

Expresión de los receptores de complemento CR3 y manosa MRC1 en neutrófilos humanos infectados con actinomicetos

Expression of complement CR3 and mannose MRC1 receptors in human neutrophils infected with actinomycetes.

Alejandro Palma-Ramos,¹ Marco Antonio Argueta-Fuertes,¹ Laura Estela Castrillón-Rivera,¹ Araceli Paredes-Rojas,¹ Alfonso Santiago-Téllez,¹ Ana Rosa Muñoz-Duarte,¹ Julieta Luna-Herrera,² Jorge Ismael Castañeda-Sánchez¹

Resumen

ANTECEDENTES: El micetoma es una enfermedad infecciosa, granulomatosa, crónica, que afecta la piel, el tejido celular subcutáneo y el hueso; es causada por bacterias filamentosas (actinomycetoma) y hongos (eumicetoma). En México el agente causal más frecuente de actinomycetoma es *Nocardia brasiliensis*, seguido por *Actinomyces madurae*.

OBJETIVO: Evaluar la expresión de los receptores manosa (MRC1) y de complemento (CR3) en neutrófilos humanos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae*.

MATERIAL Y MÉTODO: Estudio experimental efectuado de junio a diciembre de 2017 en el que se infectaron neutrófilos humanos obtenidos de sangre periférica con *N. brasiliensis* y *A. madurae*, se siguieron cinéticas posinfección de 1, 2, 3, 4 y 5 horas. Se obtuvo ARN total para su posterior retro-transcripción, la cuantificación de los genes de los receptores se realizó por qPCR y la expresión a nivel proteico se corroboró por microscopia confocal.

RESULTADOS: En neutrófilos humanos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae* se detectó alta expresión del receptor de MRC1 que se vio incrementado desde las primeras horas de infección con ambas cepas, respecto al receptor CR3 encontramos que los neutrófilos lo expresan de manera discreta en tiempos tempranos de la infección.

CONCLUSIÓN: Los neutrófilos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae* sobreexpresan el receptor de manosa MRC1; sin embargo, los niveles de expresión del receptor de complemento CR3 son bajos.

PALABRAS CLAVE: Micetoma; actinomycetoma; actinomicetos; *Nocardia brasiliensis*; receptor CR3; receptor de manosa.

Abstract

BACKGROUND: Mycetoma is an infectious, granulomatous, chronic disease that affects the skin, subcutaneous cellular tissue and bone. It is caused by filamentous bacteria (actinomycetoma) and fungi (eumycetoma). In Mexico, the most frequent causative agent of actinomycetoma is *Nocardia brasiliensis*, followed by *Actinomyces madurae*.

OBJECTIVE: To evaluate the expression of mannose (MRC1) and complement (CR3) receptors in human neutrophils infected with *N. brasiliensis* and *A. madurae*.

MATERIAL AND METHOD: An experimental study performed from June to December 2017 was done in which human neutrophils from peripheral blood were infected with *N. brasiliensis* and *A. madurae*, the kinetics were followed post infection of 1, 2, 3, 4 and 5 hours. The total RNA was obtained for its subsequent retro-transcription, the quantification of the genes of the receptors was carried out by qPCR and the expression at the protein level was corroborated by confocal microscopy.

¹ Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

² Laboratorio de Inmunología, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México.

Recibido: enero 2018

Aceptado: abril 2018

Correspondencia

Jorge Ismael Castañeda Sánchez
jcastanedas@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como

Palma-Ramos A, Argueta-Fuertes MA, Castrillón-Rivera LE, Paredes-Rojas A y col. Expresión de los receptores de complemento CR3 y manosa MRC1 en neutrófilos humanos infectados con actinomicetos. Dermatol Rev Mex. 2018 julio-agosto;62(4):293-300.

RESULTS: In human neutrophils infected with *N. brasiliensis* and *A. madurae*, a high expression of the MRC1 receptor was detected which was increased from the first hours of infection with both strains, with respect to the CR3 receptor, we found that the neutrophils expressed a discreet way in early times of infection.

CONCLUSION: Neutrophils infected with *N. brasiliensis* and *A. madurae* on express the mannose receptor MRC1; however, the levels of expression of complement receptor CR3 are low.

KEYWORDS: Mycetoma; Actinomycetoma; Actinomycetes; *Nocardia brasiliensis*; CR3 receptor, Mannose receptor.

ANTECEDENTES

Las infecciones de la piel son causadas por diversos patógenos, como virus, hongos y bacterias. Entre las enfermedades de la piel está el micetoma que puede ser de origen fúngico (eumicetoma) o de origen bacteriano (actinomycetoma).^{1,2} En el mundo 60% de los casos de micetoma reportados corresponde a actinomycetoma y el 40% restante a eumicetomas;³ la situación epidemiológica en América Latina es diferente, en México, por ejemplo, más de 98% de los casos reportados se clasifican como actinomycetoma y menos de 2%, como *Nocardia brasiliensis*, con más de 85% de los casos que se reportan anualmente y en menor número *Actinomadura madurae* con menos de 10% de casos anuales diagnosticados.^{3,4}

Ambos microorganismos son saprófitos del suelo y la vía de entrada al humano es a través de traumatismos con instrumentos de labranza, piedras, leña y espinas. Después de la penetración se desarrolla una lesión típica que se caracteriza por contener al interior microcolonias del agente causal rodeado de abundante infiltrado de neutrófilos y escasos monocitos/macrófagos.^{5,6}

Las células más estudiadas en estos procesos infecciosos, sin duda, han sido los macrófagos

y los linfocitos TCD4+ residentes en la piel; sin embargo, recientemente se intentó esclarecer la participación de algunas otras estirpes que participan en el contacto directo con el patógeno, tal es el caso de los queratinocitos y los neutrófilos.⁷⁻⁹

Los neutrófilos son células capaces de producir bajo circunstancias de infección, intermediarios de la respuesta inmunitaria innata, como citocinas proinflamatorias, péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, entre otras moléculas;⁹ además, están provistos de un repertorio amplio de receptores que les sirven para reconocer bacterias, virus y hongos, entre los que destacan los receptores tipo Toll (TLR), los receptores tipo NOD (NLR), los receptores tipo scavenger, el receptor de manosa y el receptor de complemento CR3.⁹ Respecto a estos dos últimos, el receptor de manosa reconoce estructuras presentes en las glucoproteínas y glucolípidos de las bacterias, el receptor de complemento CR3 participa en la activación del sistema de complemento, mecanismo que utilizan las células fagocíticas para el control de los patógenos.^{10,11}

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los receptores manosa MRC1 y de complemento CR3 en neutrófilos humanos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae*.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de neutrófilos de sangre periférica

Estudio experimental efectuado de junio a diciembre de 2017 en el que se utilizaron 20 mL de sangre venosa de sujetos clínicamente sanos, adicionada con citrato de sodio. En un tubo cónico se colocaron 5 mL de Polymorphprep™ (AXIS-SHIELD PoC AS) y se le adicionaron 5 mL de la sangre total, se centrifugó a 1500 rpm durante una hora a 18-22°C. Las células se lavaron con 3 mL de solución de Alsever y se resuspendieron en 3.5 mL de medio RPMI 1640/glutamina suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco/Thermo Fisher Scientific) y anticoagulante. Para corroborar la viabilidad de las células, se contaron en cámara de Neubauer con azul tripano a 0.4%.

Bacterias

Para este estudio se utilizaron dos cepas de actinomicetos de referencia: *N. brasiliensis* CECT 3052 y *A. madurae* CECT 3043. Ambas se sembraron en agar Sabouraud (Becton-Dickinson) e incubaron a 37°C por 24 h. De ambas cepas se realizaron suspensiones bacterianas y se ajustaron al tubo núm. 1 del nefelómetro de McFarland (300 x 10⁶ UFC/mL).

Infección celular

Se utilizaron 400,000 neutrófilos para cada tiempo de infección. Las células se lavaron dos veces con PBS 1X para eliminar el suero del medio de cultivo y se infectaron con una suspensión de una MOI 10:1 durante 2 h, pasado ese tiempo las células se lavaron con PBS 1X tres veces y se trataron por una hora con una solución de amikacina 80 µg/mL para eliminar las bacterias extracelulares. Pasado ese tiempo las células nuevamente se lavaron con PBS 1X tres veces. A partir de este paso se tomaron los tiempos de 1, 2, 3, 4 y 5 horas posinfección.

Aislamiento de ARNm y retrotranscripción

Después de realizar la infección como se describió en el apartado anterior, las células de cada tiempo posinfección se trataron con 500 µL de TRIzol (ThermoScientific) para realizar la extracción de ARN total por precipitación con isopropanol siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN total purificado se trató con DNase II (ThermoScientific) para evitar contaminación con ADN genómico. Para la retrotranscripción (RT) del ARN se usaron 3 µg de ARN total, al que se le adicionaron 0.5 µg de oligo (dT, ThermoScientific) y se incubaron a 70°C por 10 minutos. El Master Mix para la retrotranscripción se preparó con 1X *single stranded buffer*; 0.5 mM de DTT, 500 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP, Invitrogen) y 200 U de transcriptasa reversa MMLV (ThermoScientific). Las reacciones de retrotranscripción se incubaron a 42°C por una hora. Después de la formación de cDNA, que fue almacenado a -20°C hasta su uso.

PCR cuantitativa (qPCR)

Se prepararon mezclas de reacción usando un Master Mix con 1.5 mM de MgCl₂ (Ampliqon III), Eva Green (Biotium) como fluorocromo y ROX (Sigma-Aldrich) como colorante de referencia, a esta mezcla se le adicionaron los iniciadores específicos para cada gen: para el caso del receptor de manosa se usaron los iniciadores (MRC1), Fwd 5'-AACAGTCAGTCAAGCCCAGG-3' y Rev 5'-AAAGGACAGACCAGTACAATTCAG-3'. Para el caso del receptor CR3 del complemento se usaron los iniciadores Fwd 5'-TGCTGCTGCTCAGGACAGAT-3' Rev 5'-TGTTCTTTGTCTCATTGAAGACGGC-3' y para el caso de actina se usaron los siguientes iniciadores Fwd 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' y Rev 5'-TCCATCACGATGCCAGTG-3'. Una vez preparada la mezcla de reacción se adicionaron 20 pg de cDNA de cada tiempo a evaluar. Los genes se amplificaron de la siguiente manera: 15 s de desnaturalización a 95°C, 30 s

de alineamiento a 58°C y 15 s de extensión a 72°C por 35 ciclos utilizando un equipo de PCR en tiempo real Step One plus (Applied Biosystems). Se utilizó el método de análisis ddCT para la cuantificación relativa utilizando el programa computacional Step One V2.3. Los valores de expresión relativa de cada tiempo posinfección se compararon con los valores de expresión de cada gen en las células sin infectar (control), en todos los casos los valores se normalizaron con la expresión del gen endógeno actina.

Microscopia confocal

Se realizaron suspensiones de neutrófilos con 40 mil células para cada tiempo de infección en placas de 24 pozos con cubreobjetos estériles, se infectaron con las suspensiones bacterianas a una MOI de 10:1, como se describió anteriormente. Después de la infección, las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se fijaron con una solución de paraformaldehído a 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de fijación las células adheridas al cubreobjetos se lavaron con PBS 1X tres veces. Para la determinación de la expresión de los receptores, las preparaciones se incubaron con los anticuerpos monoclonales específicos: IgG anti MRC1 (ABCAM, catálogo ab64693) y con IgG anti CD11b (CR3) human (ABCAM catálogo ab187537) durante 2 horas a 37°C, posteriormente se lavaron cinco veces con PBS y se incubaron durante 90 minutos a 37°C con los anticuerpos secundarios marcados con los fluorocromos FITC (ABCAM catálogo ab6717) o TRITC (ABCAM catálogo ab6718). El exceso de anticuerpo secundario se eliminó lavando los cubreobjetos cinco veces con PBS 1X; después del último lavado las preparaciones se montaron en portaobjetos usando Vectashield-DAPI (Vector Labs) como medio de montaje y se analizaron las señales de fluorescencia en un sistema de escaneo confocal (LSM5 Pascal, Zeiss). La medición de la intensidad media de fluorescencia de los

receptores de MRC1 y CR3 en cada tiempo posinfección se realizó utilizando el programa LSM5 Pascal Zeiss contando 50 células por campo. La intensidad en la expresión de cada receptor se calculó utilizando como referencia la expresión basal en las células sin infectar (control).

Análisis estadístico

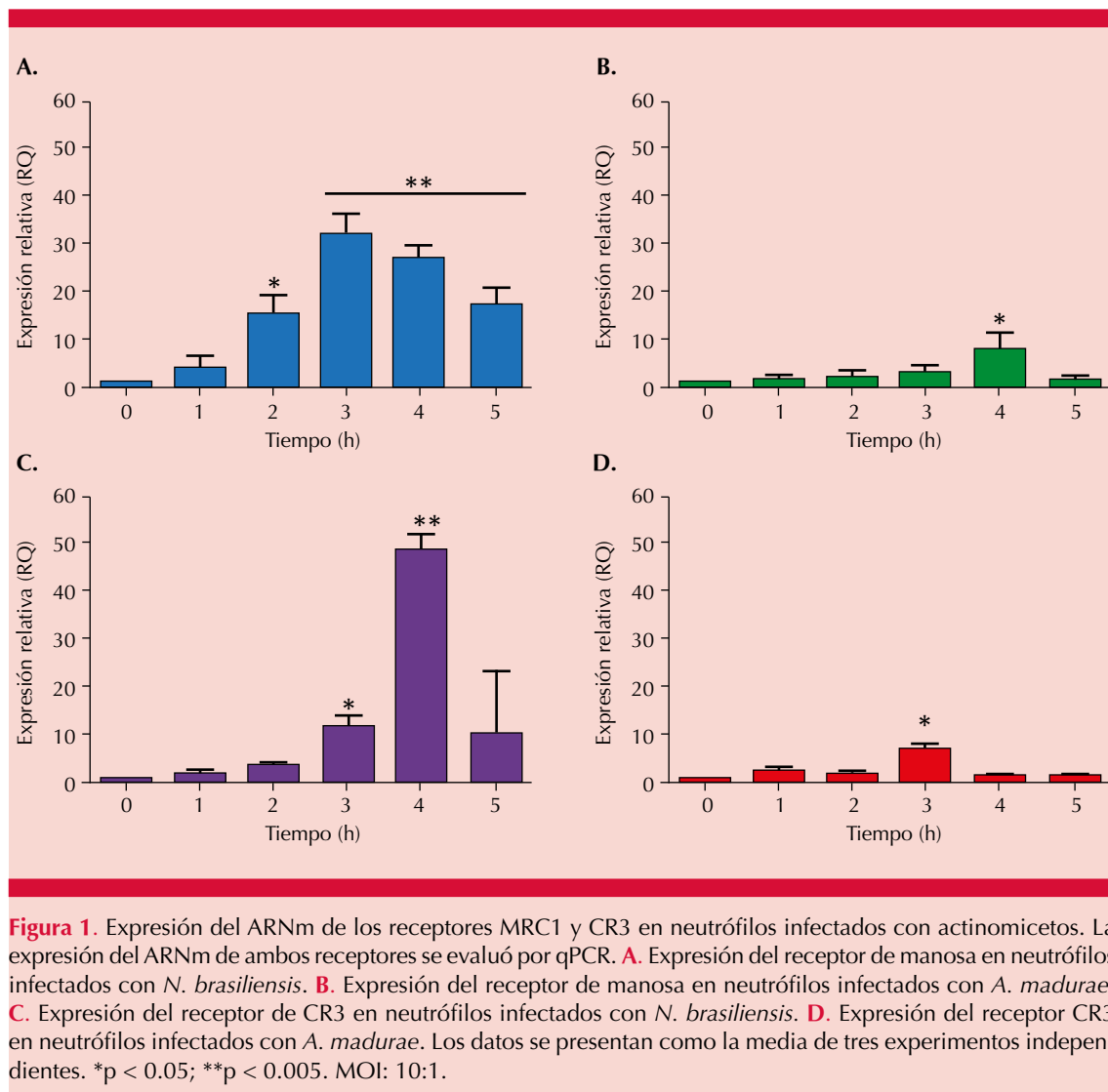
Todos los valores numéricos se presentan como promedio de tres experimentos independientes, para evaluar significación estadística se compararon los valores de los tiempos posinfección contra los valores de las células sin infectar a través de la prueba para datos no paramétricos U de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los valores p se consideraron de la siguiente manera: *p < 0.05; **p < 0.005 y ***p < 0.0005.

RESULTADOS

En este trabajo se evaluó la sobreexpresión de los receptores de manosa MRC1 y del complemento CR3 en neutrófilos humanos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae*. Respecto a la expresión del gen que codifica para la expresión del receptor de manosa, se detectó una ligera expresión a nivel basal (control sin infectar) que aumentó cuando los neutrófilos son infectados con ambas cepas de actinomicetos (aumento estadísticamente significativo). **Figura 1A y C**

Esta expresión alcanza un pico máximo a las 4 horas posinfección con ambas cepas y posteriormente disminuye significativamente. Los niveles de expresión del receptor de complemento CR3 de manera basal son bajos (células sin infectar) y se observa un aumento discreto en la expresión del ARNm de este receptor cuando las células son infectadas con *N. brasiliensis* (**Figura 1B**) y con *A. madurae* (**Figura 1D**).

Estos aumentos en la expresión de los receptores se corroboraron por microscopia confocal y las



imágenes de fluorescencia muestran la misma tendencia que los resultados de expresión de ARNm, en el caso de la detección de los receptores en superficie de las células se observa un claro aumento del receptor de manosa con ambas cepas (Figura 2A y C) y un discreto aumento del receptor CR3 (Figura 2B y D).

Para cuantificar la expresión de estos receptores se utilizó una medición de intensidad media de fluorescencia (IMF) donde se corroboró que el

receptor de manosa alcanza niveles mucho más elevados en los neutrófilos infectados con ambas cepas (Figura 3A); en contraste con el receptor CR3 de complemento que, a pesar de observarse tendencia en aumento, los niveles de sobreexpresión son discretos (Figura 3B).

DISCUSIÓN

En la piel participan diferentes estirpes celulares en el control de los procesos infecciosos, dentro

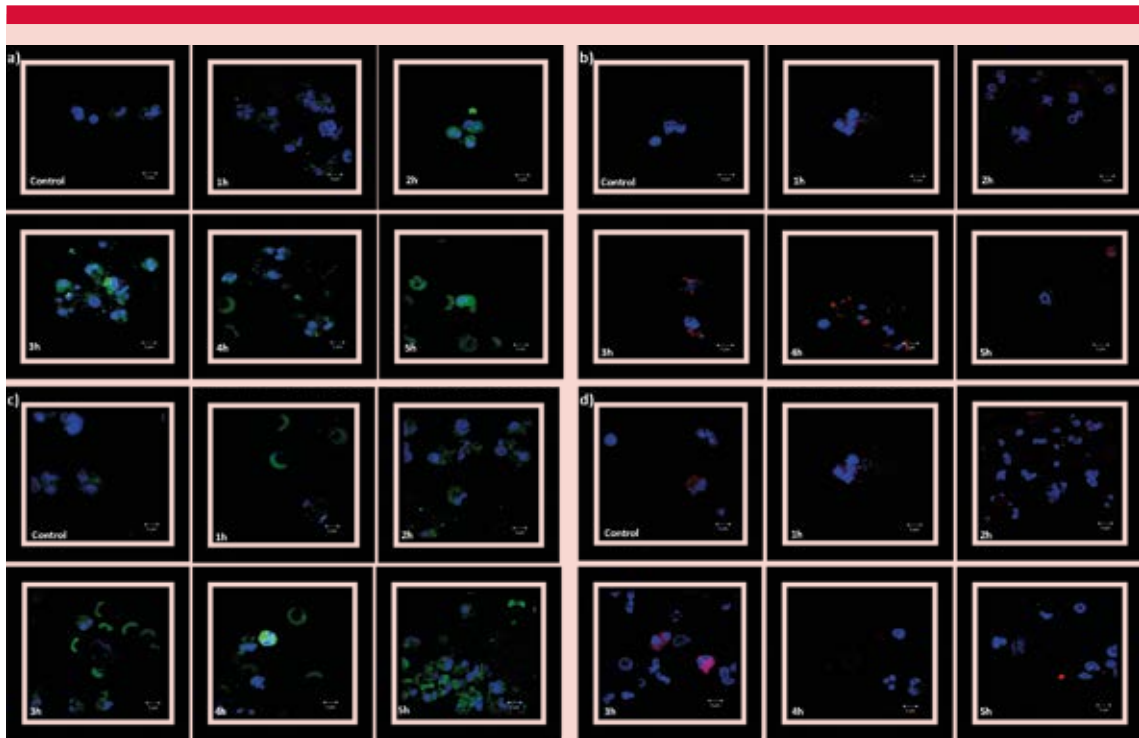


Figura 2. Expresión de los receptores MRC1 y CR3 en neutrófilos infectados con actinomicetos. La expresión de ambos receptores se evaluó por microscopía confocal. **A.** Expresión del receptor de manosa (MRC1) en neutrófilos infectados con *N. brasiliensis*. **B.** Expresión del receptor de CR3 en neutrófilos infectados con *N. brasiliensis*. **C.** Expresión del receptor de manosa (MRC1) en neutrófilos infectados con *A. madurae*. **D.** Expresión del receptor CR3 en neutrófilos infectados con *A. madurae*. MOI 10:1. El color verde representa el receptor MRC1 (FITC), el color rojo representa al receptor de complemento CR3 (Rho) y el color azul marca el núcleo de las células (DAPI).

de las células más activas se encuentran las células dendríticas, macrófagos, linfocitos TCD4+ residentes de piel, eosinófilos y neutrófilos.^{12,13} Los neutrófilos tienen mecanismos bastante conocidos que utilizan para reconocer y eliminar patógenos, como es el caso de la fagocitosis,¹⁴ y expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como los receptores tipo Toll (TLR), receptores NOD, entre otros y producen efectores de la respuesta innata, como quimiocinas, citocinas y péptidos antimicrobianos.¹⁵ Respecto a procesos infecciosos se sabe que participan en la eliminación de patógenos, como es el caso de *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis*.^{16,17}

Debido a que los neutrófilos se encuentran en altas proporciones en las lesiones de los pacientes con actinomicetomas,^{5,6} es importante conocer el papel que juegan en el reconocimiento y el posterior control de la infección, por lo que en este trabajo se analizó la expresión de dos receptores, manosa MRC1 y complemento CR3, que en estirpes como macrófagos se han descrito su sobreexpresión y actividad en el reconocimiento de patógenos y la activación celular por diferentes mecanismos.

Los resultados experimentales de este estudio sugieren que los neutrófilos infectados con

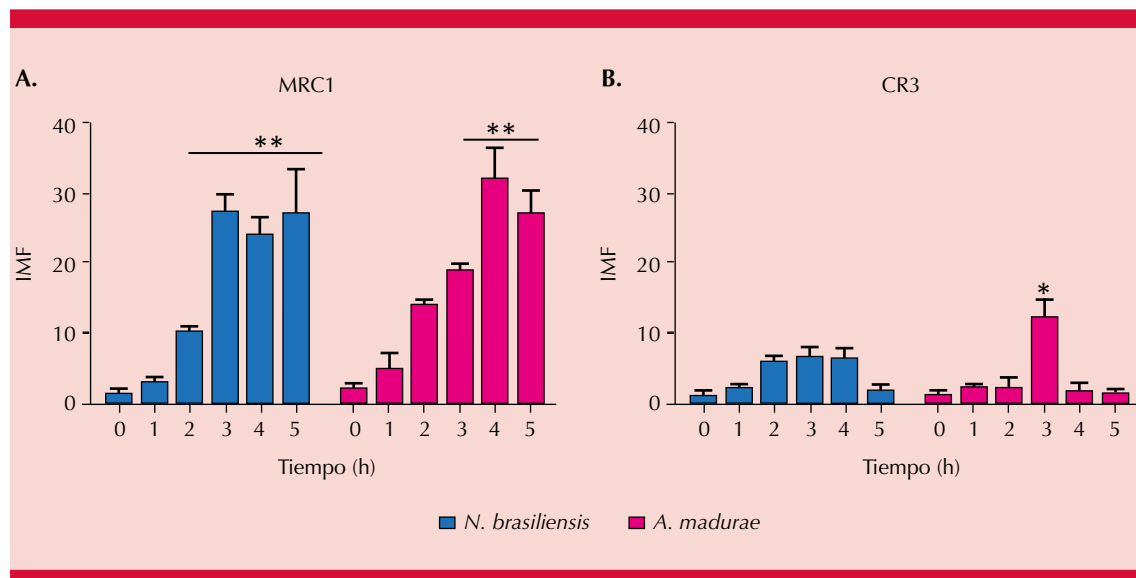


Figura 3. Valores de intensidad media de fluorescencia de la expresión de los receptores de MRC1 y CR3 en neutrófilos infectados con actinomicetos. Los valores numéricos que representan la media del cálculo de la IMF/200 células. **A.** Análisis de la IMF del receptor de manosa MRC1 en neutrófilos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae*. **B.** Análisis de la IMF del receptor de complemento CR3 en neutrófilos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae*. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

N. brasiliensis y *A. madurae* aumentan de manera intensa la expresión del receptor de manosa; sin embargo, estas células expresan de manera discreta el receptor CR3 de complemento, bajo las mismas condiciones de infección.

El receptor de manosa es un receptor que participa en la captación de bacterias patógenas y no patógenas por macrófagos activados,¹⁸ y en neutrófilos se ha descrito como mediador de respuestas inmunológicas en fenómenos infecciosos, por ejemplo con *Paracoccidioides brasiliensis*, en este evento los neutrófilos captan al hongo a través del receptor de manosa (y otros receptores) y producen altas cantidades de IL-12, IL-10,¹⁰ estas citocinas se consideran moduladoras de la respuesta inmunitaria debido a que IL-12 en etapas tardías de la infección activa células NK que son productoras de INF, citocina que promueve un ambiente inflamatorio que ayuda a la eliminación del hongo.

En el caso del receptor CR3 se ha descrito que los neutrófilos expresan este receptor de manera basal y que, además de usarlo para el reconocimiento de patógenos opsonizados, este receptor activa uno de los mecanismos efectivos en el control de las infecciones que es el complemento, como es el caso de la infección por *Cryptococcus neoformans*,^{19,20} además, se sabe que en los neutrófilos este receptor también se une a ICAM1, que es una molécula de adhesión que se encuentra en los endotelios y que facilita el fenómeno de diapédesis.²¹

El aumento en la expresión de estos receptores, sugiere que podrían estar implicados en el reconocimiento de los actinomicetos por los neutrófilos y, por ende, en la activación de la célula, ya sea de manera directa por el receptor MRC1 que reconoce glucoproteínas y glucolípidos de la pared de los actinomicetos, o de bacterias opsonizadas para el caso del recono-

cimiento a través del receptor CR3, por lo que valdría la pena evaluar en etapas posteriores la funcionalidad de ambos receptores y la consecuencia biológica de su expresión.

CONCLUSIÓN

Los neutrófilos infectados con *N. brasiliensis* y *A. madurae* sobreexpresan el receptor de manosa MRC1; sin embargo, los niveles de expresión del receptor de complemento CR3 son bajos.

Agradecimientos

Este proyecto contó con financiamiento de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, así como del CONACyT SEP/CB proyecto: 258735. APR, LECR y JICS son profesores perfil PRODEP-SEP; JLH es profesora con estímulo de EDI y COFAA-IPN; JLH y JICS son miembros del SNI-CONACyT.

REFERENCIAS

- Nenoff P, van de Sande WW, Fahal AH, Reinel D, Schöfer H. Eumycetoma and actinomycetoma an update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29(10):1873-83.
- Develoux M. Mycetoma and their treatment. *J Mycol Med* 2016;26(2):77-85.
- Arenas-Guzman R, Fernandez-Martinez RF, Torres-Guerrero E, Garcia C. Actinomycetoma: An update on diagnosis and treatment. *Cutis* 2017;99:E11-E15.
- López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Bonifaz A, Arenas R, et al., Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gac Med Mex* 2013;149(5):586-92.
- Palma RA, Castrillón RL, Padilla DC, Reyes FF. Caracterización histoquímica de micetomas por *Actinomadura madurae*, *Nocardia brasiliensis* y *Madurella mycetomatis*. *Dermatol Rev Mex* 2005;49:51-58.
- Palma RA, Castrillón RL, Padilla DC, Rosas HL, Márquez C. Purificación y determinación de la estructura de los polisacáridos que forman el cemento de unión en granos de actinomicetomas ocasionados por *Actinomadura madurae* y *Nocardia brasiliensis*. *Dermatol Rev Mex* 2006;50:165-73.
- Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* 1991;337(8735):211-4.
- Wanke I, Steffen H, Christ C, Krismer B, et al. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Invest Dermatol* 2011;131(2):382-90.
- Deniset JF, Kubers P. Recent advances in understanding neutrophils. *F1000Res* 2016;5:2912.
- Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, Bachiega TF, et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. *Cytokine* 2014;67(1):36-43.
- Fujimoto K, Motowaki T, Tamura N, Aratani Y. Myeloperoxidase deficiency enhances zymosan phagocytosis associated with up-regulation of surface expression of CD11b in mouse neutrophils. *Free Radic Res* 2016;50(12):1340-1349.
- Belkaid Y, Tamoutounour S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat Rev Immunol* 2016;16(6):353-66.
- Dréno B, Araviiskaia E, Berardesca E, Gontijo G, et al, Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30(12):2038-2047.
- Yang F, Feng C, Zhang X, Lu J, Zhao Y. The diverse biological functions of neutrophils, beyond the defense against infections. *Inflammation* 2017;40(1):311-323.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(8):519-31.
- Witter AR, Okunnu BM, Berg RE. The Essential role of neutrophils during infection with the intracellular bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2016;197(5):1557-65.
- Warren E, Teskey G, Venketaraman V. Effector mechanisms of neutrophils within the innate immune system in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Med* 2017; 6(2). pii: E15.
- Astari-Dequeker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, Rittig MG, et al. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* 1999;67(2):469-77.
- Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Reprint of neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 2013;17(4):1185-97.
- Sun D, Shi M. Neutrophil swarming toward *Cryptococcus neoformans* is mediated by complement and leukotriene B4. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;477(4):945-51.
- Kim GY, Lee YM, Kwon JH, Jun HS, Chou J. Glycogen storage disease type Ib neutrophils exhibit impaired cell adhesion and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482(4):569-574.