abajo de la familia de proteínas Rho GTPasas. Los efectores de las Rho GTPasa, incluyen cinasas como ROCK y PAK, factores nucleadores como mDia, y el complejo Arp2/3. La proteína mDia favorece la polimerización de filamentos lineales de actina, mientras WASp y WAVE activan al complejo Arp2/3 que favorece la polimerización de filamentos ramificados. La cinasa PAK, fosforila a LIMK (acrónimo en inglés para LIM-motif containing kinase) la cual fosforila e inhibe a cofilina regulando el recambio de la actina. Modificada de Dráber *et al.*, 2012.

Hipófisis

La hipófisis es una glándula endócrina que se localiza sobre la base del cráneo, en la silla turca del hueso esfenoides, por debajo del hipotálamo. Consta de los lóbulos anterior, medio y posterior. El lóbulo posterior, o neurohipófisis se forma de los axones terminales de las neuronas hipotalámicas de los núcleos supraóptico y paraventricular (Malenka *et al.*, 2009). El lóbulo intermedio lo forman células secretoras llamadas melanotrópos, que sintetizan y secretan la hormona estimulante de los melanocitos. Cabe mencionar que en el humano este lóbulo está ausente. El lóbulo anterior, también denominado adenohipófisis, está compuesto por distintos tipos celulares, el tipo secretor: que incluye a somatotrópos, que secretan hormona de crecimiento (GH); Lactotrópos, que secretan prolactina (PRL); Gonadotrópos, que secretan la hormona Luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH); Tirotrópos que secretan a la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y adrenocorticotrópos que secretan a la adrenocorticotropina (ACTH). Cabe mencionar que existe un fenotipo secretor somatolactotrofo, el cual presenta secreción tanto de hormona de crecimiento como de prolactina (Villalobos *et al.*, 2004), y otro tipo no secretor que incluye células folículo estelares, endoteliales, pericitos y pituicitos (Vila-Porcile, 1972; Soji y Ebert, 1989; Fujiwara *et al.*, 2010).

Matriz extracelular en las células adenohipofisarias

Las células de la adenohipófisis están rodeadas de distintas proteínas de MEC como laminina, fibronectina y colágenas (Holck *et al.*, 1987; Kaidzu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1989). La MEC es el componente no celular que da soporte físico e inicia las señales bioquímicas y biomecánicas cruciales que dictan parte del comportamiento celular (Frantz *et al.*, 2010; Hubmacher y Apte, 2013).

La MEC está formada por proteoglicanos y proteínas fibrosas como laminina, fibronectina y colágenas. La manera en que estas proteínas se organizan determina las propiedades biomecánicas de la MEC e influyen la manera en la que las células responden a la misma, por ejemplo regulando secreción de hormonas, proliferación y migración (Paez-Pereda *et al.*, 2005; Hakkinen *et al.*, 2011).

Las Colágenas

Las proteínas fibrosas más abundantes en la MEC son las colágenas. Las colágenas son una familia de proteínas con al menos 29 miembros, la estructura típica de la colágenas es una triple hélice de tres cadenas α , cada una de las cuales está formada por dos propéptidos, el N y el C-terminal, los cuales flanquean el motivo de aminoácidos (Gly-X-Y, donde X y Y son cualquier aminoácido ácido, generalmente prolina o hidroxiprolina; Figura 10). Las cadenas de colágeno son sintetizadas como precursores denominados procolágenos que son transportados al retículo endoplasmático, en donde el propéptido C-terminal inicia la formación de la triple hélice (Mouw *et al.*, 2014). El procolágeno es secretado por las células al espacio extracelular y convertido en colágena mediante el corte de los propéptidos N- y C-terminales mediante la actividad de las metaloproteasas. Las colágenas fibrilares clásicas en la MEC y la membrana basal, incluyen a la colágena tipo I, II, III, IV, V y XI (Hulmes, 2002).

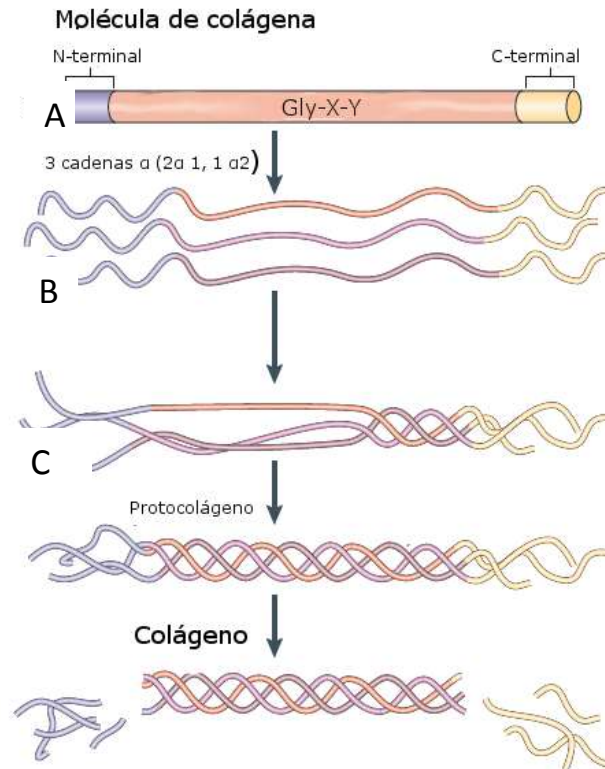


Figura 10. Estructura de las colágenas. (A) La estructura típica de las colágenas está formada por propéptidos N y C-terminal, los cuales flanquean el motivo de aminoácidos Gly-X-Y. (B) Tres cadenas α (la imagen muestra 2 cadenas $\alpha 1$ y 1 cadena $\alpha 2$, lo cual representa al a colágena tipo I) se ensamblan en una tripe hélice, este proceso es iniciado por el propéptido C-terminal. (C) El protocolágeno es secretado por las células al espacio extracelular y convertido en colágena mediante el corte de los pro péptidos N- y C-terminal mediante la actividad de las metaloproteasa. Modificada de Mouw *et al.*, 2014

La Colágena tipo I y la colágena tipo III

La colágena tipo I es el tipo más abundante y la mejor estudiada, es un heterotrímero de dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una $\alpha 2(I)$. Mientras que, la colágena tipo III es un homotrímero de tres cadenas $\alpha 1(III)$, estas colágenas se caracterizan por su habilidad de ensamblarse en agregados paralelos (Figura 11A). Las similitudes estructurales entre ambas colágenas les permiten formar agregados, se ha descrito una interacción heterotípica entre las cadenas $\alpha 1(III)$ de la colágena III y $\alpha 1(I)$ de la colágena I (Henkel y Glanvill, 1982). La mezcla de colágena de tipo I y tipo III, está constituida en un 95 % por la de tipo I y en 5 % por la de tipo III (Yurchenco y Schittny, 1990)

La Colágena tipo IV

La colágena tipo IV es el componente estructural más importante de la membrana basal. Este tipo de colágena tiene la particularidad de autoensamblarse formando “redes” (Figura 11B). La colágena IV está formada por tres cadenas α , del tipo $\alpha 1(IV)$ al $\alpha 6(IV)$. La forma predominante es una $\alpha 1(IV)$ y dos $\alpha 2(IV)$. Las cadenas presentan tres dominios: el dominio N-terminal 7S, el dominio globular C-terminal (NC1) y el dominio central, el cual es similar al descrito para la colágena I, en triple hélice con interrupciones de repetidos Gly-X-Y resultando en una triple hélice flexible. Las fibras de C IV forman mallas capaces de unir heparina, heparán sulfato y laminina (Yurchenco y Schittny, 1990; Olsen y Ninomiya, 1999; Ceylan *et al.*, 2011).

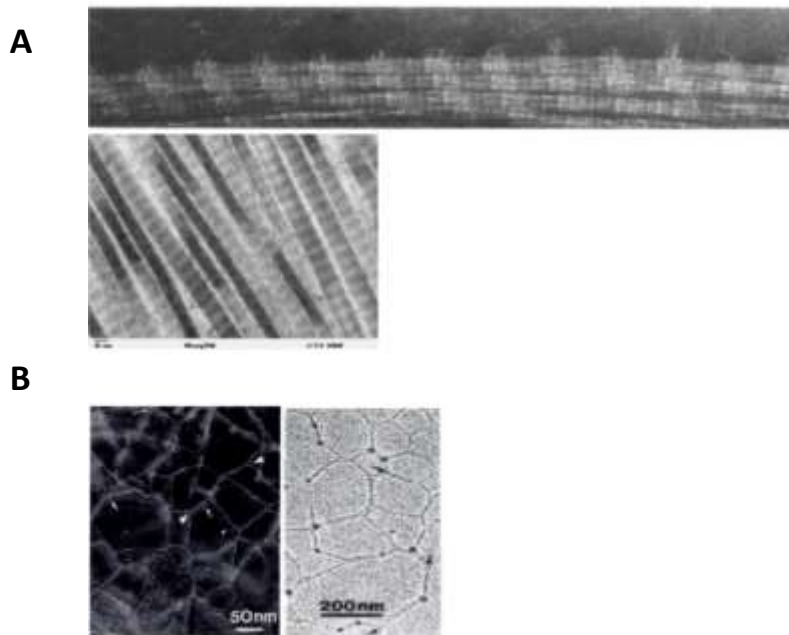


Figura 11. Colágena tipo I-III y colágena tipo IV. Imágenes de microscopía electrónica muestran que (A) la colágena tipo I-III (95 % tipo I y 5 % tipo III) forma agregados en fibras paralelas, similar a lo observado sólo en la colágena de tipo I (panel inferior). Mientras que, (B) la colágena de tipo IV se agrega en tetrámeros a manera de una malla irregular. Modificada de Keene *et al.*, 1987; Modificada de Yurchenco y Schittny, 1990.

Adhesión célula-sustrato mediada por las integrinas.

Las integrinas son los principales receptores de las adhesiones al sustrato, conducen la información del medio exterior para cambiar la estructura y función celular. Las integrinas son heterodímeros de 18 subunidades α y 8 subunidades β . La combinación de tipos específicos de subunidades α y β determina la afinidad del receptor por las proteínas de MEC. Por ejemplo la integrina $\alpha1\beta1$ es más afín a la C IV que a la C I, mientras que, la $\alpha2\beta1$ es más afín a la C I que a la C IV (Figura 12; Hemler y Lobb, 1995). Las integrinas tiene la habilidad de responder a la MEC e integrar tanto señales mecánicas como químicas a través de su asociación con el citoesqueleto de actina, regulando las adhesiones al sustrato y la migración.

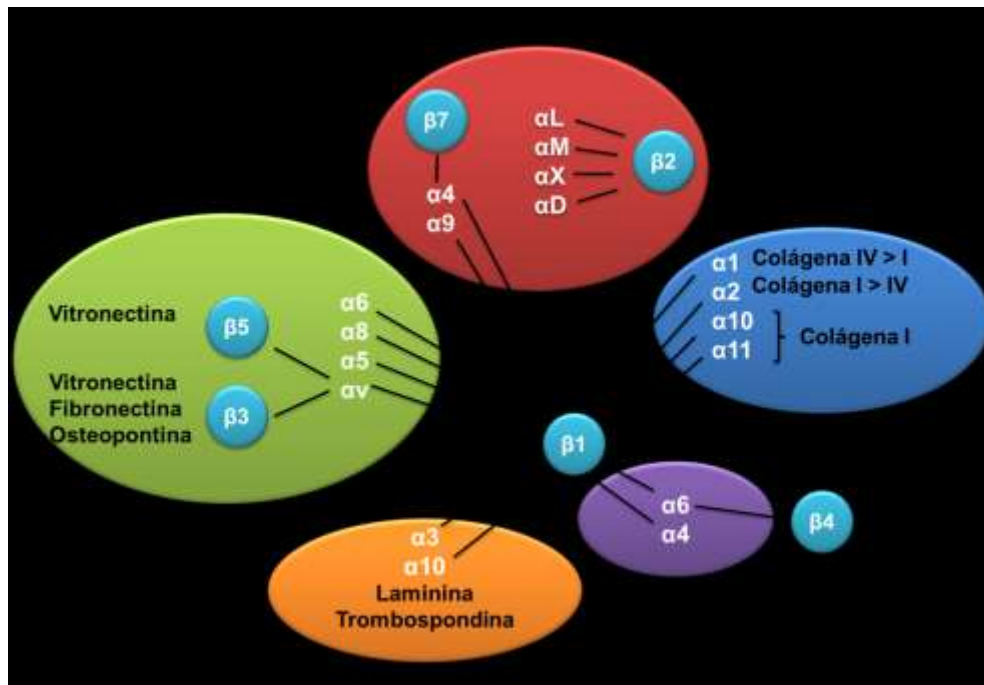


Figura 12. Afinidad de los heterodímeros de integrinas. La combinación de las subunidades α y las subunidades β , determina la afinidad a cada una de las proteínas de la matriz extracelular.

Vía de señalización de las integrinas

La actividad transductora de las integrinas se regula por las Rho GTPasas. Una vez que las integrinas se unen a la MEC se activan y cambian la conformación de sus colas citoplasmáticas lo que les permite interactuar con otras proteínas y regular la señalización río abajo. La activación permite que las integrinas se unan al citoesqueleto de actina a través de un complejo multiproteico (Caja 2). Luego se reclutan distintas proteínas de señalización y andamiaje como la vinculina, talina, paxilina y las cinasas FAK (acrónimo en inglés para Focal Adesion Kinase) y Src. Dependiendo de las proteínas que sean reclutadas a dicho complejo, se favorece un tipo específico de forma celular y de motilidad.

Caja 2. Proteínas clave que unen a las integrinas con el citoesqueleto de actina.

Talina

Es una proteína de unión a actina que forma homodímeros antiparalelos. El dominio amino terminal FERM (Protein 4.1, Ezrin, Radixin y Moesin) se une a la cola de la subunidad β de las integrinas y esta unión es suficiente para que las integrinas se activen. El dominio de carboxilo terminal interactúa con la vinculina y la actina filamentosa (Campbell *et al.*, 2004)

Vinculina

Es una proteína de unión a actina que participa en las uniones célula-célula, y las adhesiones célula-sustrato. Une al complejo de integrina-talina con la actina filamentosa (Ziegler *et al.*, 2006)

Paxilina

Es una proteína adaptadora que se une a proteínas cinasas como Src y FAK, además de interactuar con proteínas estructurales como vinculina. Estabiliza las adhesiones focales cuando la tensión aumenta (Ye *et al.*, 2014)

FAK

La cinasa de las adhesiones focales, FAK (acrónimo en inglés para Focal Adesion Kinase) es una cinasa de serina-treonina que forma un complejo con la familia de cinasa de Src, lo cual inicia cascadas de señalización a través de la fosforilación de otras proteínas (Bockholt *et al.*, 1993).

α -actinina

Es una proteína de unión a actina que forma parte de la superfamilia de espectrina. Forma dímeros antiparalelos con sitios de unión a la actina en cada extremo, por lo tanto entrecruza dos filamentos de actina (Otey *et al.*, 2004).

Señalización de proteínas tirosina cinasa

Vía de señalización de Src

Al formarse el agregado de proteínas con las integrinas, las moléculas de Src aumentan y se fosforilan unas a otras activando a la cinasa. Src fosforila, a su vez, a proteínas como FAK, paxilina y tensina (Bockholt *et al.*, 1993; Klinghoffer *et al.*, 1999; Turner, 2000). En osteoclastos y plaquetas se ha propuesto un modelo de activación de la familia de cinasas de Src dependiente de la integrina $\beta 3$ que involucra la unión del dominio SH3, de Src, a la región citoplasmática de la integrina $\beta 3$ (Arias-Salgado *et al.*, 2003). En células de carcinoma de células escamosas, otro miembro de la familia de Src, Fyn, se asocia con las subunidad de la integrina $\beta 6$ del dímero $\alpha\beta 6$, y promueve la secreción de metaloproteasas y la metástasis en ratones (Li *et al.*, 2003). Por lo tanto, la asociación de la familia de Src con diferentes dímeros de las integrinas regula la señalización de las Rho GTPasas (Figura 13).

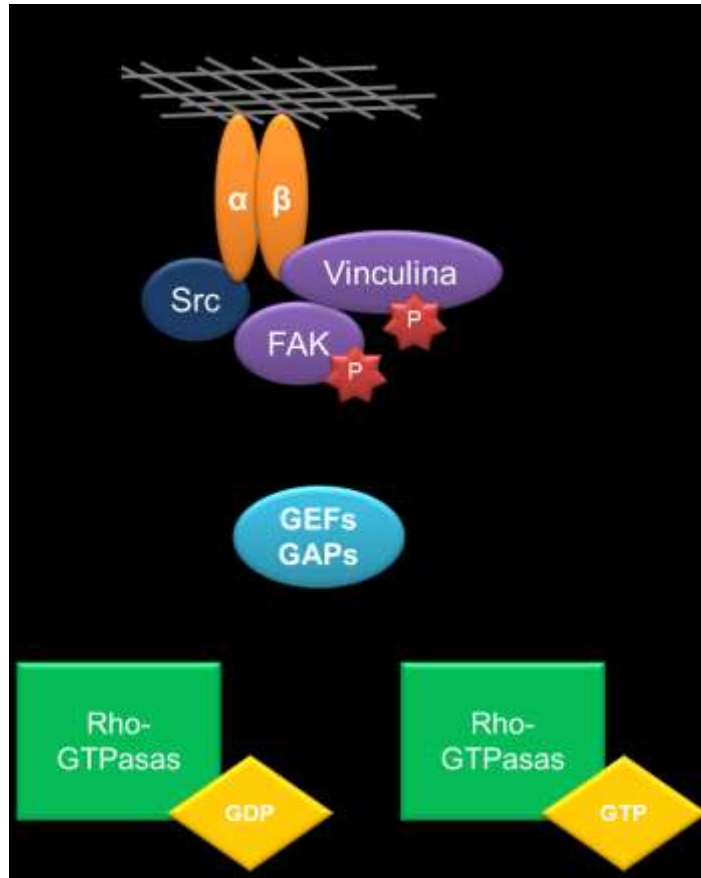


Figura 13. Vía de señalización de la cinasa Src. Una vez que las integrinas se unen a la MEC se activan y cambian la conformación de sus colas citoplasmáticas lo que les permite interactuar con Src, la cual fosforila a proteínas como FAK y vinculina. La vía de señalización de Src estimula la actividad de distintas GEFs y GAPs, lo cual favorece la actividad de la familia de las Rho GTPasas (Rho, Rac y Cdc42).

Vía de señalización de EphA2

La cinasa de la familia de heparina, EphA2, induce la activación de las integrinas e impide la extensión sobre el sustrato y la adhesión (Miao *et al.*, 2000). EphA2 regula a la FAK, fosforilándola, favoreciendo su actividad de cinasa. En la línea celular B16, derivada de melanoma de murino, el aumento en la expresión de la cinasa EphA2 activa a Rho-GTP y favorece la motilidad de células redondas (Parri *et al.*, 2009).

Señalización de miembros de la familia Cas

NEED9 (acrónimo del inglés para Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9) es un miembro de la familia de proteínas p130 Cas (acrónimo del inglés Crk-asociated substrate family). NEDD9 estabiliza la formación y regula el recambio de las adhesiones focales (Zhong *et al.*, 2012). En respuesta a la activación de las integrinas, FAK o la cinasa RAFTK (acrónimo en inglés para (Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase) reclutan a NEDD9 en las adhesiones focales, que se une a través del dominio SH3, esto permite que NEDD9 se una a Src. La fosforilación del dominio de sustrato de NEDD9 por Src resulta en sitios de unión a Crk y otras proteínas adaptadoras que reclutan a las GEFs de Rac, DOCK3 y DOCK180 (Figura 14; Sanz-Moreno *et al.*, 2008; Kiyokawa *et al.*, 1998).

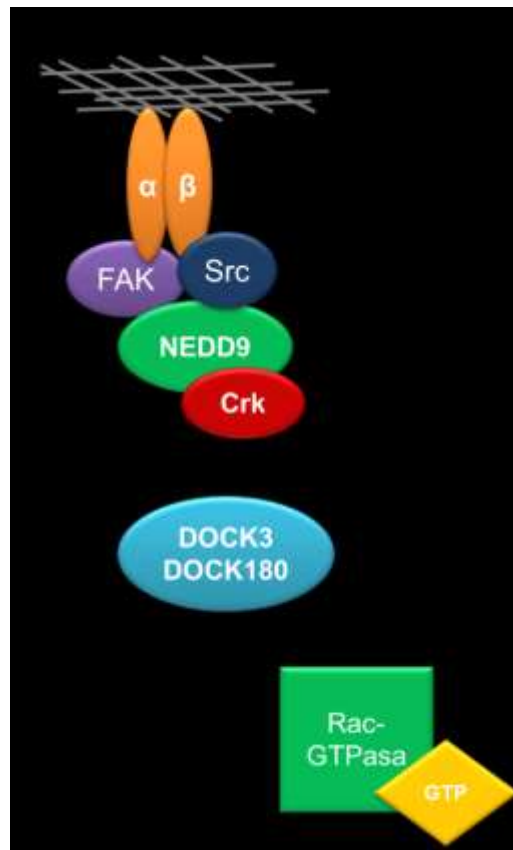


Figura 14. Vía de señalización de NEDD9. En respuesta a la activación de las integrinas, FAK recluta a NEDD9 en las adhesiones focales, esto permite que NEDD9 se una a Src. La

fosforilación del dominio de sustrato de NEDD9 por Src resulta en sitios de unión a Crk y otras proteínas adaptadoras que reclutan a las GEFs de Rac DOCK3 y DOCK180.

Reguladores de las Rho GTPasas

Las proteínas Rho GTPasas actúan como reguladores cruciales de la organización del citoesqueleto y el ensamblaje y organización de las adhesiones. Dependiendo de la GEF y/o GAP reguladora las Rho GTPasas favorecen la motilidad de células redondas o alargadas (Figura 15). En células de melanoma, la GEF DOCK3 activa a Rac, estimulando la motilidad de las células alargadas. Por otro, el reclutamiento de la GAP ARHGAP22 induce la inactivación de la GTPasa Rac (Sanz-Moreno *et al.*, 2008), favoreciendo la forma redonda. Por otra parte, el reclutamiento de la GEF de Cdc42, DOCK10, favorece el movimiento de células redondas, pero parece no ser necesaria para la motilidad de las células alargadas (Gadea *et al.*, 2008). En fibroblastos el reclutamiento de p190RhoGAP, dependiente de la vía de la cinasa Src, resulta en la inhibición de la actividad de la GTPasa Rho A, favoreciendo la extensión sobre el sustrato (Arthur y Burridge, 2001).

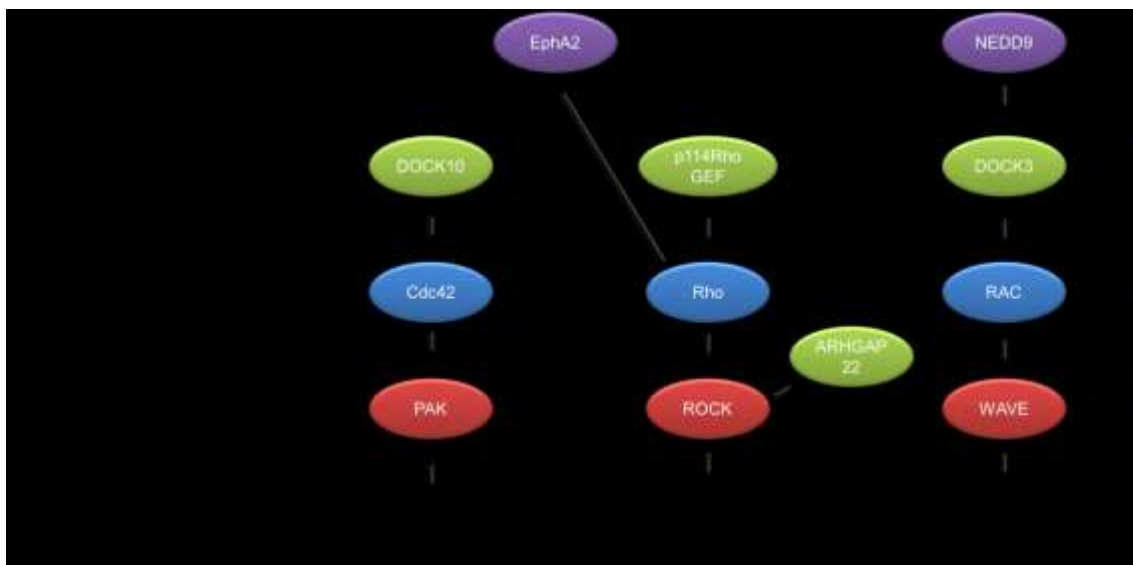


Figura 15. Vías de señalización que regulan el tipo de motilidad ameboidea y mesenquimatosa.

Cambios en la síntesis de colágena en los adenomas hipofisarios

En los adenomas hipofisarios (Caja 3) se han identificado cambios en la cantidad y localización de distintas proteínas de la MEC como laminina, fibronectina, colágena tipo I y colágena tipo IV (Murray *et al.*, 1997). En estos tumores benignos, la laminina forma fibras dispersas cerca de los vasos sanguíneos, mientras que en el tejido sano forma parte de la membrana basal. En cuanto a las colágenas, se ha descrito una escasa expresión de la colágena tipo IV en la membrana basal de las células tumorales, en comparación con el tejido hipofisario sano (Jarzembowski *et al.*, 2007). En el mismo sentido, Kawamoto y colaboradores (1996) demostraron que la colágenasa tipo IV está más activa en los adenomas invasores. Por otro lado, la deposición de fibras de colágena tipo I, fenómeno conocido como desmoplasia, aumenta en los macroadenomas (Nagamuna *et al.*, 2002; Yoshida y Teramoto, 2007; Figura 16).

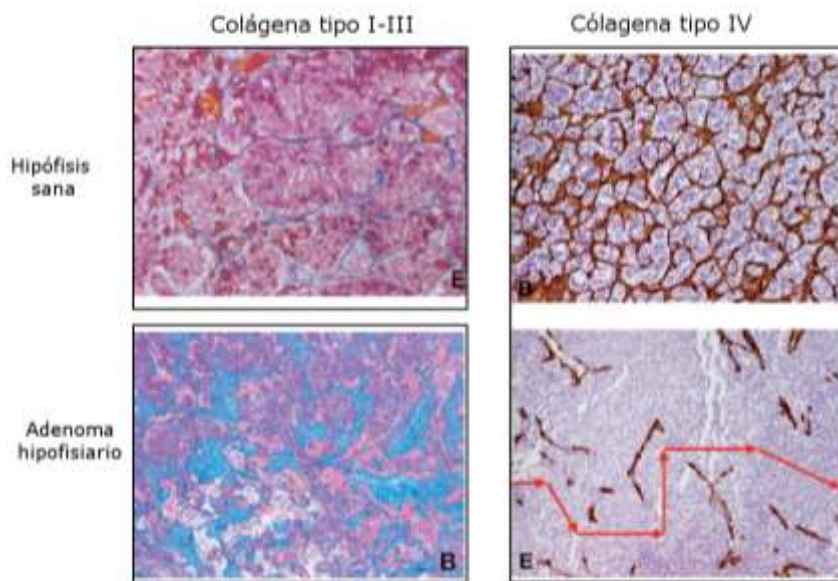


Figura 16. Cambios en las colágenas en los adenomas hipofisarios. Se ha descrito un aumento en la deposición de fibras de colágeno tipo I (desmoplasia, azul), mientras que se ha observado una disminución en la colágena tipo IV (café). Modificada de Nagamuna *et al.*, 2002; Modificada de Jarzembowski *et al.*, 2007.

Caja 3. Adenomas hipofisarios

Los adenomas hipofisarios son tumores procedentes de células adenohipofisarias secretoras, y representan del 15 al 25 % de los tumores intracraneales (Melmed, 2003). Generalmente son considerados benignos, de lento crecimiento, y de rara metástasis, sin embargo un número importante de adenomas hipofisarios, aproximadamente del 15 al 25 %, presentan invasión a tejidos adyacentes (Yoshida y Teramoto, 2007). Los adenomas hipofisarios se presentan con manifestaciones clínicas como: dolores de cabeza, alteraciones visuales, hipertensión intracraneal debido a la compresión de la masa tumoral a los tejidos adyacentes (efecto de masa) o las relacionadas con las hormonas que los tumores secreten (Melmed, 2003). Los adenomas hipofisarios son clasificados en base a diferentes criterios (Tabla 2).

Tabla 2. clasificación de adenomas hipofisarios

Característica		
Tamaño	Microadenomas <10 mm de diámetro Macroadenomas >10 mm de diámetro	
		Síndromes asociados
Producción de hormonas	Adenomas secretores de PRL Adenomas secretores de ACTH Adenomas secretores de GH Adenomas secretores de TSH Adenomas secretores de FSH y/o LH Adenomas endocrinológicamente silentes	Infertilidad, galactorrea Enfermedad de Cushing Acromegalia o gigantismo Hipertiroidismo Hipogonadismo e hipergonadismo (raro) Sin síndrome asociado
Manifestaciones clínicas (endocrinológicas)	Endocrinológicamente funcionante Endocrinológicamente no funcionante	
Capacidad de invasión	Adenomas no invasores (grado 0 y I) Adenomas invasores (grado II, III y IV)	

PRL: prolactina, ACTH: corticotropina, GH: hormona de crecimiento, TSH: tirotropina, FSH: hormona foliculo estimulante, LH: hormona luteinizante. De acuerdo a la clasificación de Hardy y Vezina (1976), los adenomas no invasores son aquellos que permanecen confinados en la glándula, grado 0 y grado I. Son considerados invasores aquellos que llegan infiltrar estructuras vecinas. Grado II: silla turca intacta, Grado III: destrucción selar localizada, Grado IV: destrucción difusa.

Arreglo del citoesqueleto de adenomas hipofisarios

Previamente mostramos que células en cultivo provenientes de adenomas hipofisarios invasores, endocrinológicamente no funcionantes, son pequeñas y redondas con anillos corticales de actina, semejando las células con migración ameboidea (Avila-Rodriguez *et al.*, 2016). Por su parte, Del-Pliego y colaboradores (2013) mostraron que las células provenientes de un microprolactinoma no invasor se extienden sobre la superficie de cultivo y forman pequeñas fibras y arcos de actina, como se ven en células de migración mesenquimatosas (Figura 17). Estos datos sugieren que las células de los adenomas hipofisarios pueden adquirir diferentes formas y arreglos del citoesqueleto.

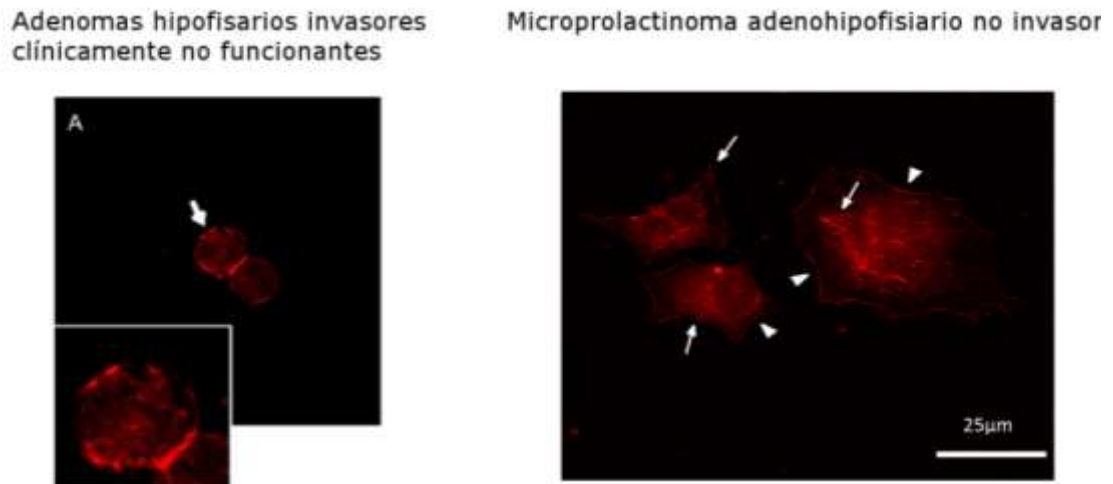


Figura 17. El arreglo del citoesqueleto de actina de células provenientes de adenomas hipofisarios. Las células en cultivo provenientes de adenomas hipofisarios invasores clínicamente no funcionantes, son pequeñas y redondas con anillos corticales de actina. Mientras que, las células provenientes de un microprolactinoma no invasor se extienden sobre la superficie de cultivo. Tomada de Avila-Rodriguez *et al.*, 2016; Del-Pliego *et al.*, 2013

La matriz extracelular regula la forma de las células GH3

En nuestro laboratorio, Azorín y colaboradores (2014) mostraron que la línea celular GH3, derivada de un adenoma hipofisario de rata, que secreta tanto

hormona de crecimiento como prolactina (Tashjian *et al.*, 1968), que responde de manera diferencial al tipo de MEC. Sobre colágena tipo I-III adquieren una forma redonda, con poca adhesión al sustrato, mientras que sobre colágena tipo IV, se extienden y unen fuertemente al sustrato (Figura 18; Azorín *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que, dependiendo de la MEC, la célula tiene la capacidad de modificar su forma, por lo que las células GH3 son un modelo adecuado para estudiar la dinámica en la forma celular dependiendo del contexto extracelular.

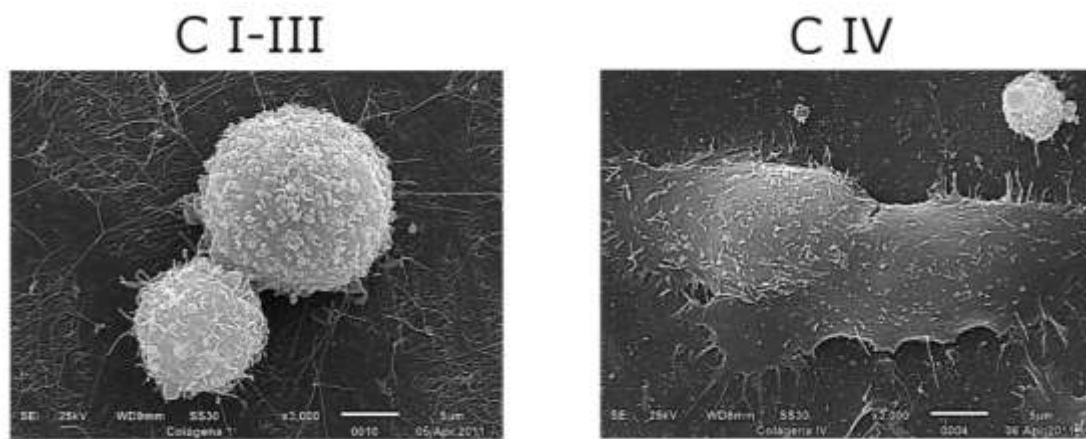


Figura 18. Organización de la membrana de células GH3 sembradas sobre colágena tipo I-III y colágena IV. Cuando las célulasGH3 se siembran sobre una mezcla de colágena tipo I (95 %) y tipo III (5 %) organizan su membrana en blebs. Mientras que, cuando son sembradas sobre Colágena IV, las células organizan la membrana principalmente en filopodios y algunos lamelipodios. Tomada de Azorin *et al.*, 2013.

II. Planteamiento del problema

Las células de los adenomas hipofisarios humanos adquieren diferentes formas y arreglos del citoesqueleto dependiendo de su fenotipo. En el mismo contexto, las células GH3 de adenoma hipofisario de rata, cambian su forma dependiendo del sustrato: tienen una forma redonda cuando se cultivan sobre la colágena tipo I-III y una forma alargada sobre la colágena tipo IV. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que les permiten a las células adquirir diferentes formas y tipos de movimiento. Considerando que las cinasas MLCK y ROCK regulan la contracción de la actina-miosina, paso crucial para la determinación de la forma, nos preguntamos ¿Cuál es la participación de MLCK y ROCK en la regulación de la forma de las células GH3, sembradas sobre Colágena tipo I-III y Colágena tipo IV?

III. Hipótesis

Las células GH3 activan de distinta manera a la MLCK y ROCK dependiendo de si se cultivan sobre colágena I-III o colágena IV, lo que determina la forma y la migración celular.

IV. Objetivo general

Estudiar la participación de las cinasas MLCK y ROCK, en la tensión cortical, organización del citoesqueleto de actina y migración de las células GH3 sobre Colágena I-III y Colágena IV.

V. Objetivos específicos

En las células GH3 cultivadas sobre Colágena tipo I-III o Colágena tipo IV:

1. Analizar la participación de MLCK y ROCK en la definición de la forma celular.
2. Evaluar la función de MLCK y ROCK en regulación de la tensión y dinámica de la membrana.
3. Analizar la participación de MLCK y ROCK en la fosforilación de la cadena ligera de la miosina.
4. Evaluar la función de MLCK y ROCK en la organización del citoesqueleto.
5. Estudiar la participación de MLCK y ROCK en el proceso de motilidad celular.
6. Analizar la participación de MLCK Y ROCK en la secreción de hormonas.

VI Materiales y métodos

1. Reactivos, proteínas y anticuerpos

Colágena tipo I-III (C I-III, 95 %, 5 % piel de bovino, Sima-Aldrich, St Louis, MO), Colágena tipo IV (C IV, Sarcoma de ratón, Sigma Aldrich). Medio de cultivo HAM-F12, medio 199, Suero Bovino Fetal, suero de caballo, tripsina e inhibidor de tripsina de soya (Gibco, ThermoFisher Scientific MA, EUA). Colagenasa tipo I y DNAsa tipo I (Worthington, Lakewood, NJ). Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: Monoclonal anti-cinasas de la cadena ligera de la miosina (K36, Sima-Aldrich), Monoclonal anti-cadena ligera de la miosina fosforilada (Ser-19, Cell signalling, Beverly, MA), policlonal anti-cadena ligera de la miosina (Tre-18, Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX), Policlonal anti-ROCK-1 (Chemicon, EMD Millipore, Billerica, MA), Antisuero policlonal contra Prolactina y antisuero contra hormona de crecimiento (Dr. A.F. Parlow, Torrance, CA) El anticuerpo monoclonal contra actina fue generosamente donado por el Dr. M. Hernández, (Biología celular, CINVESTAV). Faloidina rodaminada (TRITC-phalloidin, Sigma-Aldrich). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: FITC burro contra ratón y FITC burro contra conejo (Jackson ImmunoResearch, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), Alexa fluor 647 burro contra ratón (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific), Alexa fluor 555 burro contra ratón (Invitrogen, Carlsbad, CA), TRITC burro contra cuyo (Jackson immunoReseach). Anticuerpo secundario cabra contra ratón unido a la peroxidasa de rábano (Invitrogen), anticuerpo secundario cabra contra conejo unido a la peroxidasa de rábano (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Inhibidor de ROCK, (R)-(+)-trans-N-(4-piridil)-4-(1-aminoetil) ciclohexanocarboxamida, dihidrocloruro (Y-27632, Calbiochem, Merck-Millipore, Billerica, MA); inhibidor de MLCK, 1-(5-Iodonaftaleno-1-sulfonil) homopiperazina, HCL, (ML-7, Calbiochem-Merck); inhibidor de RhoA, Exoenzima C3 transferasa, (C3-T, Cytoskeleton inc, Denver, CO); inhibidor de calmodulina, N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide

hydrochloride, (W-7 Tocris Bioscience, Bristol, UK); inhibidor de Rac, N6-[2-[[4-(Dietilamino)-1-metilbutil]amino]-6-metil-4-pirimidinil]-2-metil-4,6 quinolinediamina trihidroclorido, (NSC 23766, Tocris) e inhibidor de Cdc42,4-[4,5-Dihidro-5-(4-metoxifenil)-3-fenil-1H-pirazol-1-yl]benzenesulfonamida, (ML-141, Sigma-Aldrich).

RNA de interferencia (siRNA) de MLCK (Silencer select Pre-designed, Life Technologies GE, Dharmacon, Lafayette, CO)

Secuencia sentido (5' → 3'): GGAUCCUCUUCAUGCACAAtt.

Secuencia antisentido: UUGUGCAUGAAGAGGAUCCcg.

siRNA de ROCK-1 (Santa Cruz).

El siRNA fue una mezcla de tres diferentes RNAs:

a) Secuencia sentido (5' → 3'): CUACAAGCUUGAAGAACAAtt.

Secuencia antisentido: UUGUUCUUCAAGCUUGUAGtt.

b) Secuencia sentido: CUCAAGACAUGCUCAAUCAAtt.

Secuencia antisentido: UGAUUGAGCAUGUCUUGAGtt.

c) Secuencia sentido: CUAGAACAUUUGACCGAAAtt.

Secuencia antisentido: UUUCGGUCAAAUGUUCUAGtt.

2. Preparación de superficies cubiertas con C I-III y C IV

Las superficies sobre las que se cultivaron las células fueron cubiertas con 1 µg/ml de C I-III y de C IV preparadas de la siguiente manera:

Colágena tipo I-III		Colágena tipo IV	
Ácido acético 0.5 M	1000 µl	Ácido acético 0.5 M	1000 µl
C I-III (3.2 mg/ml)	2 µl	C IV (63.3 µg/ml)	12 µl
Bicarbonato de sodio 1 M	500 µl	Bicarbonato de sodio 1M	500 µl
PBS	4482 µl	PBS	4472 µl
Rojo de fenol	16 µl	Rojo de fenol	16 µl
Volumen final	6000 µl	Volumen final	6000 µl

La solución de cada una de las colágenas se distribuyó homogéneamente en la superficie a cubrir (caja de cultivo o cubreobjetos) y se dejó toda la noche a 37 °C. Posteriormente, el exceso de colágena fue retirado por aspiración y las superficies fueron lavadas con 1 M de bicarbonato de sodio, seguido de dos lavados con PBS, finalmente las superficies se dejaron secar dentro de la campana de flujo laminar.

3. Cultivo de la línea celular GH3 y cultivo primario de adenohipófisis

La línea celular GH3 (ATCC, número de catálogo CCL-82.1, lote: 3741980) derivada de un adenoma hipofisiario de rata (Tashjian *et al.*, 1968) fue cultivada en medio Ham-F12 adicionado con 15 % de suero de caballo y 2.5 % de suero bovino fetal. Para hacer los experimentos se sembraron y cultivaron en medio definido estéril (Medio definido: medio de cultivo Ham F12 ó 199, adicionado con 1.2 mg/ml de bicarbonato de sodio, 0.5 mM de L-glutamina, 238 µg/ml de Hepes, 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, 5 ng/ml de triyodotironina, 60 ng/ml de corticosterona, 6 ng/ml de progesterona, 1 mg/ml de albumina sérica de bovino (BSA, fracción V), 16 µg/ml de putrescina, 2.9 µg/ml de selenito de sodio y antibióticos (penicilina 10,000 UI/ml y estreptomina 10,000 µg/ml), pH 7.4) para eliminar las proteínas de matriz extracelular presentes en el suero. Después de 24 horas en cultivo, las células fueron tratadas con los inhibidores correspondientes o con los RNAs de interferencia, como se describirá a continuación. Los cultivos primarios de adenohipófisis de rata adulta fueron realizados de la siguiente manera: El tejido adenohipofisiario se colocó en una solución salina amortiguada con fosfatos adicionada con 1mg/ml de glucosa (PBS-glucosa) y se cortó en pedazos pequeños. En seguida el tejido se incubó con 5 ml de colágenasa tipo I 1mg/ml en medio definido 199 durante 60 min a 37 °C en rotación constante. El tejido se centrifugó a 800 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se realizó una segunda digestión enzimática con 10 ml de tripsina 1 mg/ml a 37 °C

durante 10 min, seguido de la inhibición de la enzima añadiendo 20 ml de inhibidor de tripsina de soya 0.1 mg/ml y 4 ml de ADNasa 5 μ /ml. Finalmente la suspensión celular se centrifugó nuevamente a 800 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en medio de cultivo definido 199 y fueron sembradas sobre C I-III o C IV, según el experimento. Tanto las células del cultivo primario como la línea celular fueron mantenidas a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

4. Tratamiento farmacológico

Para todos los experimentos las células GH3 fueron mantenidas en medio definido durante 24 horas y posteriormente fueron tratadas con los inhibidores correspondientes durante 6 horas: 10 μ M de ML-7, 2.5 μ M de Y-27632, 1 μ g/ml de C3-T, 51 μ M de W-7, 50 μ M de NSC y 400 nM de ML-14.

5. Tratamiento con pequeños RNAs de interferencia pequeños

Las células GH3 fueron depletadas de MLCK y ROCK utilizando RNAs de interferencia pequeños (siRNA) específicos para cada una de las cinasas. Las transfecciones de los siRNA fueron realizadas utilizando lipofectamina® 2000 y de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen). 1 x 10⁶ células fueron sembradas en cajas de 60 mm de diámetro durante 24 horas y transfectadas con 150 pM del siRNA de la MLCK o 100 nM del siRNA de ROCK. Como control se utilizó un siRNA no específico (Sigma-Aldrich). Después de 6 horas con los siRNA, se cambió el medio de cultivo de las células a medio definido sin antibiótico por un periodo de 48h y posteriormente se realizaron los experimentos correspondientes.

6. Migración celular

Para realizar los experimentos de migración las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 32 mm de diámetro en un sistema de cultivo

POC-R2 (ZEISS, Pecon, Oberkochen, Alemania) durante 24 horas. El sistema de cultivo fue colocado en un microscopio invertido en un sistema que mantiene controlada la temperatura a 37 °C y el porcentaje de CO₂ a 5 % (Heating insert P 2000, ZEISS). Las imágenes de campo claro fueron adquiridas cada 1 minuto durante 60 min con un objetivo seco de 40x (Achromplan Contraste de fases, AN 0.65). Para el análisis de la dinámica de la membrana se realizaron quimogramas a partir de las imágenes de los cultivos obtenidas cada 5 segundos, durante 20 min, con un objetivo de inmersión de 63x (LCI plan- Neofluar AN=1.3). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital (AxioCam) con el programa AxioVision Real.4.8 (ZEISS). Los parámetros de migración tales como: velocidad, distancia acumulada, persistencia en la dirección de movimiento y el análisis de los quimogramas fueron realizados en el programa libre ImageJ v1.47 (NIH, Bethesda, MD). Los experimentos de migración se realizaron por cuadruplicado, analizando 50 células en cada condición. En los quimogramas se analizaron 10 células por condición, realizando 5 mediciones por célula.

7. Evaluación de la forma celular

Para evaluar la forma celular con precisión se calculó el cociente entre el tamaño del eje mayor y el menor de cada célula. Si la relación se encontraba entre 1 y 1.49 la célula se consideraba redonda, entre 1.5 y 1.9 intermedia y 2 o mayor alargada. El eje mayor y el eje menor de las células fueron medidos en el programa ImageJ.

8. Evaluación del área celular

Para evaluar el área de las células se adquirieron imágenes de contraste de fases con un objetivo de 40x (ACHROPLAN Ph 2 AN= 0.65). El área celular de cada célula fue determinada manualmente en el programa ImageJ.

Aproximadamente 100 células por condición fueron analizadas en cada condición

9. Activación de RhoA y Rac 1/2/3

La actividad de RhoA y RAC 1/2/3 se midió con los estuches G-lisa™ RhoA activation Kit y Glisa™ RAC activation Kit (Cytoskeleton) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en una reacción de ELISA modificada que discrimina a la forma activa (unida a GTP) de la forma inactiva (unida a GDP) mediante la presencia de péptidos homólogos a los dominios de unión a la GTPasa activa (RGD) en el fondo de los pozos de la placa de ELISA. Al agregar los lisados celulares sólo la forma activa se asocia a los péptidos RGD. La cantidad de Rho-GTP y Rac-GTP adherida al pozo se midió por espectrofotometría.

Las células GH3 se lavaron con PBS frío y se lisaron con la solución amortiguadora de lisis del estuche. Los lisados celulares se clarificaron por centrifugación a 10,000 rpm, a 4 °C durante 3 min. En seguida, se tomó una alícuota de 10 µl del sobrenadante para medir proteínas. El resto del lisado se congeló a 80 °C para su posterior análisis. Blanco: Se mezclaron 30 µl de solución amortiguadora de lisis más 30 µl de solución amortiguadora de unión. Control positivo: se mezclaron 12 µl de proteína del control positivo de RhoA (Rho constitutivamente activo) control más 48 µl de la solución amortiguadora de lisis y 60 µl de solución amortiguadora de unión, o bien se mezclaron 5 µl de proteína control de Rac (Rac constitutivamente activo) más 55 µl de la solución amortiguadora de lisis y 60 µl de solución amortiguadora de unión. De cada condición se tomaron 50 µl y se añadieron a los pozos que en el fondo contenían péptidos correspondientes a los dominios de unión a Rho-GTP o Rac- GTP, según el caso. Los pozos se incubaron en un agitador orbital a 400 rpm, a 4 °C durante 30 min. Posteriormente se agregaron 50 µl de los anticuerpos anti-Rho o anti-Rac, la incubación con los anticuerpos se llevó a 400 rpm durante 45 min a temperatura ambiente. En

seguida se realizaron lavados y se agregaron 50 μ l de los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa de rábano, y se incubaron nuevamente a 400 rpm durante 45 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se lavaron y finalmente se adicionó la solución de detección de la peroxidasa de rábano. La absorbancia se midió en un lector de placas (Labsystems multiskan MULTISOFT) a una longitud de 490 nm.

10. Inmunocitoquímica

Para observar las fosforilaciones de la cadena ligera de la miosina (MLC-p), las células se fijaron con formaldehído libre de metanol al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente. Para observar la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y la cinasa dependiente de Rho (ROCK) las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente. Para observar la prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH) las células se fijaron con paraformaldehído al 3.5 % durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la fijación, las células fueron permeabilizadas con 0.5 % de tritón X-100 en PBS durante 3 min, lavadas 1 vez con PBS y bloqueadas suero normal de cabra (SNC) al 5 % en PBS + 0.01 % de tritón X-100 durante 1 hora. En seguida las células fueron lavadas 3 veces con PBS + 0.01 % de tritón X-100 durante 5 min cada uno. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios: MLC-P (Ser 19, 1:200), MLC-P (Thr 18, 1: 400), PRL (1:1000) GH (1:800) diluidos en PBS + 0.03 % de saponina durante 120 min a temperatura ambiente y con los anticuerpos primarios MLCK (1:100) y ROCK (1:100) durante 60 min y posteriormente lavadas como se mencionó anteriormente. Los anticuerpos secundarios correspondientes, diluidos en PBS + 10 % SNC, fueron incubados durante 60 min a temperatura ambiente. Finalmente las células fueron incubadas con 1 μ M de faloidina rodaminada durante 7 min. Las células se lavaron nuevamente y montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Vectashield (Vector, EEUU). Posteriormente se observaron al microscopio

confocal (Leica TCS SP2, Alemania) a una magnificación de 63x (Plan-Neofluar AN=1.4)

11. Lisados celulares, SDS-PAGE y Western blot

Las células fueron lisadas y sus proteínas precipitadas con ácido tricloroacético al 10 % en agua durante 20 min en hielo. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante fue retirado y la pastilla lavada 2 veces con acetona más 10 mM de ditioneitol (DTT) para quitar el ácido tricloroacético, en seguida la acetona se retiró y la pastilla se secó durante 10 min a temperatura ambiente. La pastilla seca fue disuelta en el amortiguador de lisis que contenía: 6 M de urea, 0.5 M de Tris-HCl, 10 % de glicerol, 10 % de SDS, 9mM de DTT, 20mM de NaF, 2mM de Na₃VO₄, 2mM de PMSF, un coctel de inhibidores de proteasas (1 μM de Pepstatina A, 1.5 μM de Leupeptina, 1 mM de Benzamidina, 0.4 mM de Na-p-tosil-L-arginina metil ester; Cytoskeleton), pH 6.8. La concentración de proteínas fue medida con el estuche micro BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL). Los extractos proteicos de cada muestra (40 μg) fueron fraccionados por electroforesis en geles de acrilamida al 15 % y posteriormente transferidas a una membrana de PVDF. Para la detección de la actina y MLC-P (Ser-19), las membranas se incubaron durante una hora con los anticuerpos contra actina (1:2,000) y MLC-P (Ser-19; 1:2,500). Para la detección de la MLC-p (Thr-18) y la MLC, la unión inespecífica fue bloqueada con 30 % de caseína en TBS-Tween durante 1 hora y posteriormente la membrana se incubó con los anticuerpos contra MLC-p (Thr-18; 1:100) y MLC (1:200) durante toda la noche.

Para la determinación de la MLCK y ROCK, las células fueron lisadas en el buffer de lisis RIPA: 50 mM de TRIS, 150 mM de NaCl, 1 % de Tritón X-100, 1 % de ácido deoxicólico, 2 % de SDS, 10 % de glicerol, 20 mM de NaF, 2 mM de Na₃VO₄, y un coctel de inhibidores de proteasas (1 μM de Pepstatina A, 1.5 μM de Leupeptina, 1 mM de Benzamidina, 0.4 mM de Na-p-tosil-L-

arginina metil ester; pH 7.4. Los extractos proteicos de cada muestra (30 µg) fueron separadas en un geles de acrilamida al 8 % y posteriormente transferidas a una membrana de PVDF. La unión inespecífica fue bloqueada con 0.5 % de leche descremada durante 60 min y posteriormente las membranas fueron incubadas con los anticuerpos contra la ROCK (1:3,500) y la MLCK (1:13,000) durante toda la noche. Los anticuerpos son los mismos que se utilizaron para las inmunocitoquímica a excepción de la actina que es un anticuerpo monoclonal de ratón contra actina (Donado generosamente por el doctor Manuel Hernández del departamento de Biología celular del CINVESTAV). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa correspondientes: HRP cabra anti ratón (Invitrogen) (1:500) o HRP burro anti conejo (Thermo Scientific) (1:20000) durante 60 min. Las bandas inmunoreactivas se detectaron con el sustrato de quimioluminiscencia ECL (GE, Healthcare life Sciences). Los análisis densitométricos fueron realizados en el programa ImageJ.

12. Adhesión celular (Método de cristal violeta)

El cristal violeta (Cloruro de hexametil pararosanilina) es un colorante que se une a las proteínas de la membrana plasmática y al ADN (Bonnekoh *et al.*, 1989). Las células se fijaron con paraformaldehído al 2 % en PBS complementado con ácido pícrico al 0.2 % durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente se lavaron 2 veces con PBS con 1 mM de calcio, y dos veces más con agua desionizada. Luego las células se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Las células fijadas se tiñeron con cristal violeta al 0.1 % durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con agua desionizada y se dejaron secar nuevamente toda la noche. El cristal violeta se extrajo incubando las muestras con ácido acético al 10 % durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente La absorbancia fue determinada a 595 nm.

13. Viabilidad celular (método de MTT)

La viabilidad celular fue evaluada mediante el uso de bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Este método se basa en la conversión de sales de tetrazolio en cristales de formazán por las deshidrogenasas mitocondriales, para medir el número de células metabólicamente activas en el cultivo. Para el ensayo de MTT 20,000 células por pozo fueron sembradas en una placa de 96 pozos. Las células fueron tratadas con los inhibidores ML-7, Y-27632 y DMSO como vehículo. Después de 2 o 4 horas de incubación, se agregó la solución de MTT por 4 horas. En seguida las células fueron incubadas con SDS 10 % en HCl 0.01 M durante toda la noche. Finalmente, la absorbancia fue determinada a 595 y 690 nm.

14. Microscopia electrónica de barrido

Las células se fijaron con 2.5 % de glutaraldehído en PBS durante 60 min, posteriormente se incubaron con OsO₄ al 1 % en PBS. Las células fueron entonces deshidratadas con un gradiente de etanol y secadas a punto crítico en un desecador (Sambdri 780 A, Tusimis Research Co., USA). Finalmente las células fueron contrastadas con oro y visualizadas en un microscopio electrónico de barrido (JSM-6510LV, Japón). Las observaciones se realizaron en los laboratorios centrales del CINVESTAV.

15. Microscopia de fuerza atómica

Las células fueron sembradas sobre una superficie de Polidimetilsiloxano (PDMS). Las observaciones fueron realizadas en un microscopio BioScope Catalyst, con un controlador NanoScope V (Bruker), montado en un microscopio invertido (Axio Observer Z1, ZEISS). Cantilévers de nitrilo modelo DNP-D (Bruker Camarillo, California, USA) con una punta de silicón (20nm) y con una constante nominal de 0.06 N/m fueron utilizados para obtener las

imágenes y las indentaciones. Las imágenes fueron obtenidas en modo scanAsyst en fase líquida. Durante los experimentos las células fueron mantenidas a 37 °C en un medio de cultivo amortiguado con HEPES. Cada cantilever fue calibrado utilizando el método de “thermal tune”. La determinación del módulo de Young de las curvas de fuerza fue realizado en el programa Nanoscope Analysis (Bruker) usando el modelo de Hertz con la variación de Sneddon. Las observaciones se realizaron en el centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnología del Instituto Politécnico Nacional.

16. Secreción de la prolactina y hormona de crecimiento

Para la medición de las hormonas los medios de cultivo fueron colectados de cada una de las condiciones experimentales y congelados inmediatamente. La prolactina y hormona de crecimiento fueron medidas utilizando el estuche MILLIPLEX MAP rat pituitary magnetic bead panel (Millipore) y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las mediciones fueron realizadas en el equipo Luminex Magpix instrument utilizando la tecnología de XMAP (Luminex, Austin, TX)

17. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de dos condiciones, se realizó una prueba estadística de T de student no pareada, mientras que una prueba de ANOVA de una o dos vías seguida de una post-prueba de Tukey fue utilizada para analizar las diferencias estadísticas en los grupos tratados con los inhibidores (GraphPad Prism 5, San Diego, CA, USA). Los datos se muestran como la media \pm el error estándar de la media de datos obtenidos de al menos tres experimentos independientes.

VII Resultados

En un trabajo previo, Azorín y colaboradores (2014) caracterizaron la motilidad y forma de las células GH3, derivadas de un adenoma hipofisiario de rata cultivadas sobre una mezcla de la C I-III o sobre la C IV. Las células cultivadas sobre C I-III son redondas y con motilidad alta, mientras que sobre C IV son alargadas y con motilidad baja. Puesto que las células GH3 modifican su forma en respuesta al tipo de MEC en la que crecen, en el presente trabajo, investigamos los mecanismos involucrados en la adquisición de la forma, en particular investigamos la participación de las cinasas MLCK y ROCK, en la generación de la tensión cortical, la organización del citoesqueleto y la motilidad celular en células redondas y células alargadas.

Para estudiar la participación de ambas cinasas, decidimos bloquear a las cinasas MLCK y ROCK usando el inhibidor ML-7 y Y-27632, respectivamente. En primer lugar analizamos la viabilidad de las células GH3 después de 6 h y 8 h de la inhibición farmacológica. Encontramos una disminución significativa del 10 % en este parámetro después de 8 h con el inhibidor ML-7, mientras que no hubo cambios en el porcentaje de viabilidad después de 6 h de tratamiento con ambos inhibidores (Figura 19). Por lo cual decidimos utilizar ambos inhibidores por un periodo de 6 h en los experimentos posteriores.

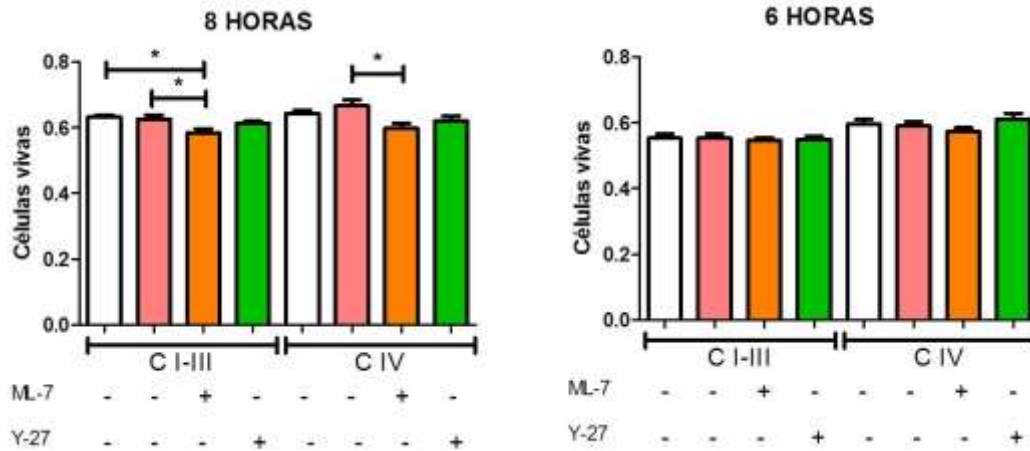


Figura 19. Viabilidad celular. Las células fueron cultivadas sobre C I-III o sobre CIV durante 24 horas, después de este período, las células se mantuvieron sin tratamiento (barra blanca) o bien fueron tratadas durante 6 y 8h con el vehículo de los inhibidores (DMSO, barra rosa) o los inhibidores, ML-7(barra naranja) y Y-27632 (barra verde). Los datos se muestran como la media \pm EE de tres experimentos independientes. ANOVA de dos vías, * $p < 0.05$.

La MLCK regula la forma alargada de las células y el área adosada al sustrato; mientras que ROCK participa en el mantenimiento de la forma redonda de las células GH3

El 98 % de las células sembradas sobre la C I-III son redondas (Figura 20A, a; figura 20B, panel izquierdo). La inhibición de la MLCK o de su activador, la Calmodulina (CaM), con ML-7 y W-7, respectivamente (Hidaka *et al.*, 1979), no cambia la proporción de células redondas (97.4 ± 1.3 % contra 97.0 ± 1.5 %, respectivamente, Figura 20A, b y c; figura 20B, panel izquierdo). En contraste, la inhibición de ROCK con Y-27 reduce la población de células redondas en un 48 ± 5 % y favorece la aparición de células con forma intermedia (40.4 ± 3.3 %) y alargada (11.2 ± 1.7 %; Figura 20A, d; figura 20B, panel izquierdo). En concordancia con estas observaciones la inhibición de la GTPasa RhoA, un activador río arriba de ROCK (Schwartz, 2004), con la toxina C3-T produjo resultados similares (Figura 20A, e; figura 20B, panel izquierdo). Por otra parte, 42.2 ± 4.9 % de las células GH3 sembradas sobre la C IV son de forma intermedia y en menor proporción alargadas (28.0 ± 7.5 %). Sin embargo, se mantuvo una población de células redondas (29 ± 7 %;

Figura 20A, f; figura 20B, panel derecho), mostrando un comportamiento heterogéneo. La inhibición de la MLCK y la CaM aumenta significativamente la población de células redonda alcanzando un 94 % y 97 % del total de la población, respectivamente, (Figura 20A, g y h; figura 20B, panel derecho). Finalmente, la inhibición de la ROCK y de la GTPasa Rho, no mostró diferencias en las proporciones de células con diferentes formas comparadas con el control (Figura 20A, i y j; figura 20B, panel derecho).

La comparación de las proporciones de las diferentes formas entre células sembradas sobre C I-III con el inhibidor de Rho y células sembradas sobre C IV, mostró que no había diferencia en la forma de las mismas, sugiriendo que la forma redonda es dependiente de la actividad de la GTPasa Rho. Así que decidimos analizar la cantidad de Rho activo (Rho-GTP). La actividad de Rho en las células sembradas sobre C I-III es 1.6 veces mayor que las células sobre C IV (Figura 20C, panel izquierdo), mostrando que el aumento de la actividad de Rho se asocia con la forma redonda. Este hallazgo está de acuerdo con lo reportado previamente por Sahai y Marshall (2003). En seguida analizamos la magnitud de Rac activo (Rac-GTP), otra GTPasa, involucrada en la polimerización de la actina en el frente de las células (Ridley *et al.*, 2003). Al contrario que Rho, Rac aumento su actividad 27 % en células cultivadas sobre C IV, con respecto a las cultivadas sobre C I-III (Figura 20C, panel derecho), sugiriendo que la GTPasa Rac favorece las formas intermedias y alargadas.

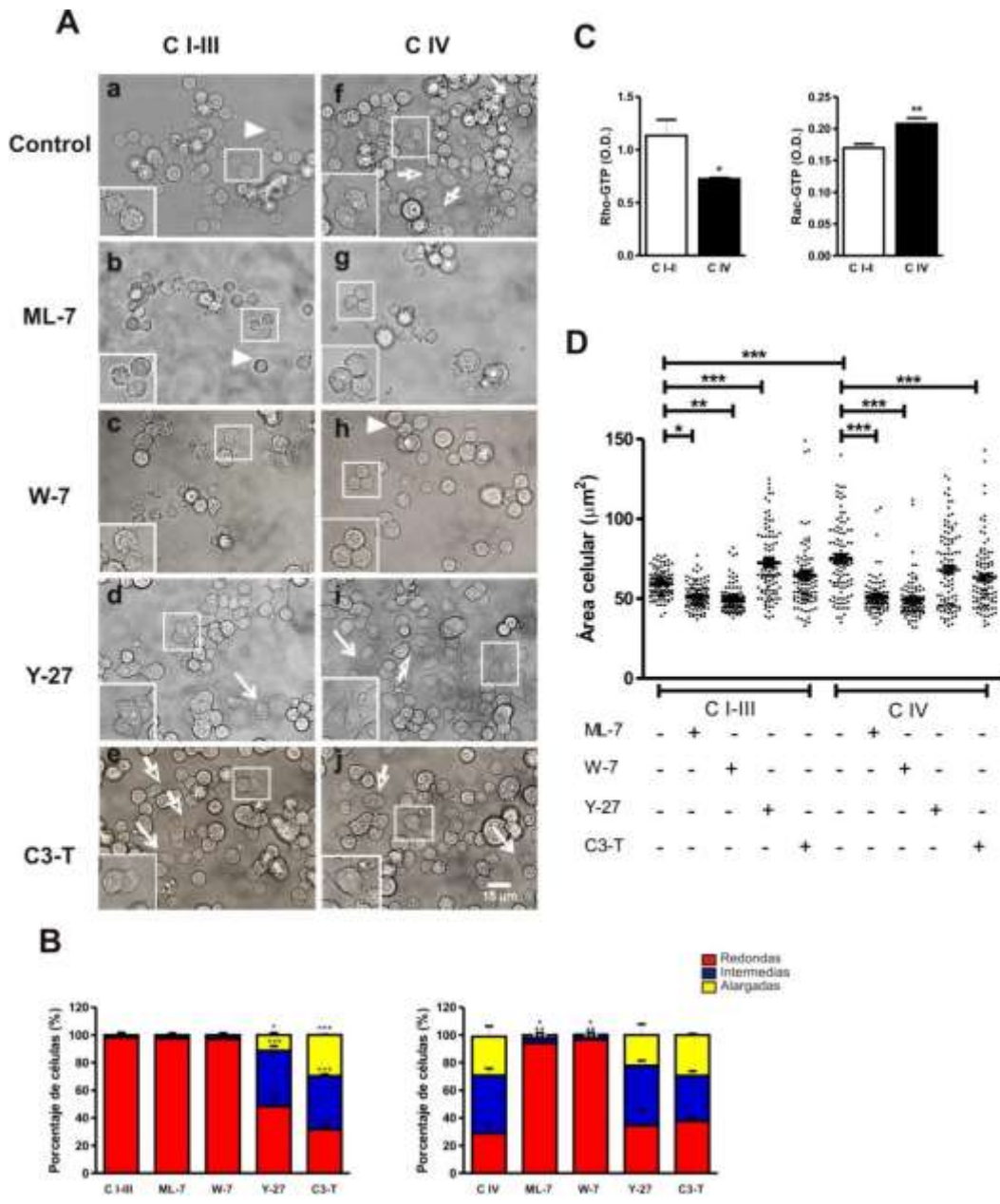


Figura 20. La inhibición farmacológica de la MLCK y la ROCK induce diferentes efectos en la forma celular. (A) Imágenes de campo claro de las células GH3 sembradas sobre la C I-III y la C IV tratadas con los inhibidores: ML-7(b, g), W-7(c, h), Y-27(d, i) y C3-T (e, j) durante 6 h. Las cabezas de flecha indican células redondas, las flechas vacías células intermedias y las flechas rellenas células alargadas. La barra representa 15 µm. (B) cuantificación de las formas celulares después del tratamiento con los inhibidores. Panel izquierdo, porcentaje de las formas celulares sobre la C I-III, panel derecho, porcentaje de formas celulares sobre la C IV (~50 células fueron contadas por experimento, n = 4-5, media ± EE, ANOVA de una vía, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). (C) Niveles de RhoA y Rac activos en células sembradas sobre la C I-III y C IV (n = 5, media ± EE, T de student, *p < 0.05). (D) área de las células sembradas sobre la C I-III y C IV tratadas con los inhibidores correspondientes (~50 células fueron contadas por experimento, n = 4-5, media ± EE, ANOVA de dos vías, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

En seguida investigamos si los cambios en la forma se asociaban con cambios en el área celular. Tomando en cuenta las diferencias en la forma después de la inhibición de ambas cinasas, nos preguntamos si se modificaba el área celular. Primero observamos que las células sobre la C I-III presentaron un área menor que las sembradas sobre C IV (Figura 20D). La inhibición de la MLCK y la CaM, en ambas matrices, redujo el área celular (14 % contra 17 % en C I-III y 31 % contra 34 % en C IV, comparada con el control). Mientras, la inhibición de la cinasa ROCK aumenta el área celular en 21% en las células sembradas sobre la C I-III, mientras que no cambia la de las células sembradas sobre la C IV. Esperábamos que la inhibición de la GTPasa Rho replicara las observaciones anteriores, sin embargo sobre la C I-III la inhibición de Rho no indujo diferencias en el área celular, pero la redujo en las células sembradas sobre C IV 16 %. La inhibición de Rac reduce el área (21 %) de las células sembradas sobre C IV (Figura 21).

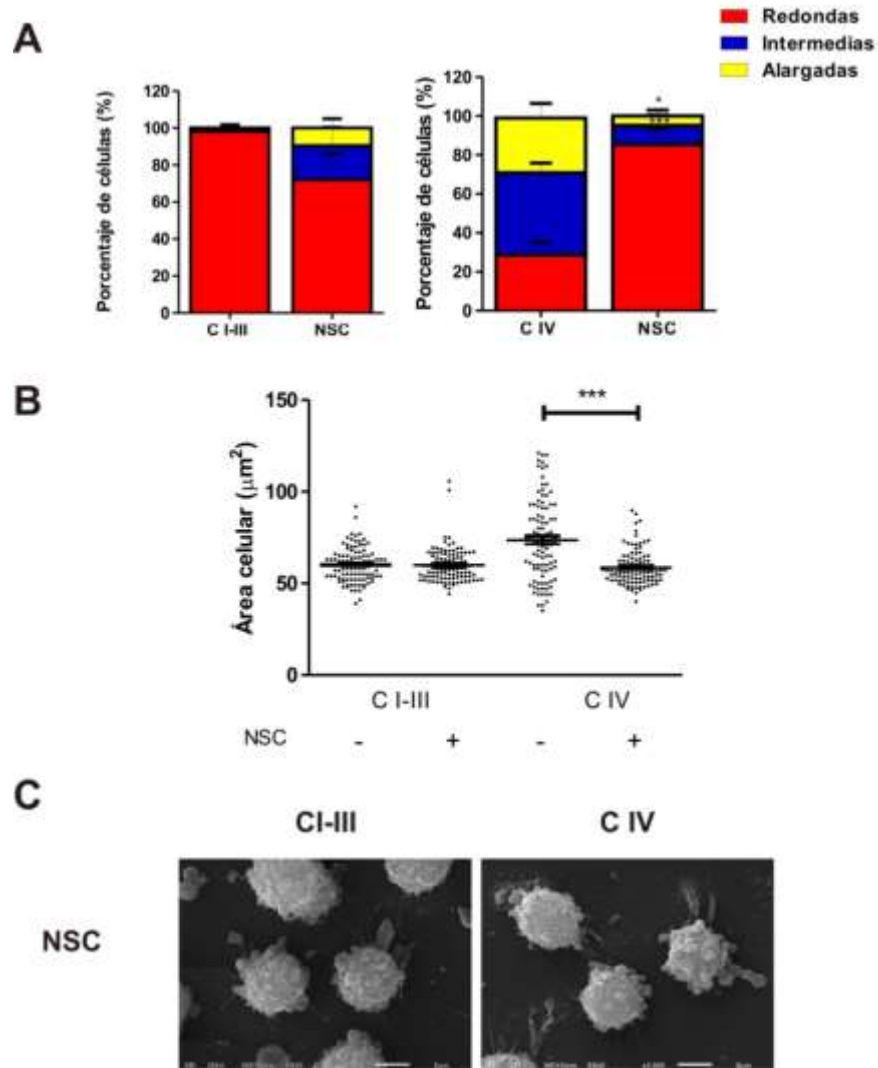


Figura 21. La inhibición farmacológica de Rac induce una forma redonda. (A) Cuantificación de las formas celulares después del tratamiento con el inhibidor NSC 23766. Panel izquierdo, porcentaje de las formas celulares sobre la C I-III; panel derecho, porcentaje de formas celulares sobre la C IV (~50 células fueron contadas por experimento, n = 3, media ± EE). (B) Área de las células sembradas sobre ambas colágenas y tratadas con el inhibidor de la GTPasa Rac (~50 células fueron contadas por experimento, n = 3, media ± EE, T de student, ***p < 0.001). (C) Organización de la membrana de células GH3 tratadas con el inhibidor de la Rac GTPasa.

El silenciamiento de la MLCK y la ROCK

Para corroborar la participación de la MLCK y la ROCK en la definición de la forma celular, disminuimos los niveles de RNA mensajero de la MLCK y la ROCK mediante el uso de RNAs de interferencia específicos para cada una de las cinasas. Los resultados de inhibición fueron muy parecidos. El silenciamiento de la MLCK resultó en la disminución de aproximadamente el 70 % de la proteína de la MLCK (Figura 22A, panel superior), mientras que el silenciamiento de la ROCK resultó en la disminución de aproximadamente 75 % de la proteína de ROCK (Figura 22A, panel inferior), comparado con las células tratadas con el siRNA “scramble” (siRNA inespecífico). Como observamos con la inhibición farmacológica, el silenciamiento de la MLCK en las células sobre la C I-III mantienen la proporción de células redondas pero reduce el área celular (Figura 22B, a y b; figura 22C). Por otra lado, el silenciamiento de ROCK aumenta la proporción de células alargadas y del área celular (Figura 22B, c; figura 22C). En cambio si las células se cultivan sobre C IV, el silenciamiento de la MLCK aumenta la forma redonda y disminuye el área celular (Figura 22B, e; figura 22C), mientras que el de la ROCK no induce cambios (Figura 22B, f; figura 22C). En conjunto, los resultados de la inhibición farmacológica y el silenciamiento de ambas cinasas sugieren que la vía de señalización de la CaM-MLCK regula la forma alargada y la extensión sobre el sustrato, mientras que la vía de señalización de Rho-ROCK participa en el mantenimiento la forma redonda.

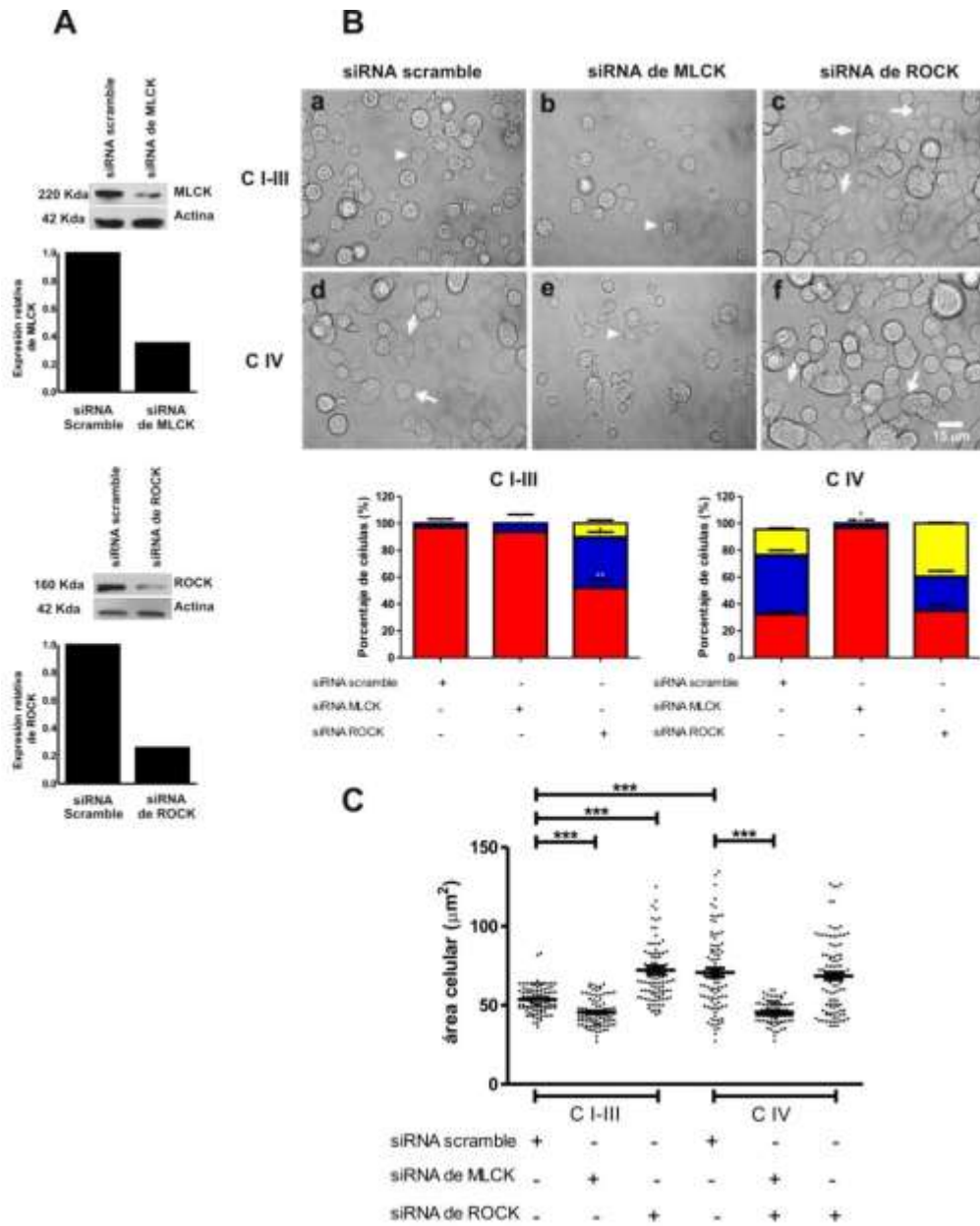


Figura 22. El silenciamiento de MLCK ROCK induce cambios en la forma celular. (A) Panel superior, Western blot y cuantificación de la MLCK en células transfectadas con el RNA de interferencia “scramble” y de la MLCK (panel inferior), Western blot y cuantificación de la ROCK en células transfectadas con el RNA de interferencia “scramble” y de la ROCK. La actina se usó como control de carga. (B) Imágenes de campo claro de células GH3 sembradas sobre la C I-III y la C IV transfectadas con los RNAs de interferencia “scramble” (panel izquierdo), de la MLCK (panel central) y la ROCK (panel derecho). Panel inferior, cuantificación de las formas celulares. Las cabezas de flecha indican células redondas, las flechas vacías células intermedias y flechas rellenas células alargadas. La barra representa 15 μm (C) área de las células sembradas sobre la C I-III y la C IV transfectadas con los RNAs de interferencia de la MLCK y la ROCK (~50 células fueron contadas por experimento, n = 3, media ± EE, ANOVA de dos vías, ***p < 0.001).

Las cinasas MLCK y ROCK se localizan en sitios distintos

Dado que la actividad de la MLCK y ROCK determinan la forma y el área de las células GH3, en respuesta a cambios de la MEC, investigamos si estas cinasas tienen una distribución espacial distinta mediante ensayos de inmunofluorescencia. En las células cultivadas sobre la C I-III, la MLCK se encontró más concentrada a nivel de sustrato y la cinasa ROCK se concentró a nivel del córtex (Figura 23A). Sobre la C IV, tanto la MLCK como la ROCK estaban distribuidas homogéneamente en el cuerpo de la célula (Figura 23B), sugiriendo que ambas cinasas se localizan de manera diferente en una célula alargada, en comparación con una redonda.

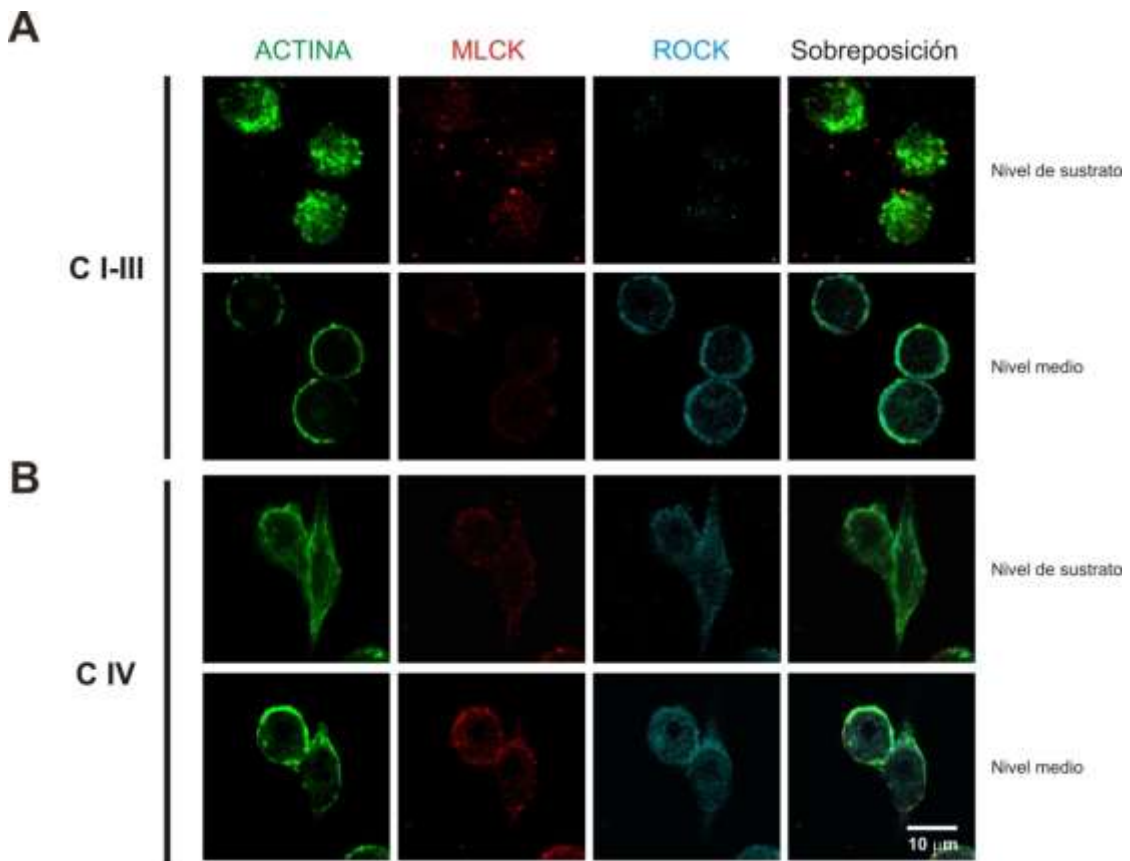


Figura 23. Localización subcelular de la MLCK y la ROCK. Imágenes de fluorescencia de células sembradas sobre (A) C I-III y (B) C IV, teñidas con faloidina (verde) y anticuerpos contra la cinasa MLCK (rojo) y la cinasa ROCK (cian). En las células cultivadas sobre la C I-III, la MLCK se encontró más concentrada a nivel de sustrato y la cinasa ROCK se concentró a nivel del córtex. Sobre la C IV, tanto la MLCK como la ROCK estaban distribuidas homogéneamente en el cuerpo de la célula. Barra = 10µm.

Participación de la MLCK y la ROCK en la organización y dinámica de la membrana plasmática

Para obtener información adicional de cómo la inhibición de la MLCK y la ROCK impactaba la dinámica de la membrana y las protrusiones de membrana (Figura 24A). Analizamos la organización de la membrana plasmática. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran que sobre C I-III las células predominantemente formaron blebs ($89 \pm 5 \%$, con un promedio de 20 ± 3 blebs por célula; Figura 24A, a). La inhibición de la MLCK y la CaM, resultó en una disminución del número de células que presentaban blebs ($36 \% \pm 3 \%$ y $31 \pm 4 \%$, además de una disminución en el número de blebs por célula (3 ± 1 y 4 ± 1 blebs por célula, respectivamente). En lugar de presentar estas protrusiones de membrana, la mayoría de las células tenían una apariencia lisa, y con protrusiones de membrana parecidas a dedos (Figura 24A, b y c). Las células tratadas con el inhibidor de la cinasa ROCK organizaron su membrana en abundantes protrusiones parecidas a dedos (entre 35 y 60 protrusiones por célula, Figura 24A, d), mientras que las células tratadas con el inhibidor de la GTPasa Rho, organizaron la membrana principalmente en lamelipodios (Figura 24A, e). Cabe mencionar que después de la inhibición de Rho y ROCK, la formación de los blebs se disminuyó aún más ($10 \pm 2 \%$), las células presentaron aproximadamente 1 ± 1 bleb por célula. Sobre la C IV, como se describió previamente, la mayoría de las células mostraron una forma intermedia-alargada y organizaron la membrana en lamelipodios (Figura 24A, f). La inhibición de la MLCK y la CaM indujo el abatimiento de los lamelipodios y se favoreció la formación de protrusiones parecidas a dedos (más de 17 y 30 por célula respectivamente). Cabe mencionar que una pequeña población ($4 \pm 1 \%$) mantuvo la presencia de blebs (Figura 24A, g y h). De la misma manera, la inhibición ROCK favoreció la formación de protrusiones parecidas a dedos (aproximadamente 21 por célula, Figura 24A, i), mientras que la inhibición de la GTPasa Rho no mostró diferencias en la organización de la membrana en comparación con las células control (Figura 24A, j). Cabe

mencionar que la inhibición de la GTPasa Rac en ambas colágenas indujo la formación de blebs. Sobre la C I-III incluso los blebs eran más grandes que en las células control (2.3 ± 0.5 y 1.3 ± 0.3 μm de diámetro, respectivamente; Figura 21C) Para caracterizar la dinámica de las protrusiones de membrana, después de la inhibición de ambas cinasas, se analizó la velocidad de protrusión de la membrana mediante quimogramas. Estos ensayos nos permiten evaluar la dinámica de una región de la membrana en el tiempo. La membrana de las células sembradas sobre la C I-III, presentó un aspecto rugoso y borde fluctuante, sugiriendo una extensión y retracción dinámica de la membrana (Figura 24B, panel superior). En contraste, el aspecto de la membrana sobre la C IV, fue más estable (Figura 24C, panel superior). La membrana de las células redondas protruye 2.6 más rápidamente que la de las células extendidas (Figura 24B y 24C, paneles inferiores). En las células cultivadas sobre la C I-III, la inhibición de la MLCK y su activador, la CaM, redujo la rugosidad así como la velocidad con la que aparecen las protrusiones (Figura 24B). En estas condiciones, la inhibición de la cinasa ROCK y la GTPasa Rho resultó en una apariencia de la membrana menos rugosa y en la disminución de la velocidad de protrusión del borde de la membrana (0.25 ± 0.02 , 0.30 ± 0.03 $\mu\text{m}/\text{seg}$; Figura 24B). La inhibición de la MLCK y la CaM en células sembradas sobre C IV, aumenta la rugosidad y la velocidad de protrusión de la membrana (Figura 24C), y de ROCK y Rho en bordes semi-planos (Figura 24C). Estos resultados sugieren que la cinasa MLCK se relaciona con una estabilidad de las protrusiones, mientras que la ROCK se relaciona con una mayor dinámica de la membrana.

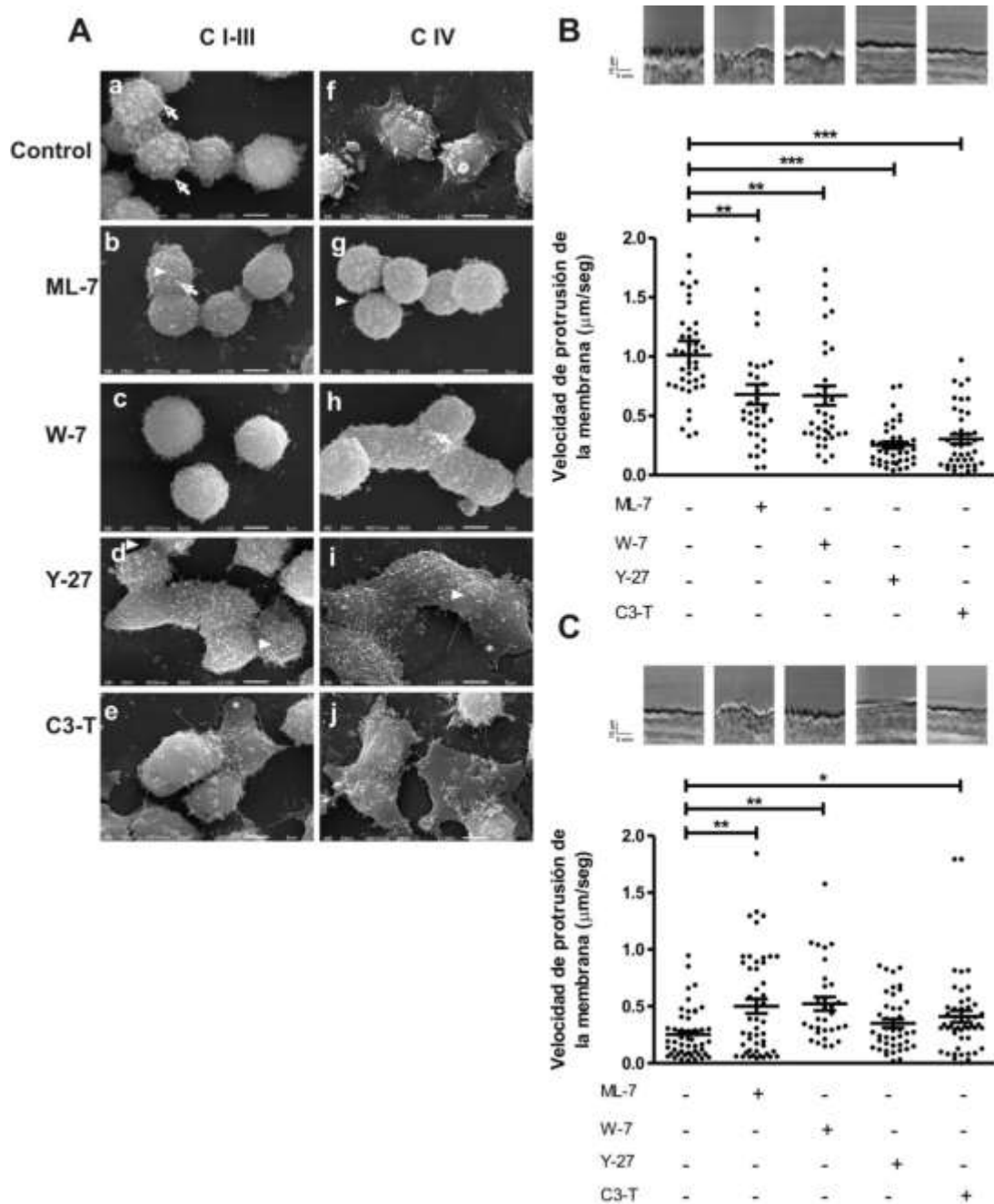


Figura 24. Organización y dinámica de la membrana. (A) Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la organización de la membrana en blebs (flechas), proyecciones pericidas a dedos (cabeza de flechas) o lamelipodios (asteriscos). (B) panel superior, quimogramas representativos de células sembradas sobre la C I-III; panel inferior, velocidad de protrusiones de membrana después de la inhibición de la MLCK (b y g), la CaM (c y h), la ROCK (d y i) y la Rho (e y j). (C) Panel superior, quimogramas representativos de células en contacto con la C IV; panel inferior, velocidad de protrusiones de membrana después de la inhibición de la MLCK, la CaM, la ROCK y la Rho. Las imágenes muestra la dinámica de una región de la membrana durante 20 min. ~40 quimogramas fueron realizados en cada condición, estos análisis se llevaron a cabo en el programa ImageJ, n = 3, media ± EE, ANOVA de una vía, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

Se ha descrito que la tensión de la membrana plasmática es un factor importante para la modulación de la dinámica de la membrana (Sheetz y Dai., 1996; Diz-Muñoz *et al.*, 2013), así que nos preguntamos qué relación hay entre la actividad de las cinasas MLCK y ROCK y la tensión del córtex. Para responder esta cuestión realizamos análisis de microscopia de fuerza atómica. Las mediciones de la tensión cortical fueron obtenidas en $25 \mu\text{m}^2$ de la superficie de la célula, la sección de la membrana analizada representa la membrana y la red de actina-miosina (Figura 25). Las células sobre la C I-III presentaron un valor de módulo de Young promedio de 4676 ± 285 Pa, mientras que sobre la C IV las células presentaron una tensión cortical de 2592 ± 173 Pa, valor 2.6 veces menor que el presentado por las células sembradas en la condición anterior, indicando que las células redondas presentan una mayor tensión que las células alargadas. La inhibición de la MLCK con ML-7, reduce la tensión cortical en ambas matrices, y la de ROCK con Y-27, reduce la tensión aún más. Sugiriendo que la cinasa ROCK genera la mayor parte de la tensión cortical y que la MLCK participa en menor proporción en la misma.

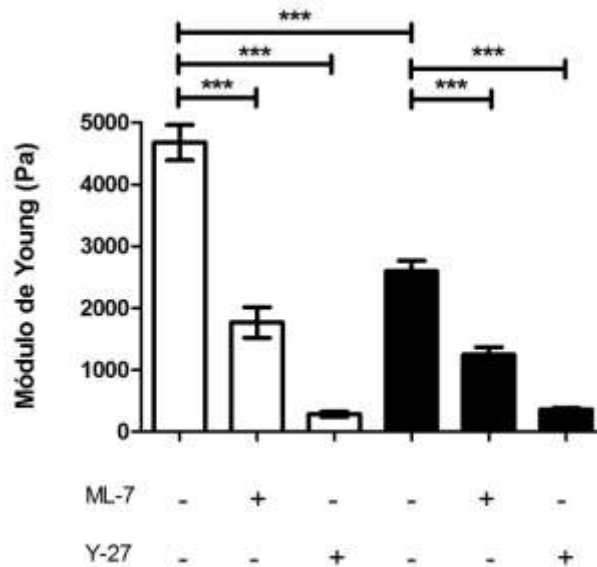


Figura 25. Tensión del córtex. Módulo de Young de las células GH3 sembradas sobre C I-III (barras blancas) y sobre la C IV (barras negras) tratadas con los inhibidores ML-7 y Y-27 durante 6 h. (~25 indentaciones se realizaron por célula, de 5-9 células fueron analizadas por condición, media \pm EE, ANOVA de dos vías, *** $p < 0.001$).

La fosforilación de la MLC es dependiente de la colágena

La fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) es el evento molecular que permite la contracción de los filamentos de actina. Esta fosforilación está controlada principalmente por las cinasas MLCK y ROCK (Ikebe *et al.*, 1987; Itho *et al.*, 1999). Así que nuestro siguiente objetivo fue analizar la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, como una medida indirecta de la tensión interna de la célula. Primero comparamos los niveles de la MLC fosforilada en los residuos de Ser-19 y Tre-18 y observamos que las células en contacto con la C I-III mostraron una mayor fosforilación en el residuo de Tre-18 y una menor de Ser-19 que las células sembradas sobre la C IV (Figura 26A). En seguida evaluamos las fosforilaciones de la MLC después de la inhibición de las cinasas. Sobre la C I-III, la inhibición de la MLCK y la ROCK, disminuyen la fosforilación de Tre-18 en un 29 % y 36 %, respectivamente. Con respecto a la fosforilación de la Ser-19, se observó una disminución dramática en este residuo al inhibir a la MLCK (99 %). Si bien la inhibición de la cinasa ROCK, también resultó en una reducción de la fosforilación de este residuo (32 %), no tan dramática como la observada con la inhibición de la MLCK (Figura 26B). La inhibición de ambas cinasas, en las células en contacto con la C IV disminuyó la fosforilación en los residuos Tre-18 y Ser-19 a niveles semejantes (Figura 26C). Esos resultados sugieren que sobre la C I-III, la MLCK fosforila preferencialmente a la MLC en el residuo de Ser-19, mientras que sobre la C IV, esta diferencia no se presenta.

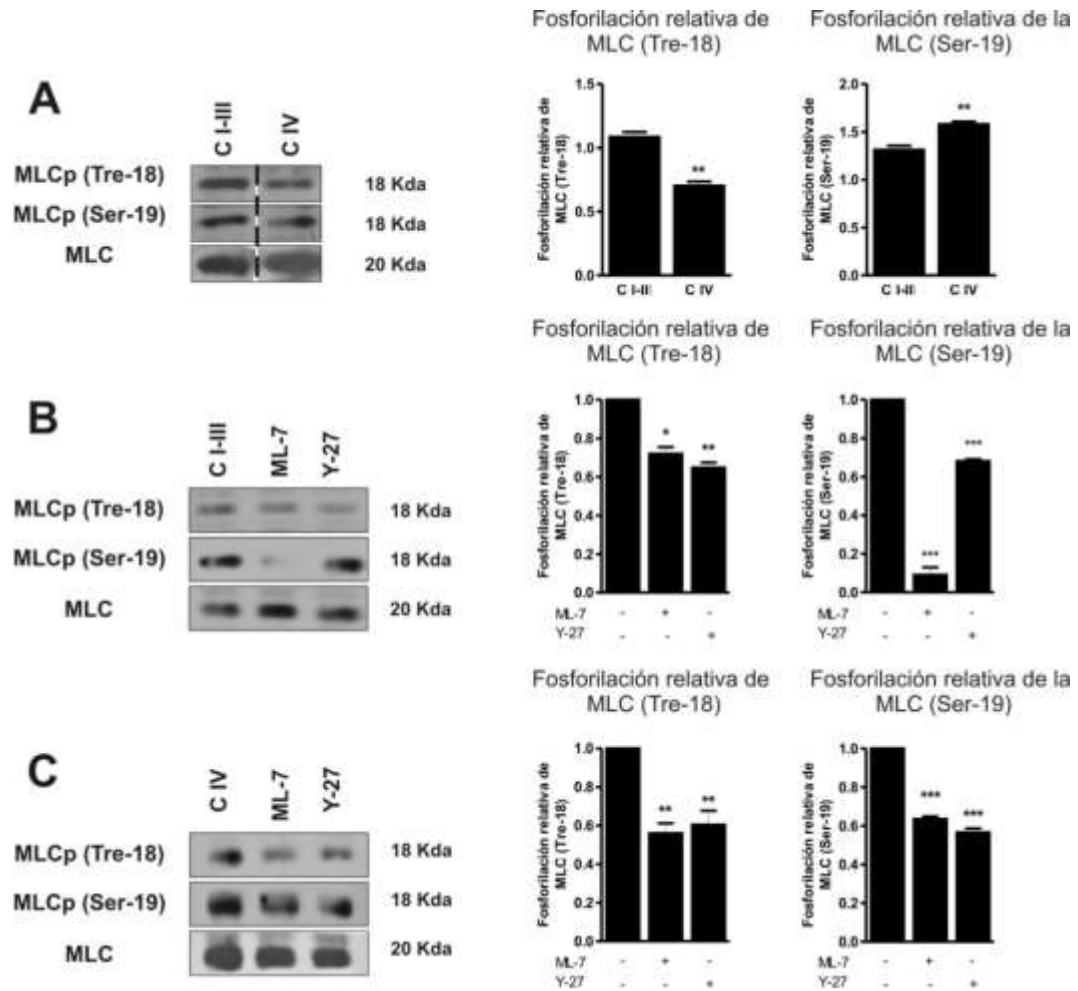
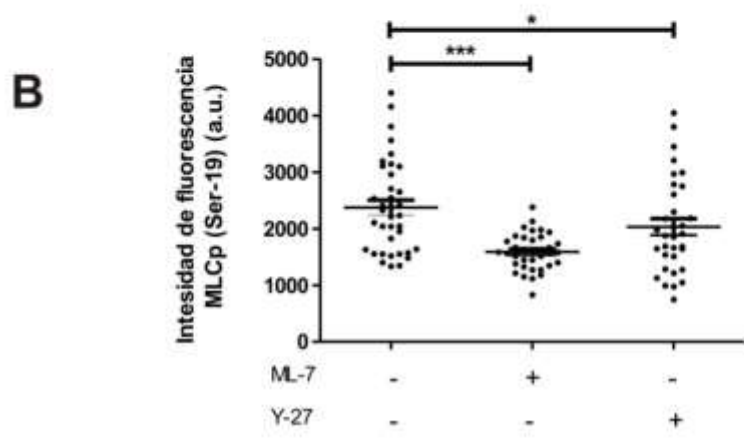
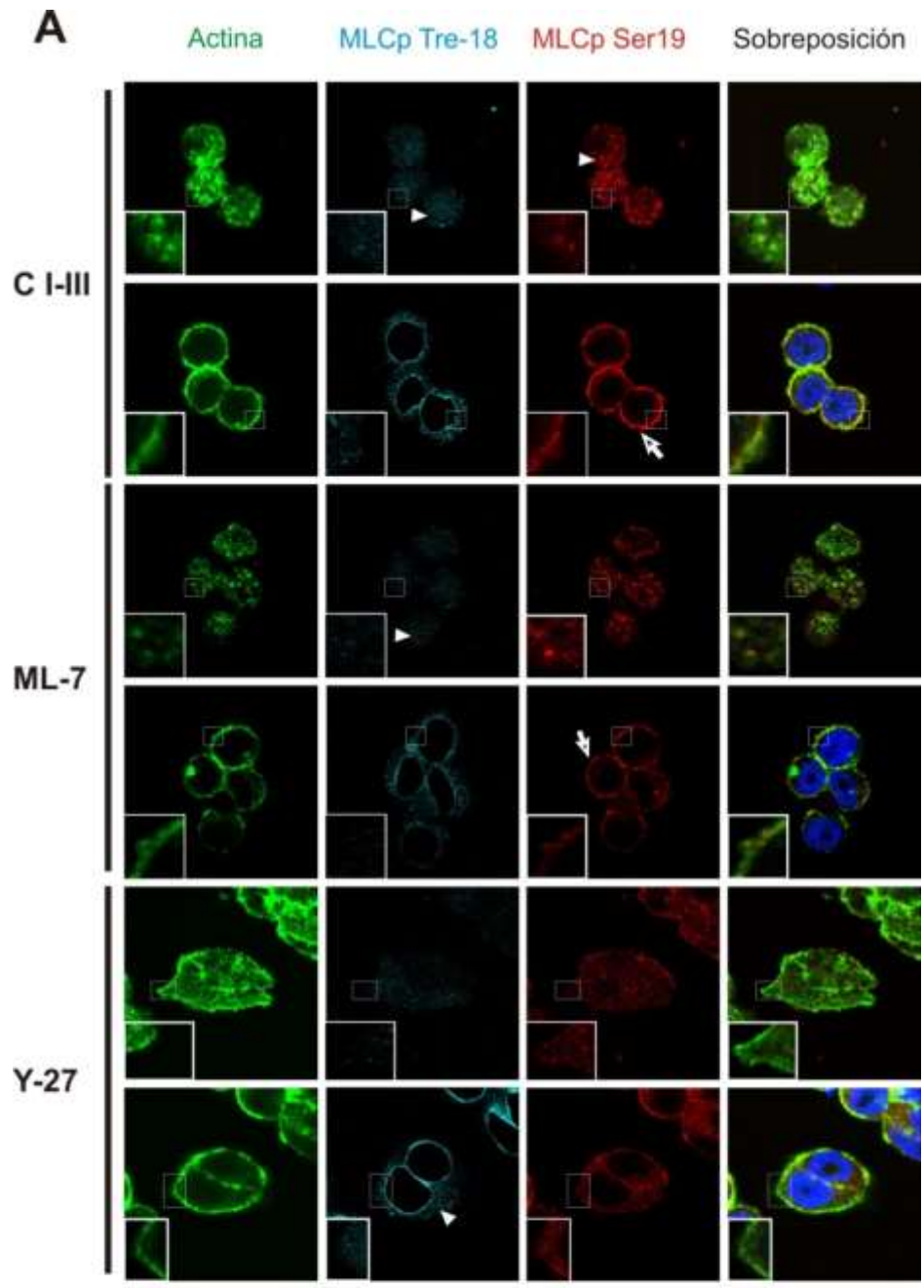


Figura 26. Fosforilación de la cadena ligera de la miosina. (A) Panel izquierdo, Western blot representativos de la fosforilación de la MLC Ser-19 y MLC Tre-18 en las células GH3 sembradas sobre la C I-III y sobre la CIV, y tratadas con los inhibidores de la MLCK y la ROCK durante 6 h. La línea punteada indica el lugar donde los geles fueron cortados. (B, C), Paneles derechos, análisis densitométricos (n = 3, media ± EE, T de student, **p < 0.01 en A; ANOVA de dos vías, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 en B y C).

Enseguida, nos preguntamos donde se localiza la MLC fosforilada en ambos residuos. Sorprendentemente, la MLCp en el residuo de Tre-18 se localiza en el núcleo, mientras que MCL-p Ser-19 no. Se ha descrito la presencia de la miosina II en el núcleo (Rodgers, 2005; Li y Sarna, 2009). Puesto que la MLC nuclear está fosforilada en el residuo Tre-18, incluso cuando las cinasas son inhibidas debe haber otra cinasa encargada de dicha fosforilación. Por ello, para aclarar la localización de la MLCp en la membrana y el citosol, decidimos excluir la señal nuclear. Las imágenes de inmunofluorescencia

mostraron que, sobre la C I-III, la MLC fosforilada en el residuo de Ser-19 se distribuye homogéneamente a nivel de sustrato y si bien la MLC fosforilada en el residuo de Tre-18 también se distribuye a este nivel, la inmunotinción es más tenue. En cortes ópticos superiores, a la mitad de la altura de la célula, se observa a la MLCp Ser-19 distribuida en el córtex, mientras que la MLCp Tre-18 se distribuyó en el citoplasma y ligeramente en el córtex (Figura 27A). Después de la inhibición de ambas cinasas la distribución fue semejante a la observada en el control, sin embargo la inmunotinción de la MLC-p Ser 19 en el córtex fue menos intensa después de la inhibición de la MLCK. Sobre la C IV, la MLCp Ser-19 se distribuyó de manera semejante a la previamente observada sobre C I-III. Sin embargo la inmunotinción de la MLCp Tre-18 se perdió casi por completo cuando se inhibió a la ROCK (Figura 27C). En los experimentos previos de western blot se observó una disminución significativa cuando se inhibía la MLCK sobre CI-III, sin embargo no se observaron cambios en la distribución, así que decidimos evaluar la intensidad de fluorescencia, en las células completas, de la MLCp Ser-19 después de la inhibición de la MLCK y la ROCK (Figura 27B). Corroborando nuestras observaciones, la inhibición de la MLCK disminuyó significativamente la intensidad de fluorescencia de la MLCp Ser 19. Estos datos indican que, aun cuando no observamos cambios en distribución de la proteína fosforilada, el efecto de la inhibición de la MLCK y la ROCK es disminuir la cantidad de la MLC fosforilada.



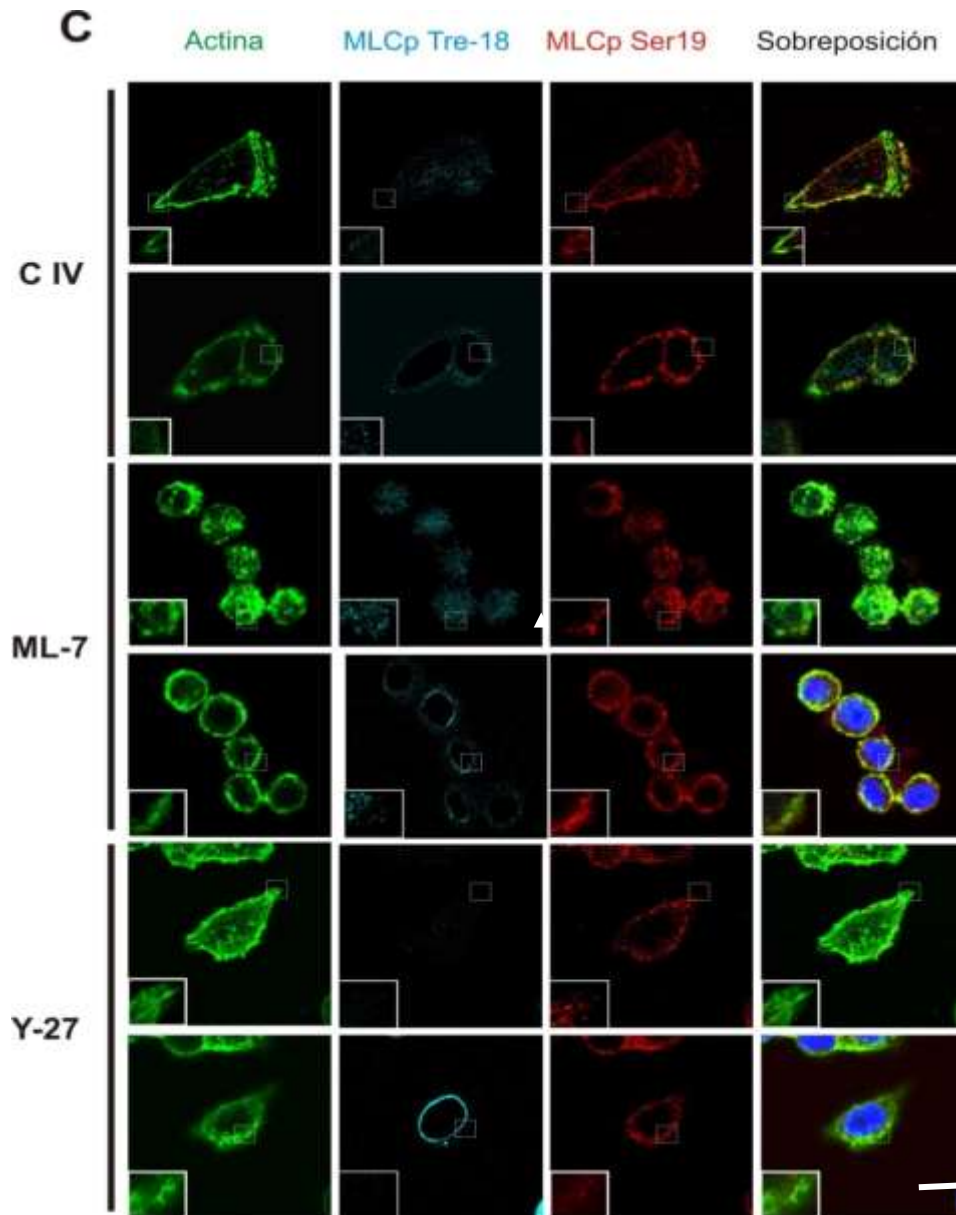


Figura 27. Efecto de la inhibición de la MLCK y la ROCK en la regulación espacial de la fosforilación de la MLC y la F-actina. (A) Imágenes de fluorescencia de las células GH3 sembradas sobre la C I-III y (C) sembradas sobre la C IV y tratadas con los inhibidores de MLCK y ROCK. Las células fueron inmunoteñidas con anticuerpos contra la fosforilación de la MLCp Ser-19 (rojo) y MLCp Tre-18 (cian), la actina filamentosa fue teñida con faloidina (verde) y los núcleos con DAPI (azul) (B) cuantificación de la intensidad de fluorescencia de células sembradas sobre C I-III y tratadas con el inhibidor de MLCK (Media \pm EE, ANOVA una vía, * $p < 0.05^{***}$, $p < 0.001$). Las flechas señalan el córtex y las cabezas de flechas el citoplasma. La barra representa 10 μm .

El arreglo del citoesqueleto de actina depende del sustrato y de la participación de las cinasas

La dinámica en la polimerización y despolimerización del citoesqueleto de actina genera los cambios en la forma celular y las protrusiones de membrana (Mogilner y Keren, 2009). En vista de que la actividad y localización de MLCK y ROCK modifica la forma celular, analizamos la organización del citoesqueleto de actina, en presencia de inhibidores de ambas cinasas en células teñidas con faloidina, una toxina que se une exclusivamente a la actina filamentosa. Para observar en detalle el arreglo del citoesqueleto a nivel de sustrato analizamos las primeras dos secciones ópticas a este nivel. Sobre la C I-III las células GH3 organizan el citoesqueleto de actina en placas en la periferia y dentro de la célula como una malla con pequeñas placas (Figura 28A). Sobre la C IV, la actina se observa condensada en un extremo de las células y en filopodios de diferentes longitudes, sugiriendo que éste es el frente de migración. En el extremo opuesto de las células, los filamentos de actina se organizan en pequeños haces de fibras de estrés, sugiriendo que se trata de la parte posterior (Small *et al.*, 1998). Además, se observan pequeñas fibras y placas en el centro de la célula (Figura 28D). La inhibición de la MLCK dio como resultado una disminución en el tamaño de las placas en el cuerpo de la célula en las células en contacto con la C I-III (Figura 28B) y las células sobre C IV muestran la formación de un anillo denso de haces de actina en la periferia, sugiriendo que las células perdieron su frente de migración (Figura 28E). Por otro lado, la inhibición de la ROCK resultó en la condensación en la periferia alrededor de las células y la formación de micro-espigas en células sobre la C I-III, sin mostrar una clara polarización de un frente de migración (Figura 28C) y se observó que las células sobre la C IV forman una mayor cantidad de filopodios (Figura 28F).

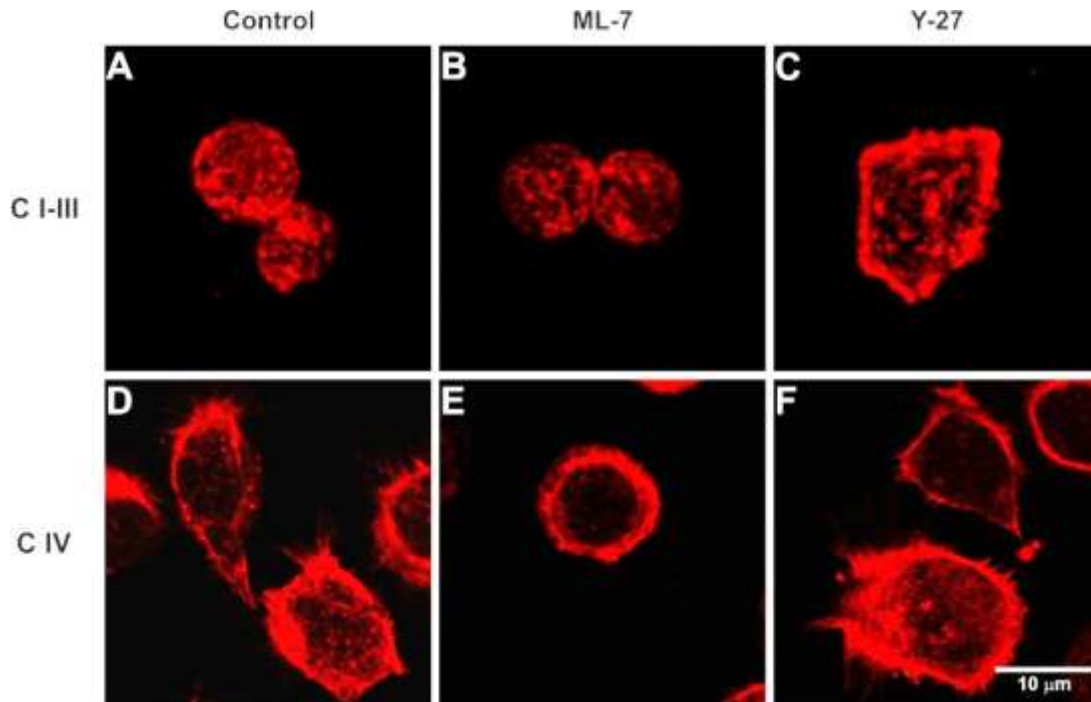


Figura 28. Arreglo del citoesqueleto de actina. Imágenes de confocal representativas de células GH3 sembradas sobre la C I-III y C IV. Las células fueron tratadas con los inhibidores de MLCK y ROCK durante 6 h y posteriormente teñidas con faloidina rodaminada Barra =10 µm

La actividad de la MLCK y la ROCK es diferencial en la motilidad de las células GH3

Las cinasas MLCK y ROCK han sido implicadas en la generación de fuerzas requeridas para la migración y adhesión (Ridley *et al.*, 2003). Por lo tanto, evaluamos la motilidad celular después de la inhibición de ambas cinasas. Para examinar el comportamiento motil de las células se adquirieron imágenes de campo claro a lo largo de un período (60 min tomando imágenes cada 1 min). Estas imágenes se analizaron para medir la velocidad, distancia acumulada y direccionalidad en cada una de las condiciones.

Las células sobre la C I-III mostraron una mayor velocidad de desplazamiento ($0.72 \pm 0.07 \mu\text{m}/\text{seg}$) así como una mayor distancia acumulada ($45.85 \pm 2.58 \mu\text{m}$), comparadas con células sembradas sobre la

C IV ($0.29 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{seg}$; $16.51 \pm 1.351 \mu\text{m}$, respectivamente, Figura 29A, B, D y E). Sin embargo, aunque las células sobre la C I-III mostraron mayor velocidad y distancia, el movimiento fue aleatorio, que se refleja en una disminución en la persistencia de migración ($0.36 \pm 0.01 \text{ua}$). Las células sobre la C IV mostraron un movimiento más direccionado ($0.61 \pm 0.02 \text{ua}$; Figura 29C y F). De manera interesante, las células GH3 sobre la C I-III y sobre la C IV respondieron de manera semejante a la inhibición de la MLCK y la ROCK (Figura 29A-F). En las células sobre la C I-III, la inhibición de la MLCK indujo una velocidad ($1.00 \pm 0.07 \mu\text{m}/\text{seg}$) significativamente mayor (36 %) que la observada en las células control, así como una distancia acumulada ($60.85 \pm 4.541 \mu\text{m}$) mayor (32 %), pero una disminución (52 %) en la persistencia en la dirección del movimiento. Mientras tanto, las células con la inhibición de la ROCK muestran una velocidad ($0.33 \pm 0.025 \mu\text{m}/\text{seg}$) significativamente menor (55 %) con respecto al control, así como una disminución en distancia acumulada (57 %) sin cambios en la persistencia. Sobre la C IV el fenómeno de la inhibición de la MLCK es similar al observado sobre la C I-III, las células presentan una velocidad ($0.59 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{seg}$) mayor (50 %) acompañada de un aumento en la distancia acumulada (106 %), pero nuevamente con una disminución en la persistencia (47 %). Finalmente, la inhibición de la ROCK redujo la velocidad ($0.18 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{seg}$); 40 % así como la distancia desplazada 25 %, sin afectar la persistencia en la direccionalidad. La adhesión al sustrato de las células cultivadas sobre la C I-III es menor (22 %) que la de las células sembradas sobre la C IV (Figura 29G). En ambas matrices, la inhibición de la MLCK resultó en una disminución de la adhesión (19 % en las células sobre la C I-III y 23 % en las células sobre la C IV), la cual se correlaciona con el aumento en la velocidad y la distancia acumulada, mientras la inhibición de la cinasa ROCK no cambió la adhesión celular.

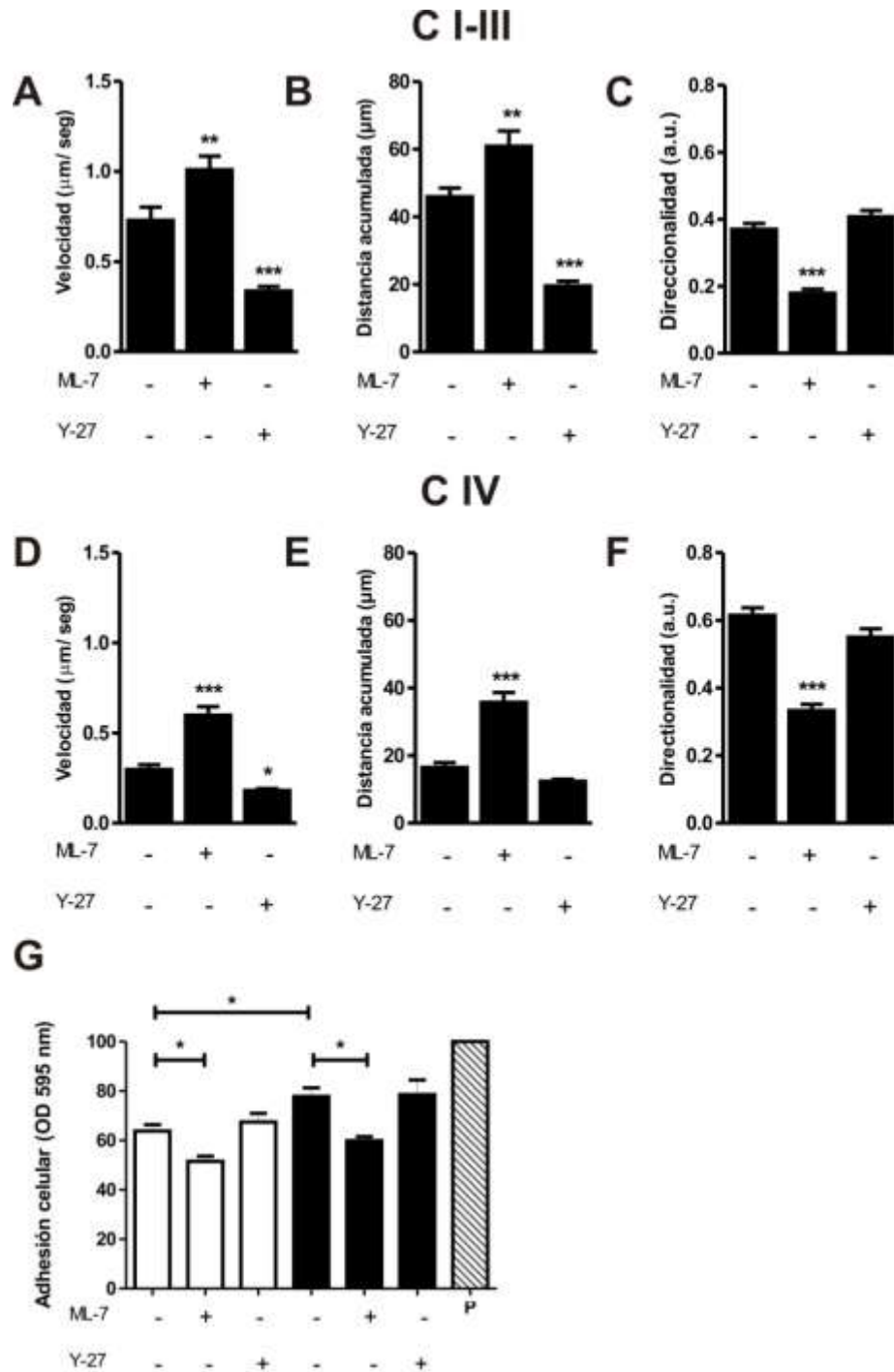


Figura 29. Efectos de la inhibición de la MLCK y la ROCK en la migración celular. (A y D), velocidad de migración; (B y E), distancia acumulada y (C y F), persistencia en la dirección de las células GH3 sembradas sobre la C I-III y la C IV tratadas con los inhibidores ML-7 y Y-27 durante 6 h (~50 células fueron analizadas por experimento, n = 4, media ± EE, ANOVA de una vía, *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001). (G) Porcentaje de adhesión celular sobre C I-III (barras blanca), C IV (barras negras) y Poli-D-lisina como control (P, barra con franjas) después del tratamiento con ML-7 y Y-27 durante 6 h. (n = 3, media ± EE, ANOVA de dos vías, *p< 0.05)

Para corroborar las observaciones en la motilidad, decidimos utilizar nuevamente el abordaje de los RNAs de interferencia para silenciar a la MLCK y ROCK. Consistente con lo observado con la inhibición farmacológica, el silenciamiento de la MLCK y la ROCK mostró resultados similares en los parámetros analizados previamente de velocidad, distancia acumulada y direccionalidad (Figura 30). En conjunto estos resultados muestran que la actividad de la cinasa MLCK se correlaciona con un movimiento lento y persistente, mientras que la cinasa ROCK se relaciona con un movimiento rápido, azaroso y con baja adhesión.

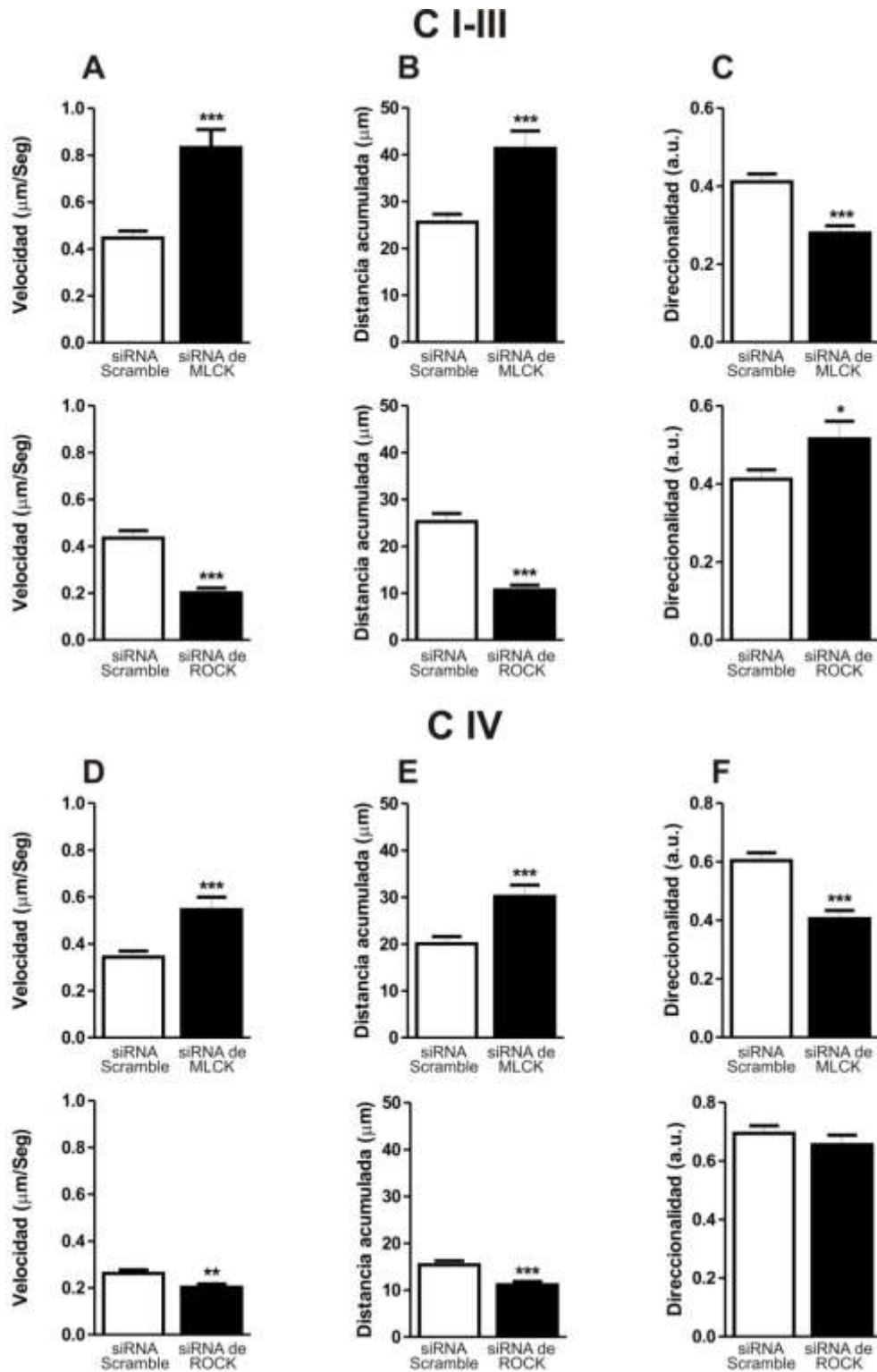
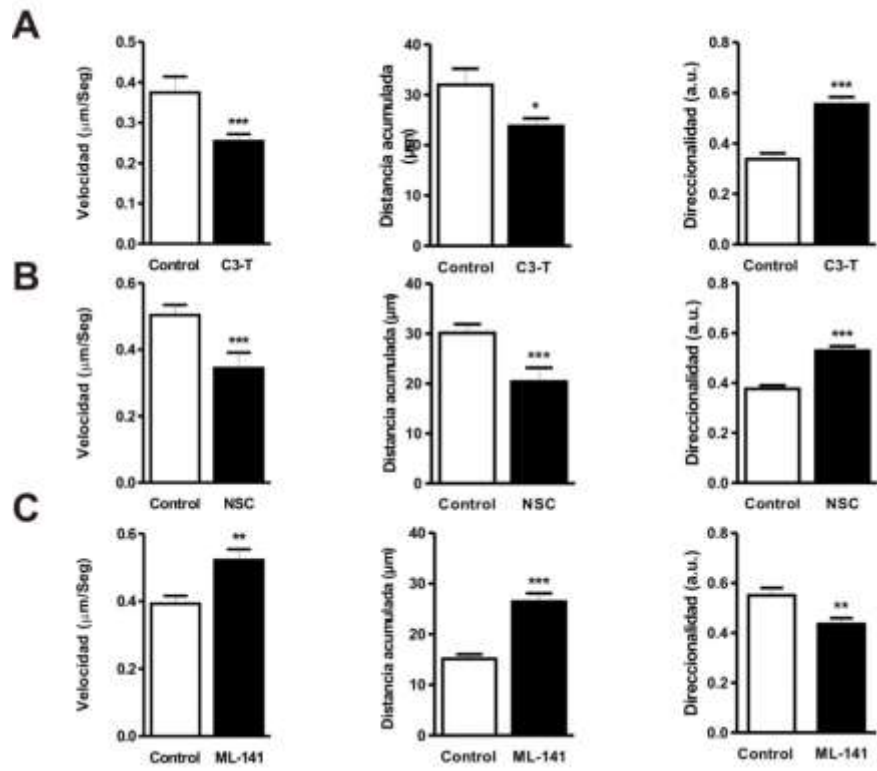


Figura 30. Migración de células deficientes de la MLCK y la ROCK. (A y D) velocidad de migración; (B y E) distancia acumulada y (C y F) persistencia en la dirección de las células GH3 sembradas sobre la C I-III (panel superior) y C IV (panel inferior) tratadas con los siRNAs de MLCK y ROCK. (~50 células fueron analizadas por experimento, $n = 3$, mean \pm SEM, T de student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

La participación de las Rho-GTPasas en la motilidad de las células GH3 depende del sustrato

Considerando que la familia de las Rho-GTPasas (Rho, Rac, Cdc42) también participa en la remodelación del citoesqueleto y en la contracción de la actina-miosina (Ridley, 2001), es necesario analizar su participación en la motilidad de las células GH3 sobre los dos tipos de colágenas estudiadas. La inhibición de la GTPasa Rho, resultó en un comportamiento similar al observado cuando se inhibió, su efector, la cinasa ROCK (Figura 31A, D; Figura 29). En células sobre la C I-III, la inhibición de la GTPasa Rac disminuyó la velocidad de migración, así como la distancia migrada acumulada, mientras que aumento la persistencia en la dirección del movimiento, en comparación con las células control (Figura 31B). En contraste, la inhibición de la GTPasa Rac en las células sembradas sobre la C IV, aumentó la velocidad y la distancia acumulada, mientras que disminuyó la direccionalidad (Figura 31E). Finalmente, la inhibición de la GTPasa Cdc42 indujo un aumento en la velocidad y en la distancia acumulada, y una disminución ligera en la direccionalidad las células sembradas sobre la C I-III y C IV (Figura 31C y F).

C I-III



C IV

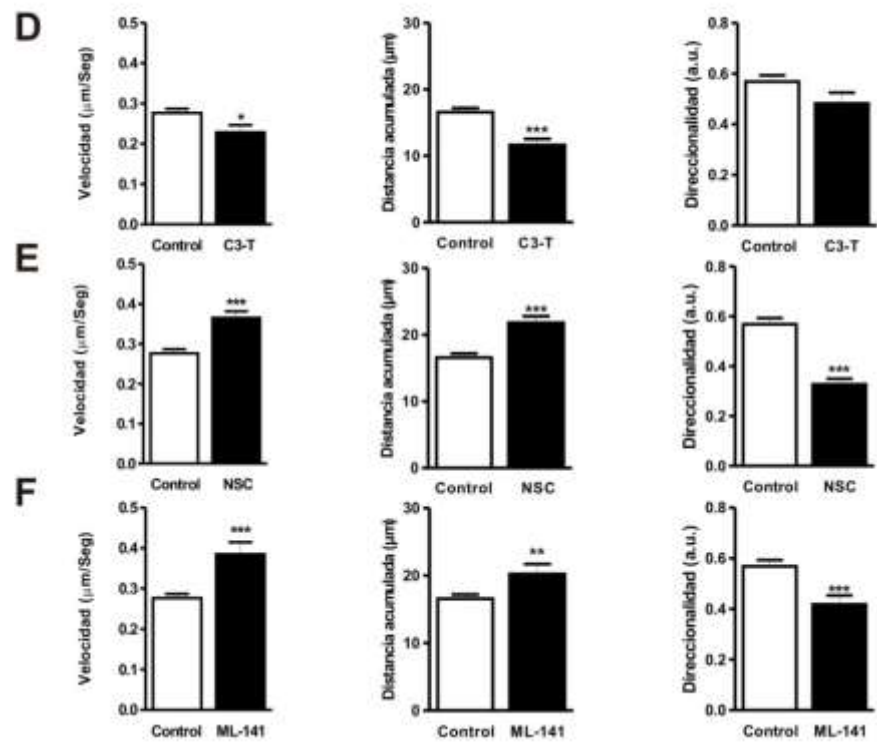


Figura 31. Efectos de la inhibición de las Rho-GTPasas en la migración celular. Las células GH3 sembradas sobre la C I-III y la C IV fueron tratadas con los inhibidores: (A, D) C3-T, (B, E) NSC, y (C, F) ML-141 durante 6 h. Panel izquierdo, velocidad de migración, panel central, distancia acumulada y panel derecho persistencia en la dirección. (~50 células fueron analizadas por experimento, n = 3, media ± EE, T de student, *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001)

La secreción de las hormonas es modulada por el tipo de colágena y la participación de las cinasas

Las células GH3 secretan tanto hormona de crecimiento (GH) como prolactina (PRL), así que nos preguntamos si la generación de tensión regula la secreción hormonal. La secreción de la GH fue mayor que la secreción de la PRL en ambas matrices (Tabla 3). La inhibición de la cinasa ROCK disminuye significativamente la secreción de la GH cuando las células crecen sobre la C I-III y no se modifica en las otras condiciones. La secreción de PRL aumenta si las células se cultivan sobre la C I-III en comparación con las que contactan la C IV. La inhibición de ambas cinasas resultó en una disminución en la secreción de la PRL en las células sobre la C I-III, pero no cambia en las células sembradas sobre la C IV. Estos resultados muestran que las colágenas tanto como la tensión de regulan la secreción hormonal.

Tabla 3. Secreción de la Prolactina y de la hormona de crecimiento en el medio de cultivo.				
MEC	INHIBIDOR		Secreción de GH (ng/ml)	Secreción de PRL (ng/ml)
	ML-7	Y-27		
CI-III	-	-	952.8 ± 53.6	224.6 ± 16.9 ^a
	+	-	803.3 ± 38.6	162.2 ± 11.6 [*]
	-	+	609.9 ± 56.6 ^{**}	157.2 ± 3.6 ^{**}
CIV	-	-	880.0 ± 86.9	163.8 ± 11.0 ^a
	+	-	946.9 ± 32.2	230.4 ± 35.0
	-	+	695.6 ± 111.9	207.4 ± 21.2

MEC: Matriz extracelular; PRL: Prolactina; GH: hormona de crecimiento. n = 3, mean ± SEM, ANOVA de dos vías, ^ap < 0.05, ^{**}p < 0.01.

Cultivo primario de hipófisis

Finalmente nos preguntamos si las células somatolactotropas provenientes de la adenohipófisis de rata respondían de manera similar a la MEC. De manera interesante en ambas matrices las células del cultivo primario presentaron una forma redonda (Figura 32), sugiriendo que la capacidad de responder de manera diferencial a las colágenas es una característica de las células GH3, las cuales cabe recordar, son tumorales.

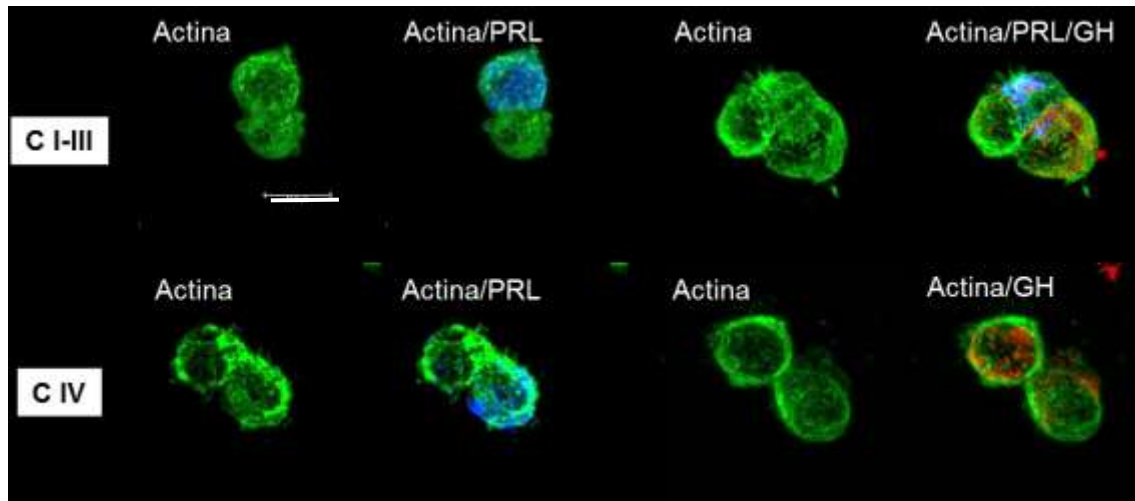


Figura 32. Células de cultivo primario de adenohipófisis de rata adulta sobre matrices de colágena. Las células del cultivo primario fueron sembradas sobre la C I-III o sobre la C IV durante 48 h. Posteriormente fijadas y teñidas con faloidina (verde) y con anticuerpos contra la prolactina (Azul) y la hormona de crecimiento (rojo). Tanto en C I-III como C IV, las células del cultivo primario presentaron una forma redonda Barra =10 μ m

VIII. Discusión

Papel de la MLCK y la ROCK en la definición de la forma celular

Previamente en el laboratorio, se observó que las células GH3, responden de manera diferente a la matriz extracelular: cuando se siembran en una mezcla de la C I-III, presentan una forma redonda, mientras que sobre la C IV, presentan una forma más alargada (Azorín *et al.*, 2014). Tomando ventaja de estas observaciones, decidimos utilizar a la línea celular GH3 como un modelo para estudiar la participación de las cinasas MLCK y ROCK en la tensión cortical, organización del citoesqueleto de actina y comportamiento motil. En las células sembradas sobre la C I-III la inhibición de ROCK o su activador, la GTPasa Rho-A, resultó en la adquisición de una forma alargada y un aumento en el área celular, sugiriendo que la cinasa ROCK es responsable del mantenimiento de la forma redonda. Además se observó una mayor activación de Rho, en las células sembradas sobre la C I-III, en comparación con las células sembradas sobre la C IV. De acuerdo con estas observaciones, se ha descrito la dependencia de la forma redonda de la vía

de señalización de Rho-ROCK (Sahai y Marshall, 2003; Gadea *et al.*, 2007; Sandquist *et al.*, 2006; Charras *et al.*, 2006). Es interesante considerar que las células del cultivo primario de adenohipófisis también presentaron predominantemente una forma redonda. Adicionalmente, las células provenientes de adenomas hipofisarios invasores endocrinológicamente silentes, presentan una forma redonda, aún cuando son mantenidos en un medio de cultivo adicionado con 20 % de suero bovino fetal (Ávila-Rodríguez *et al.*, 2016). Estos resultados nos sugiere que en las células de los adenomas invasores la vía de señalización de Rho-ROCK podría estar sobreestimulada, confiriéndoles la capacidad de mantener el fenotipo redondo, alta motilidad dependiente de blebs, y la capacidad de invadir tejidos adyacentes utilizando estas protrusiones de membrana como un mecanismo propulsor.

Por otro lado, el papel de la MLCK en la extensión celular fue claramente observado cuando se inhibió esta cinasa o su activador, la CaM, en células GH3 sembradas sobre la C IV, lo cual resultó en una disminución de la población de células alargadas y la aparición de una población de células redondas. De manera semejante, la inhibición de la MLCK en células T activadas disminuye el área adosada al sustrato (Smith *et al.*, 2003). En células GH3 sembradas sobre C IV, la MLCK se localiza a nivel de sustrato, junto con la ROCK, sugiriendo que la cinasa ROCK también participa en la extensión sobre el sustrato. En fibroblastos se ha descrito que la ROCK fosforila a la MLC en el centro de la célula, mientras que MLCK lo hace en el frente de migración, en los lamelipodios (Kato *et al.*, 2001; Totsukawa *et al.*, 2004). Sin embargo, los fibroblastos son células polarizadas mientras que las células GH3 no presentan una polarización evidente, lo que nos podría explicar las discrepancias en nuestros resultados con los presentados en la literatura.

Participación de la MLCK y la ROCK en la tensión cortical y la dinámica de las protrusiones de membrana

La tensión de córtex depende de la red de actina-miosina, la membrana y proteínas que participan como intermediarios entre ambas estructuras (Blanchoin *et al.*, 2014). La tensión del córtex ha sido implicada en los cambios de la forma y en la formación de las protrusiones de membrana (Sheetz *et al.*, 2001; Diz-Muñoz *et al.*, 2013; Gauthier *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran que las células sobre la C I-III presentan una mayor tensión que las células sembradas sobre la C IV, estos resultados son congruentes con lo observado por Bergert y colaboradores en la línea celular Walker 256, la cual presenta una mayor tensión y menor adhesión cuando exhiben una forma redonda con blebs, que cuando presentan una forma alargada y lamelipodios (Bergert *et al.*, 2012). Se ha descrito una relación entre la tensión y el tamaño de los blebs, pues aumentan su tamaño conforme se incrementa la tensión (Tinevez *et al.*, 2009), si consideramos que la tensión del córtex es una barrera para la generación de protrusiones de membrana, como los lamelipodios, se espera que a menor tensión resulte en células más extendidas sobre el sustrato. Nosotros confirmamos esta expectativa al demostrar que el área adosada al sustrato en las células cultivadas sobre la C IV es mayor que las células cultivadas sobre C I-III. La inhibición de la MLCK disminuye la tensión en las células sembradas sobre C I-III y C IV. En ambas condiciones las células son principalmente redondas y no tiene blebs. De acuerdo con Yoshida y Soldati (2006), la caída de la tensión del córtex se asocia con una caída en la tensión interna de las células, reduciendo la fuerza para la expansión de los blebs. La inhibición de la ROCK disminuyó aún más la tensión del córtex y favoreció la forma extendida con una disminución dramática de la formación de blebs, sugiriendo que la tensión generada por la cinasa ROCK es suficiente para mantener la tensión en el córtex y mantener la forma redonda, pero no suficiente para que se generen los blebs. Esto sugiere que hay una tensión mínima, que requiere la participación de ambas cinasas, para la formación de

los blebs (Tinevez *et al.*, 2009; Bergert *et al.*, 2012). Otro participante en la tensión de la membrana que hay que tomar en cuenta es la gran actividad de la membranas plasmática y que a pesar de ello, la tensión de membrana mantiene el equilibrio, como es el caso de la exocitosis (la cual es estimulada por la alta tensión de membrana) que al llevarse a cabo disminuye la tensión de membrana, mientras la endocitosis (la cual es estimulada por la baja tensión de membrana) la incrementa (Diz-Muñoz *et al.*, 2013). En fibroblastos se ha observado picos en la tensión de la membrana después de fenómenos de exocitosis (Gauthier *et al.*, 2011). Nosotros observamos una relación entre una alta dinámica de la membrana y una mayor tensión cortical, actividades principalmente dependiente de la vía de señalización de Rho-ROCK. Por otro lado, la inhibición de la MLCK y la CaM permiten a la célula mantener cierta dinámica en la membrana, sugiriendo que la tensión generada por las cinasas ROCK y MLCK antagonizan la extensión de la membrana y la estabilización de la misma. La actina-miosina es el factor principal en la generación de la tensión celular. Nosotros analizamos la fosforilación de la MLC, que mide indirectamente la tensión interna, y encontramos que en las células sembradas sobre la C I-III, la inhibición de MLCK la disminuye en el residuo de Ser-19. Este resultado sugiere que la disminución en la fosforilación de este residuo, podría generar una relajación interna que se reflejada en la caída de la tensión cortical. Por otro lado, las células cultivadas sobre la C I-III mostraron una mayor fosforilación de la MLC en el residuo de Tre-18, en condiciones en las que la vía de señalización de Rho está más activa. Esta observación sugiere que la cinasa ROCK está regulando dicha fosforilación, en congruencia con lo reportado previamente en plaquetas activadas (Getz *et al.*, 2010; Sellers *et al.*, 1981), donde se observó que la cinasa ROCK fosforila principalmente el residuo de Tre-18, mientras que la vía calcio-calmodulina-MLCK modula la fosforilación del residuo de Ser-19.

Participación de las cinasas MLCK y ROCK en la motilidad celular

Se sabe que la organización del citoesqueleto, las protrusiones de membrana y la tensión cortical regulan la forma celular ya que las células son plásticas y adaptan su tipo de migración de acuerdo al microambiente (Liu *et al.*, 2015). Nosotros observamos que las células sembradas sobre la C I-III presentan un movimiento rápido y poco persistente, acompañado de baja adhesión al sustrato y presencia de blebs. Estas protrusiones de membrana son características del tipo de migración ameboideo (Paluch y Raz, 2013), sugiriendo que este tipo de colágena favorece una motilidad similar a la ameboidea. En claro contraste, la C IV induce en las células un movimiento lento pero persistente y con lamelipodios, tal como el que se observa en la migración mesenquimatoso. Se ha sugerido que la tensión del córtex limita la extensión de los lamelipodios (Raucher y Sheetz, 2000) y, el hecho de que las células presenten una menor tensión sobre C IV podría explicar el cambio al movimiento de tipo fibroblastoide sobre esta matriz extracelular. El citoesqueleto de actina de las células sembradas sobre la C I-III, a nivel de sustrato, presenta menos placas de adhesión, que en las células sembradas sobre la C IV, sugiriendo menor adhesión y mayor capacidad de motilidad. Este fenómeno podría explicar el aumento en la velocidad en las células redondas. Las cinasas ROCK y MLCK ejercen controles opuestos sobre la motilidad y la adhesión. Tanto en C I-III como en C IV la inhibición de la MLCK disminuye la adhesión y el número de placas de actina a nivel de sustrato, sugiriendo la disminución de complejos focales lo cual es una característica de células altamente motiles (Zamir *et al.*, 1999). Considerando también que la MLCK se localizó principalmente a nivel de sustrato, estos resultados apoyan nuestra interpretación de que MLCK regula la dinámica de la adhesión y la extensión sobre el sustrato. La inhibición de la ROCK indujo un movimiento lento y, aunque las células presentaron una mayor extensión sobre el sustrato, la adhesión no se vio modificada, sugiriendo que en las células GH3 esta cinasa no tiene un papel significativo en el desarrollo de las adhesiones focales.

Participación de las Rho-GTPasas en la migración celular

La inhibición de la GTPasa Rho, o de su efector, ROCK indujo una forma alargada, formación de lamelipodios, disminución en la motilidad, pero un aumento en la direccionalidad, relativo con un comportamiento de tipo fibroblastoide. En esta situación, la inhibición de la GTPasa Rho, impediría la activación de la cinasa ROCK, y lo cual induciría una disminución en la tensión cortical y el aumento de la polimerización de la actina para la formación de los lamelipodios, resultado de la activación de la GTPasa Rac (Kraynov *et al.*, 2000; Gardiner *et al.*, 2002), pues se ha descrito que Rho activo regula a la baja a la GTPasa Rac, mediante la activación de ARHGAP22, en la línea celular A375M2, derivada de un melanoma (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). El hecho que la inhibición de la GTPasa Cdc42 aumenta la velocidad de migración y disminuye la persistencia en la dirección, nos sugiere que la actividad de Rac, junto con la actividad de Cdc42, podría favorecer la formación de un frente de migración que regule dicha direccionalidad (Mogilner y Keren, 2009). Adicionalmente observamos que la inhibición de la GTPasa Rac, resultó en la formación de blebs más grandes y filopodios largos y delgados. Estos resultados concuerdan con la observación de que, en células germinales de pez cebra Cdc42 regula la motilidad dependiente de blebs y filopodios, permitiendo una migración direccionada (Sanz-Moreno y Marshall, 2010; Ridley, 2015). Además, el aumento de tamaño de los blebs sugiere un aumento en la tensión del córtex, lo cual se podría explicar considerando la participación de la GTPasa Cdc42 en la contracción de la actina-miosina mediada por la activación de la cinasa MRCK (acrónimo en inglés para Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase. Leung *et al.*, 1998; Sanz-Moreno y Marshall, 2010; Zhuoshen y Manser, 2015). Las células sembradas sobre la C IV tienen una mayor cantidad de Rac que de Rho activo, se ha descrito que Rac-GTP regula a la baja a Rho, posiblemente mediante la activación de la proteína WAVE1 (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). La activación de Rac aumenta la polimerización de la actina en el frente de migración que está asociada con

un movimiento fibroblastoide (Friedl y Wolf, 2010). Esto podría explicar porque se prefiere una forma intermedia-alargada en células cultivadas sobre C IV. La disminución de la motilidad inducida por la inhibición de la GTPasa Rho, indica que la vía de señalización de Rho controla el inicio de la formación de los lamelipodios y la cinasa ROCK controla la tracción a nivel de sustrato en el tipo de migración mesenquimatoso (Verkhovsky, 2015). Asimismo, en las células sobre C IV, la inhibición de Rac indujo una forma redonda con blebs, lo cual sugiere que en esta condición las células perdieron la capacidad de regular la polimerización de la actina para la formación de lamelipodios (Ridley, 2015). La motilidad se vio modificada, ya que las células presentaron un movimiento parecido al ameboideo. Una respuesta similar fue observada después de la inhibición de la GTPasa Cdc42, sugiriendo la colaboración de ambas GTPasas en la forma y la motilidad de tipo fibroblastoide observada en las células sembradas sobre CIV.

Secreción de hormonas y tensión del córtex

Se ha propuesto que el balance entre la exocitosis y la endocitosis es dependiente de la tensión del córtex (Dai y Sheetz, 1999). Nosotros observamos que las células redondas, sembradas sobre C I-III, secretan más PRL y tienen una mayor tensión del córtex que las células sobre la C IV. Estos resultados son congruentes con el hecho que la exocitosis se estimula con el incremento en la tensión (Sheetz y Dai, 1996). Nuestros resultados también concuerdan con la observación de que el citoesqueleto de actina constituye una barrera contra la secreción (Malacombe *et al.*, 2006), pues las células sobre la C I-III, presentan más blebs, protrusiones de membrana que se forman cuando hay una disrupción del córtex de actina, y un aumento en la secreción de PRL, que puede resultar de la reducción de la barrera física impuesta por el citoesqueleto cortical.

Señalización de las colágenas a través de las Integrinas

Previamente Castañeda-Obeso en su tesis de maestría (2013) observó que cuando las células GH3 son sembradas sobre C I-III la integrina $\alpha1\beta1$ se observa en la base de las células mientras que el dímero $\alpha2\beta1$ se observa acumulado en el citoplasma, sugiriendo que la señalización de la C I-III para que la célula presente una forma redonda está mediada por la integrina $\alpha1\beta1$ mientras que, cuando las células son sembradas sobre CIV los dímeros $\alpha1\beta1$ y $\alpha2\beta1$ se observan en la base, sugiriendo que la señalización de la C IV para favorecer la forma intermedia-alargada está mediada por las integrinas $\alpha1\beta1$ y $\alpha2\beta1$. La vía de señalización exacta por la cual se lleva a cabo esta respuesta no se conoce en las células GH3. Se ha propuesto a la vía de señalización de Fak y Src estimulan la actividad de las GEFs y GAPs, las cuales activan o inactivan a las Rho GTPasas, regulando la generación de tensión y el arreglo del citoesqueleto de actina (Arias-Salgado *et al.*, 2003). Sin embargo, experimentos posteriores deben realizarse para evaluar dichas vías de señalización.

En resumen, las células GH3 presentan una transición entre la forma redonda con un tipo de motilidad parecida a la ameboidea, favorecida por la C I-III, a una forma alargada con un tipo de motilidad parecida a la mesenquimatosa favorecida por CIV, evidenciando la capacidad de las células GH3 de modificar su forma y motilidad en respuesta a la MEC. Esta transición depende de la contracción de la actina-miosina mediada por MLCK, ROCK y las proteínas Rho-GTPasas (Figura 33). En células redondas, ROCK genera la tensión cortical que le permite a la célula mantener la forma y MLCK contribuye con la tensión cortical para la generación de los blebs. En células alargadas, MLCK genera la tensión a nivel de sustrato para mantener la forma alargada. En células GH3 la MLCK se relaciona con un movimiento lento y persistente, mientras que ROCK se relaciona con un desplazamiento rápido. En conjunto estos resultados permiten entender la plasticidad en los modos de motilidad que las células de

los adenomas hipofisarios podrían presentar en repuesta a la MEC. Es común observar un incremento en la deposición de fibras de colágena tipo I en los adenomas hipofisarios, además células de macroadenomas invasores presentan una forma redonda, sugiriendo que la vía de señalización de Rho-ROCK se ve favorecida, sin embargo estudios posteriores deben realizarse para confirmar dicha aseveración.

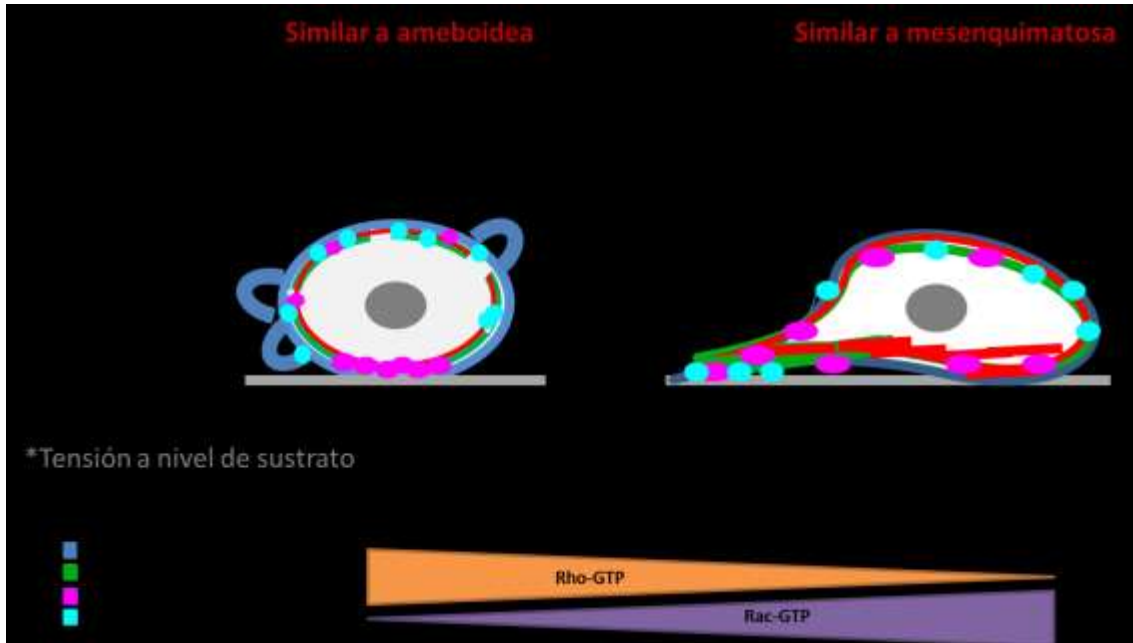


Figura 33. Modelo esquemático de la participación de MLCK y ROCK en células GH3 sembradas sobre C I-III y CIV. Sobre

IX. Conclusiones

1. Las células GH3 tienen la capacidad de modificar su forma en respuesta a la MEC.
2. Las células responden a las colágenas regulando la activación de las Rho-GTPasas: la C I-III induce mayor activación de Rho, y C IV de Rac.
3. En las células redondas ROCK genera la tensión cortical que le permite a la célula mantener la forma, MLCK contribuye a la tensión cortical para la generación de los blebs.
4. En las células alargadas MLCK genera la tensión a nivel de sustrato para mantener la forma alargada.

5. En células GH3 la MLCK se relaciona con un movimiento lento y persistente, mientras que ROCK se relaciona con un desplazamiento rápido.
6. MLCK mantiene las adhesiones sobre el sustrato.

X. Perspectivas

1. Analizar las vías de activación de las Rho-GTPasas como respuesta a las colágenas, activación a través de las GEFs: p114RhoGEF, DOCK3, DOCK 10.
2. Analizar la tensión de las células a nivel de sustrato modificando la actividad MLCK y ROCK.
3. Estudiar la participación de MLCK y ROCK en las células GH3 en tres dimensiones.
4. Determinar la participación de MLCK y ROCK en células de adenomas hipofisarios humanos.

XI. Referencias

1. Alessi D, MacDougall L K, Sola MM, Ikebe M, Cohen P. The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur. J. Biochem.* (1992) 210:1023–1035.
2. Alexandrova AY, Arnold K, Schaub S, Vasiliev JM, Meister JJ, Bershadsky AD, Verkhovsky AB. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One* (2008) 18;3(9):e3234
3. Amano M, Chihara K, Nakamura N, Kaneko T, Matsuura Y, Kaibuchi K. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity. *J Biol Chem.* (1999) 274:32418–24.
4. Arias-Salgado EG, Lizano S, Sarkar S, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ. Src kinase activation by direct interaction with the integrin β cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*(2003) 100: 13298–13302.
5. Arthur WT, Burridge K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol Biol Cell.* (2001) 12(9):2711-20.
6. Avila-Rodríguez D, Paisano-Cerón K, Valdovinos-Ramírez I, Solano-Agama C, Ortiz-Plata A, Mendoza-Garrido ME. Three-dimensional Alginate-bead Culture of Human Pituitary Adenoma Cells. *J Vis Exp.* (2016) 18 (108):53637. <http://dx.doi: 10.3791/53637>.
7. Azorín E, Romero-Pérez B, Solano-Agama C, de la Vega MT, Toriz CG, Reyes-Márquez B, González-Pozos S, Rosales-García VH, Del Pliego MG, Sabanero M, Mendoza-Garrido ME. GH3 tumor pituitary cell cytoskeleton and plasma membrane arrangement are determined by extracellular matrix proteins: implications on motility, proliferation and hormone secretion. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* (2014) 6(2):66-83.
8. Bergert M, Chandradoss S, Desai R, Paluch E. Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2012) 109 (36):14434-9. <http://dx.doi.10.1073/pnas.1207968109>.
9. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev.* (2014) 94(1):235-263. <http://dx.doi: 10.1152/physrev.00018.2013>.
10. Bockholt SM, Burridge K. Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin. *J. Biol. Chem.* (1993) 268: 14565–14567.
11. Bonnekoh B, Wevers A, Jugert F, Merk H, Mahrle G. Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. *Arch Dermatol Res.* (1989) 281(7):487-90.
12. Bovellan M, Romeo Y, Biro M, Boden A, Chugh P, Yonis A, Vaghela M, Fritzsche M, Moulding D, Thorogate R, Jégou A, Thrasher AJ, Romet-Lemonne

- G, Roux PP, Paluch EK, Charras G. Cellular control of cortical actin nucleation *Curr. Biol.* (2014) 24: 1628–35.
13. Bravo-Cordero JJ, Hodgson L, Condeelis J. Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* (2012) 24:277-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2011.12.004>.
 14. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2002) 3: 586–599.
 15. Campbell ID, Ginsberg MH. The talin–tail interaction places integrin activation on FERM ground. *Trends Biochem. Sci* (2004) 29:429–435.
 16. Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* (1997) 136: 1307–1322.
 17. Ceylan S, Anik I, Koc K, Kokturk S, Ceylan S, Cine N, Savli H, Sirin G, Sam B, and Gazioglu N. Microsurgical anatomy of membranous layers of the pituitary gland and the expresión of extracellular matrix collagenous proteins. *Acta Neurochirurgica.* (2011) 153(12):2435-2443.
 18. Charras G, Paluch E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2008) 9:730–736.
 19. Charras GT, Coughlin M, Mitchison TJ, Mahadevan L. Life and times of a cellular bleb. *Biophys J.* (2008) 94(5):1836-53.
 20. Charras GT, Hu CK, Coughlin M, Mitchison TJ. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J. Cell Biol.* (2006) 175:477–490.
 21. Charras GT, Yarrow JC, Horton MA, Mahadevan L, Mitchison TJ. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature.* (2005) 435:365–369.
 22. Chen C, Tao T, Wen C, He WQ, Qiao YN, Gao YQ, Chen X, Wang P, Chen CP, Zhao W, Chen HQ, Ye AP, Peng YJ, Zhu MS. Myosin light chain kinase (MLCK) regulates cell migration in a myosin regulatory light chain phosphorylation-independent mechanism. *J Biol Chem.* (2014) 10; 289(41):28478-88. <http://dx.doi: 10.1074/jbc.M114.567446>.
 23. Chin D, Means AR. Calmodulin: A prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* (2000) 10: 322–328.
 24. Cunningham, CC. Actin polymerization and intracellular solvent flow in cell surface blebbing. *J. Cell Biol.* (1995) 129:1589–1599.
 25. Dai J, Sheetz MP. Membrane tether formation from blebbing cells. *Biophys J* (1999) 77:3363–3370.
 26. Del Pliego MG, Aguirre-Benítez E, Paisano-Cerón K, Valdovinos-Ramírez I, Rangel-Morales C, Rodríguez-Mata V, Solano-Agama C, Martín-Tapia D, de la Vega MT, Saldoval-Balanzario M, Camacho J, Mendoza-Garrido ME. Expression of Eag1 K⁺ channel and ErbBs in human pituitary adenomas: cytoskeleton arrangement patterns in cultured cells. *Int J Clin Exp Pathol.* (2013) 6(3):458-68

27. Discher D, Dong C, Fredberg JJ, Guilak F, Ingber D, Janmey P, Kamm RD, SchmidSchönbein GW, Weinbaum S. Biomechanics: cell research and applications for the next decade. *Ann. Biomed. Eng.* (2009) 37, 847–859.
28. Diz-Muñoz A, Fletcher DA, Weiner OD. Use the force: Membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends Cell Biol.* (2013) 23(2):47–53. <http://dx.doi.10.1016/j.tcb.2012.09.006>.
29. Dominguez R. Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* (2009) 44(6):351-66. <http://dx.doi: 10.3109/10409230903277340>.
30. Dráber P, Sulimenko V, Dráberová E. Cytoskeleton in Mast Cell Signaling. *Front Immunol.* (2012) 3: 130.
31. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* (2002) 420; 629–635.
32. Frantz C, Stewart KM, and Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* (2010) 123(24):4195-4200
33. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* (2010) 188 (1): 11-19. <http://dx.doi.10.1083/jcb.200909003>.
34. Fujiwara K, Jindatip D, Kikuchi M, Yashiro T. In situ hybridization reveals that type I and III collagens are produced by pericytes in the anterior pituitary gland of rats. *Cell Tissue Res.* (2010) 342; 491–495.
35. Gadea G, de Toledo M, Anguille C, Roux P. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J. Cell Biol.* (2007) 178:23–30.
36. Gadea G, Sanz-Moreno V, Self A, Godi A, Marshall CJ. DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr Biol.* (2008) 18(19):1456-65. <http://dx.doi: 10.1016/j.cub.2008.08.053>.
37. Gallagher PJ, Herring PB, Stull JT. Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil.* (1997) 18:1–16.
38. Gallagher PJ, Herring, PB. The carboxyl terminus of the smooth muscle myosin light chain kinase is expressed as an independent protein, telokin. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 23945–23952
39. Gardiner EM, Pestonjamas KN, Bohl BP, Chamberlain C, Hahn KM, Bokoch GM. Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. *Curr. Biol.* (2002) 12:2029–2034.
40. Gauthier NC, Fardin MA, Roca-Cusachs P, Sheetz MP. Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2011) 108: 14467–72.
41. Gauthier NC, Masters TA, Sheetz MP. Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends Cell Biol.* (2012) 22(10):527-35. <http://dx.doi. 10.1016/j.tcb.2012.07.005>.
42. Getz TM, Dangelmaier CA, Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Differential phosphorylation of myosin light chain (Thr)18 and (Ser)19 and functional

- implications in platelets. *J Thromb Haemost.* (2010) 8(10):2283-93. <http://dx.doi.10.1111/j.1538-7836.2010.04000.x>.
43. Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* (2004) 304: 743–746.
 44. Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Rossier O, Cai Y, Chaga O, Jiang G, Beaver W, Döbereiner HG, Freund Y, Borisy G, Sheetz MP. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* (2007) 128, 561-75.
 45. Hakkinen KM, Harunaga JS, Doyle AD, Yamada KM. Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. *Tissue Eng Part A.* (2011) 17(5-6): 713-24.
 46. Hall A. G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science.* (1998) 280(5372):2074-5.
 47. Hardy J, Vezina JL. Transsphenoidal neurosurgery of intracranial neoplasms. *Adv Neurol.* (1976) 15: 261-274.
 48. Harn HI, Hsu CK, Wang YK, Huang YW, Chiu WT, Lin HH, Cheng CM, Tang MJ. Spatial distribution of filament elasticity determines the migratory behaviors of a cell. *Cell Adh Migr.* (2016) 10(4):368-77. <http://dx.doi:10.1080/19336918.2016.1156825>.
 49. Hemler ME, Lobb RR. The leukocyte beta 1 integrins. *Current Opinion in Hematology* (1995) 2 61–67. <http://dx.doi:10.1097/00062752-199502010-00009>.
 50. Henkel W, Glanville RW. Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen. *Eur. J. Biochem.* (1982) 122: 205-213.
 51. Hidaka H, Yamaki T, Totsuka T, Asano M. Selective inhibitors of Ca²⁺-binding modulator of phosphodiesterase produce vascular relaxation and inhibit actin-myosin interaction. *Molec. Pharmac.* (1979) 15, 49-59.
 52. Higgs HN, Pollard TD. Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem.* (2001) 70: 649–676.
 53. Holck, S., Albrechtsen, R. and Wewer, U. M. Laminin in the anterior pituitary gland of the rat. Laminin in the gonadotrophic cells correlates with their functional state. *Lab. Invest.* (1987) 56: 481–488.
 54. Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol.* (2006) 173: 383–394. <http://dx.doi.10.1016/j.tem.2012.02.004>.
 55. Hubmacher D, Apte SS. The biology of the extracellular matrix: novel insights. *Curr Opin Rheumatol.* (2013) 25(1):65-70. <http://dx.doi:10.1097/BOR.0b013e32835b137b>.
 56. Hulmes, D. J. S. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J. Struct. Biol.* (2002) 137, 2–10.

57. Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J. Biol. Chem.* (1986) 261, 36–39.
58. Ikebe M, Hartshorne DJ, Elzinga M. Phosphorylation of the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* (1987) 262:9569–9573.
59. Ikebe M, Hartshorne DJ. Phosphorylation of smooth muscle myosin at two distinct sites by myosin light chain kinase. *J Biol Chem.* (1985) 25;260(18):10027-31.
60. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, Watanabe N, Saito Y, Kakizuka A, Morii N, Narumiya S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* (1996) 15(8):1885-93.
61. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat. Med.* (1999) 5:221–225.
62. Jarzembowski J, Lloyd R, McKeever P. Type IV collagen immunostaining is a simple, reliable diagnostic tool for distinguishing between adenomatous and normal pituitary glands. *Arch Pathol Lab Med.* (2007) 131(6):931-5.
63. Kaidzu S, Noda T, Tane N, y Yashiro T. Collagen synthesis by rat anterior pituitary cells in vivo and in vitro. *Acta Histochem. Cytochem.* (2000) 33; 81–87.
64. Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*(2006) 7: 404-414.
65. Kamm, KE, Stull JT. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J. Biol. Chem.* (2001) 276:4527–4530.
66. Katoh K, Kano Y, Amano M, Kaibuchi K, Fujiwara K. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblast. *Am. J. Cell Physiol.* (2001) 280: 1669–1679
67. Kawamoto H, Uozumi T, Kawamoto K, Arita K, Yano T, Hirohata T. Type IV collagenase activity and cavernous sinus invasion in human pituitary adenomas. *Acta Neurochir (Wien)* (1996) 138(4):390-5.
68. Keene DR, Sakai LY, Bächinger HP, Burgeson RE. Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J Cell Biol.* (1987) 105(5):2393-402.
69. Keren K, Pincus Z, Allen GM, Barnhart EL, Marriott G, Mogilner A, Theriot JA. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature.* (2008) 453, 475–480.
70. Keren K. Cell motility: the integrating role of the plasma membrane. *Eur Biophys J.* (2011) 40(9):1013-1027. <http://dx.doi.10.1007/s00249-011-0741-0>.
71. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng JH, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase) *Science.* (1996) 273:245–248.

72. Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* (1998) 12: 3331–3336.
73. Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* (1999) 18: 2459–2471.
74. Kraynov VS, Chamberlain C, Bokoch GM, Schwartz MA, Slabaugh S, y Hahn KM. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science.* (2000) 290:333–337.
75. Kwiatkowski DJ. Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* (1999) 11: 103–108.
76. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell.* (1996) 9; 84(3):359-69.
77. Lazar V, Garcia JG. A single human myosin light chain kinase gene (MLCK; MYLK) Genomics. (1999) 57(2):256-67.
78. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* (1996) (10):5313-27.
79. Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol. Cell. Biol.* (1998) 18:130–140.
80. Li Q, Sarna SK. Nuclear myosin II regulates the assembly of preinitiation complex for ICAM-1 gene transcription. *Gastroenterology.* (2009) 137(3):1051-60. <http://dx.doi.10.1053/j.gastro.2009.03.040>.
81. Li X, Yang Y, Hu Y, Dang D, Regezi J, Schmidt BL, Atakilit A, Chen B, Ellis D, Ramos DM. Alphavbeta6-Fyn signaling promotes oral cancer progression. *J Biol Chem.* (2003) 278(43):41646-41653.
82. Liu YJ, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuzé M, Takaki T, Voituriez R, Piel M. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell.* (2015) 160(4):659-72. <http://dx.doi: 10.1016/j.cell.2015.01.007>.
83. Liu, Y C, Tanaka S, Inoue K, Kurosumi K. Localization of fibronectin in the folliculo-stellate cells of the rat anterior pituitary by the double bridge peroxidase-antiperoxidase method. *Histochemistry.* (1989)92; 43–45.
84. Lou SS, Diz-Muñoz A, Weiner OD, Fletcher DA, Theriot JA. Myosin light chain kinase regulates cell polarization independently of membrane tension or Rho kinase. *J Cell Biol.* (2015) 209(2):275-88. <http://dx.doi. 10.1083/jcb.201409001>.
85. Luster AD, Alon R, Von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* (2005) 6: 1182–1190.
86. Malacombe M, Ceridono M, Calco V, Chasserot-Golaz S, McPherson PS, Bader MF, Gasman S. Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *EMBO J.* (2006) 25:3494–3503.
87. Malenka RC, Nestler EJ, Hyman SE Chapter 10: Neural and Neuroendocrine Control of the Internal Milieu. In Sydor A, Brown RY. *Molecular*

- Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience (2nd ed.) New York: McGraw-Hill Medical.(2009) pp. 246, 248–259. ISBN 9780071481274.
88. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* (1996) 15(9):2208-16.
 89. Melmed S. Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *J Clin Invest.* (2003) 112(11):1603-1618.
 90. Miao H, Burnett E, Kinch M, Simon E, Wang B. Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol.*(2000) 2(2):62-69.
 91. Mogilner A, Keren K. The shape of motile cells. *Curr. Biol.* (2009) 19: 762–771. <http://dx.doi.10.1016/j.cub.2009.06.053>.
 92. Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai R S, Ike H, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography *J. Cell Biol.* (2006) 174 851–62.
 93. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15(12):771-85.
 94. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov.* (2005) 4:387–98.
 95. Murray K, de Lera JM, Astudillo A, McNicol AM. Organisation of basement membrane components in the human adult and fetal pituitary gland and in pituitary adenomas. *Virchows Arch.* (1997) 431(5):329-35.
 96. Naganuma H, Satoh E, Nukui H. Technical considerations of transsphenoidal removal of fibrous pituitary adenomas and evaluation of collagen content and subtype in the adenomas. *Neurol Med Chir.* (2002) 42(5):202-12.
 97. Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* (1999) 144(6):1235-44.
 98. Olsen B, and Ninomiya Y. Collagens. Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins. Edited by Kreis T. and Vale R. 2nd Ed. Oxford University Press. (1999):380-396.
 99. Otey CA, Carpen O. α -actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* (2004) 58:104–111.
 100. Paez-Pereda M, Kuchenbauer F, Arzt E, Stalla GK. Regulation of pituitary hormones and cell proliferation by components of the extracellular matrix. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (2005) 38; 1487–1494.
 101. Paluch E, Piel M, Prost J, Bornens M, Sykes C. Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophys J.* (2005) 89(1):724-33.
 102. Paluch EK, Raz E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* (2013) 25(5):582-590. <http://dx.doi.10.1016/j.ceb.2013.05.005>.
 103. Paňková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci.* (2010) 67(1): 63–71.

104. Pantaloni D, Carlier MF. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell*. (1993) 75: 1007–1014.
105. Parri M, Taddei ML, Bianchini F, Calorini L, Chiarugi P. EphA2 reexpression prompts invasion of melanoma cells shifting from mesenchymal to amoeboid-like motility style. *Cancer Res.*(2009) 1;69(5):2072-81. [http://doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1845](http://doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1845).
106. Parsons J, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2010) 11(9): 633–643.
107. Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2009) 10(8):538-49. doi: 10.1038/nrm2729.
108. Pollard T, Cooper J. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* (2009) 326: 1208-1212.
109. Pollard TD, Borisy GG Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* (2003) 112: 453–465.
110. Pollitt AY, Insall RH. WASP and SCAR/WAVE proteins: The drivers of actin assembly. *J Cell Sci*. (2009) 122: 2575–2578.
111. Ponti A, Machacek M, Gupton SL, Waterman-Storer CM, Danuser G. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*. (2004) 305(5691):1782-6.
112. Raucher D, Sheetz MP. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*. (2000) 148:127–136.
113. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. (2003) 302(5651):1704-1709.
114. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell*. (2011) 145:1012–1022.
115. Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol*. (2001) 11(12):471-7.
116. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. (2015) 36:103-112. <http://dx.doi.10.1016/j.ceb.2015.08.005>.
117. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2003) 4(6):446-56.
118. Rodgers BD. Insulin-like growth factor-I downregulates embryonic myosin heavy chain (eMyHC) in myoblast nuclei. *Growth Horm IGF Res*. (2005) 15:377–83
119. Rouven Brückner B, Pietuch A, Nehls S, Rother J, Janshoff A. Ezrin is a Major Regulator of Membrane Tension in Epithelial Cells. *Sci Rep*. (2015) 5:14700. [http://dx.doi: 10.1038/srep14700](http://dx.doi:10.1038/srep14700).
120. Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*. (2003) 5(8):711-719.
121. Sandquist JC, Swenson KI, Demali KA, Burridge K, Means AR. Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *J Biol Chem*. (2006) 281(47):35873-83.

122. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell*. (2008) 135(3):510-23. <http://dx.doi: 10.1016/j.cell.2008.09.043>.
123. Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. (2010) 22(5):690-696.<http://dx.doi. 10.1016/j.ceb.2010.08.020>.
124. Sarkar S, Egelhoff T, Baskaran H. Insights into the roles of non-muscle myosin iia in human keratinocyte migration. *Cell Mol Bioeng*. (2009) 2(4):486-494.
125. Schwartz M. Rho signalling at a glance. *J Cell Sci*. (2004) 117(Pt 23):5457-8.
126. Sellers JR, Pato MD, Adelstein RS. Reversible phosphorylation of smooth muscle myosin, heavy meromyosin, and platelet myosin. *J. Biol. Chem*. (1981) 256, 13137-13142.
127. Sens P, Plastino J. Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility. *J Phys Condens Matter*. (2015) 27(27):273103. <http://dx.doi: 10.1088/0953-8984/27/27/273103>.
128. Sheetz MP, Dai J. Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends Cell Biol*. (1996) 6(3):85-9.
129. Sheetz MP, Sable JE, Dobereiner HG. Continuous membrane–cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. (2006) 35:417–434.
130. Sheetz MP. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (2001) 2(5):392-396.
131. Small, JV, Rottner K, Kaverina I, Anderson KI. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim. Biophys. Acta*. (1998) 1404: 271-281.
132. Smith A, Bracke M, Leitinger B, Porter JC, Hogg N. LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci*. (2003) 116(15):3123-3133.
133. Soji, T. and Herbert, D. C. Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat. Rec*. (1989) 224; 523–533.
134. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. (2003) 83(4):1325-58.
135. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res*. (1985) 26(9): 1015-35.
136. Tashjian A, Yasumura Y, Levine L, Sato G, and Parker M. Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology*. (1968) 82: 342-382.
137. Tinevez JY, Schulze U, Salbreux G, Roensch J, Joanny JF, Paluch E. Role of cortical tension in bleb growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2009) 106(44):18581-6. <http://dx.doi.10.1073/pnas.0903353106>.

138. Tohtong R, Phattarasakul K, Jiraviriyakul A, Sutthiphongchai T. Dependence of metastatic cancer cell invasion on MLCK-catalyzed phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* (2003) (3):212-6.
139. Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol.* (2004) 164(3):427-39.
140. Tsukamoto O, Kitakaze M. Biochemical and physiological regulation of cardiac myocyte contraction by cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ J.* (2013) (9):2218-25.
141. Turner CE. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* (2000), 2: E231–E236.
142. Verkhovsky AB. The mechanisms of spatial and temporal patterning of cell-edge dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* (2015) 36:113-121. <http://dx.doi.10.1016/j.ceb.2015.09.001>.
143. Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR. Integrins in cell migration--the actin connection. *J Cell Sci.* (2009) 122: 199-206. [http://dx. doi: 10.1242/jcs.018564](http://dx.doi:10.1242/jcs.018564).
144. Vicente-Manzanares M, Webb DJ, Horwitz AR. Cell migration at a glance. *J Cell Sci.* (2005) 118 (21) 4917-4919.
145. Vila-Porcile E. The network of the folliculo-stellate cells and the follicles of the adenohypophysis in the rat (pars distalis) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* (1972) 129, 328–369.
146. Villalobos C, Núñez L, García-Sancho J. Phenotypic characterization of multi-functional somatotropes, mammatropes and gonadotropes of the mouse anterior pituitary. *Pflugers Arch.* (2004) 449(3):257-64.
147. Wallar BJ, Alberts AS. The formins. Active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* (2003) 13: 435–446.
148. Wang B, Yan Y, Zhou J, Zhou Q, Gui S, Wang Y. A novel all-trans retinoid acid derivatives inhibits the migration of breast cancer cell lines MDA-MB-231 via myosin light chain kinase involving p38-MAPK pathway. *Biomed Pharmacother.* (2013) (5):357-62.
149. Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* (1999) 1: 136–143.
150. Watanabe S, Okawa K, Miki T, Sakamoto S, Morinaga T, Segawa K, Arakawa T, Kinoshita M, Ishizaki T, Narumiya S. Rho and anillin-dependent control of mDia2 localization and function in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell.* (2010) 21: 3193–3204.
151. Weaver AM, Young ME, Lee WL, Cooper JA. Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol.* (2003) (1):23-30.
152. Winkelmann DA, Almeda S, Vibert P, Cohen C. A new myosin fragment: visualization of the regulatory domain. *Nature.* (1984) 307(5953):758-60.

153. Witke W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* (2004) 14: 461–469.
154. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* (2003) 160(2):267-77.
155. Worthylake RA, Burridge K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol.* (2001) 13(5):569-77.
156. Ye N, Verma D, Meng F, Davidson MW, Suffoletto K, Hua SZ. Direct observation of alpha-actinin tension and recruitment at focal adhesions during contact growth, *Exp. Cell Res.* (2014) 327: 57–67.
157. Yoshida D, Teramoto A. Enhancement of pituitary adenoma cell invasion and adhesion is mediated by discoidin domain receptor-1. *J Neurooncol.* (2007) (1):29-40.
158. Yoshida K, Soldati T. Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci.* (2006) 119(18):3833-44.
159. Young KG, Copeland JW. Formins in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* (2010) 1803, 183–190.
160. Yurchenco P, Schittny J. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* (1990) 4:1577-1590.
161. Zamir E, Katz BZ, Aota S, Yamada KM, Geiger B, Kam Z. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* (1999) 112 (11):1655-69.
162. Zhong J, Baquiran JB, Bonakdar N, Lees J, Ching YW, Pugacheva E, Fabry B, O'Neill GM .NEDD9 stabilizes focal adhesions, increases binding to the extracellular matrix and differentially effects 2D versus 3D cell migration. *PLoS ONE.* (2012) 7 (4): e35058. [http://dx. doi:10.1371/journal.pone.0035058](http://dx.doi:10.1371/journal.pone.0035058).
163. Zhuoshen Z, Manser ED. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCK), the ROCK-like effectors of Cdc42 and Rac1. *Small GTPases.* (2015) 6(2): 81–88. <http://dx.doi.10.1080/21541248.2014.1000699>.
164. Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* (2006) 16:453–460.
165. Zimerman B, Volberg T, Geiger B. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* (2004) 58:143–159.