



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

Unidad Zacatenco

Departamento de Biomedicina Molecular

**“Participación de la miosina 1F en la polarización de
los macrófagos”**

Tesis

Que presenta

M en C. Zayda Lizbeth Piedra Quintero

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Biomedicina Molecular

Director de la tesis

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Ciudad de México

Noviembre, 2018

ASESORES

Dr. Michael Schnoor¹

Dr. José Luis Maravillas Montero²

Dra. María Carmen Sánchez Torres¹

Dr. José Manuel Hernández Hernández³

**¹Departamento de Biomedicina Molecular
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
I.P.N.**

**²Red de apoyo a la Investigación
Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador
Zubirán”**

**³Departamento de Biología Celular
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
I.P.N.**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR DEL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. LEOPOLDO
SANTOS ARGUMEDO**

**PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE
CONTÓ CON EL FINANCIAMIENTO DEL CONSEJO
NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (NÚMERO DE
PROYECTO: 255053, NÚMERO DE BECARIO: 281130)
Y CON EL APOYO ECONÓMICO DE LA BECA DE
DISERTACIÓN DOCTORAL “HUGO ARÉCHIGA
URTUZUÁSTEGUI” EDICIÓN 2018**

**SE AGRADECE AL DR. HÉCTOR ROMERO RAMÍREZ,
A LOS TÉCNICO LENIN ESTUDILLO DÍAZ Y JESÚS
GUZMÀN CAMPUSANO, AL BIOL. RAÚL BONILLAS
MORENO, A LA M. EN C. AURORA CANDELARIO
MARTÍNEZ Y A LA M. EN C. ANGÉLICA SILVIA
OLIVARES POR LA AYUDA BRINDADA DURANTE LA
REALIZACIÓN DE ESTA TESIS, ASÍ COMO AL MVZ
RICARDO GAXIOLA, A VICTOR MANUEL GARCÍA
GÓMEZ Y A FELIPE CRUZ MARTÍNEZ POR SU APOYO
PROFESIONAL CON EL USO Y MANEJO DE LOS
ANIMALES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO**

AGRADECIMIENTOS

A **mis padres** por su cariño, por ser los mejores consejeros y la mejor guía, por su apoyo en todas mis decisiones, por estar siempre a mi lado para motivarme a continuar en los momentos difíciles y por educarme para ser la persona q hoy soy.

A **mis hermanos** y el resto de **mi familia** por su apoyo incondicional, por su cariño y por acompañarme durante mis estudios.

Al **Dr. Leopoldo Santos Argumedo** por brindarme su amistad, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por compartir sus conocimientos y por su acertada dirección durante la realización de esta tesis.

Al **Dr. Porfirio Nava, al Dr. Oscar Medina, al Dr. Michael Schnoor y al Dr. José Manuel Hernández Hernández, al Dr. José Luis Maravillas Montero y al Dr. Nicolás Villegas** por brindarme su asesoría y sus consejos que permitieron realizar esta tesis.

A mis **compañeros de laboratorio**, por compartir sus conocimientos y por instruirme más de una vez durante la realización de este trabajo.

A mis amigos **Gustavo, Cristina, Jorge y Rafael**, por su incondicional amistad, por sus consejos, por estar siempre a mi lado y por siempre apoyarme en mis decisiones.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
II. JUSTIFICACIÓN	32
III. HIPÓTESIS.....	33
IV. OBJETIVO GENERAL	34
Objetivos particulares.....	34
V. MATERIALES Y MÉTODOS	35
VI. RESULTADOS.....	43
VII. DISCUSIÓN.....	79
VIII. CONCLUSIÓN.....	84
IX. PERSPECTIVAS.....	85
X. REFERENCIAS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Los macrófagos residentes de tejido.	9
Figura 2. Los macrófagos durante la homeostasis y la inflamación intestinal.	16
Figura 3. Los macrófagos M1 y M2.	18
Figura 4. La familia de las integrinas y sus receptors.	22
Figura 5. ILK induce la activación de diversas vías de señalización a través de la formación de complejos proteico.	25
Figura 6. Las miosinas en eucariontes.	27
Figura 7. Dominios de las miosinas.	28
Figura 8. Diferencias entre las miosinas de cola corta y miosinas de cola larga.	30
Figura 9. La integrina α	44
Figura 10. La miosina 1F incrementa la adhesión intercelular mediada por la integrina $\alpha v \beta 3$ en los macrófagos.	47
Figura 11. La miosina 1F es requerida para inducir el fenotipo pro-inflamatorio de los macrófagos.	52
Figura 12. En los macrófagos, la miosina 1F participa en la señalización a través de Akt/STAT durante un estímulo inflamatorio.	56
Figura 13. La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR induce la señalización a través de la molécula STAT río debajo del eje Myo1F/integrina α	65
Figura 14. La miosina 1F regula la homeostasis intestinal.	68
Figura 15. La mucosa del colon de los ratones Myo1F ^{-/-} presentan una reducción en el daño epitelial intestinal y una mayor restitución de la mucosa después de la inducción de colitis.	74
Figura 16. Modelo.	78

ABREVIATURAS

ATP	Adenosintrifosfato
BMM	Macrófagos derivados de médula ósea
Ca ²⁺	Calcio
CD	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSS	Dextran sulfato de sodio
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
F-actina	Actina filamentosa
FERM	Dominio de proteínas de la familia de Ezrina, Radixina y Moesina
G-actina	Actina globular
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HCl	Ácido clorhídrico
IAE	Índice de actividad de la enfermedad
IFN- γ	Interferón- γ
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa inducible de Óxido Nítrico
KDa	KiloDalton
LFA-1	Antígeno asociado a la función de linfocitos-1
LPS	Lipopolisacárido
MAC-1	Antígeno de macrófagos-1
mg	Miligramos
MHC-I	Molécula del complejo principal de histocompatibilidad clase I
mL	Mililitros
Mo	Monocitos
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
Myo	Miosina
M ϕ	Macrófagos
NaOH	Hidróxido de Sodio
ng	Nanogramos

NS	No significativo
pb	Pares de bases
PFA	Para-formaldehído
pH	Potencial de hidrógeno
PH	Dominio de homología a Pleckstrina
PIP2	Fosfatidil Inositol bifostato
PIPe	Fosfatidil Inositol trifostato
RNA	Ácido ribonucleico
SEM	Error estándar medio
SH3	Dominio de homología a Scr-3
TH	Dominio de homología a la cola
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
WASP	Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich
WIP	Proteína de interacción con WASP
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

RESUMEN

Los macrófagos son células con una plasticidad extraordinaria que contribuyen al daño epitelial a través de la secreción de citocinas. El mecanismo que induce la polarización de los macrófagos en un fenotipo pro-inflamatorio no ha sido completamente entendido. En este trabajo, reportamos que, durante la inflamación, los macrófagos incrementan sus propiedades de adhesión intercelular con la finalidad de adquirir un fenotipo M1. Usando modelos in vivo e in vitro demostramos que la adhesión intercelular esta mediada por la integrina $\beta 3$ y depende de la presencia de la miosina 1F (Myo1F). Esta adhesión intercelular estimula el fenotipo M1 en los macrófagos a través de la activación de STAT1 y STAT3 río abajo de la vía de señalización ILK/Akt/mTOR. La inhibición de la integrina $\beta 3$, la vía Akt/mTOR o la deficiencia de la miosina 1F disminuyen el compromiso de los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio. En un modelo de colitis, la deficiencia de la Myo1F atenúa la secreción de citocinas pro-inflamatorias, reduce el daño epitelial y el índice de la actividad de la enfermedad, además de incrementar la reparación del tejido. En conjunto, nuestros datos describen una función desconocida de la Myo1F como parte de la maquinaria que regula la adhesión intercelular y la polarización de los macrófagos.

ABSTRACT

Macrophages are highly mobile cells with extraordinary plasticity and actively contribute to cytokine-mediated epithelial damage. The mechanisms triggering macrophage polarization into a proinflammatory phenotype are unknown. Here, we report that during inflammation macrophages enhance its intercellular adhesion properties in order to acquire a M1-phenotype. Using *in vitro* and *in vivo* models we demonstrate that intercellular adhesion is mediated by integrin $\beta 3$ and relies in the presence of the unconventional class I myosin 1F (Myo1F). Intercellular adhesion mediated by integrin $\beta 3$ stimulates M1-like phenotype in macrophages through hyperactivation of STAT1 and STAT3 downstream of ILK/Akt/mTOR signaling. Inhibition of integrin $\beta 3$, Akt/mTOR or lack of Myo1F prevented the commitment of macrophages into a pro-inflammatory phenotype. In a model of colitis, Myo1F deficiency strongly attenuates the secretion of pro-inflammatory cytokines, reduced epithelial damage, ameliorates disease activity and enhances tissue repair. Together our findings uncover an unknown role for Myo1F as part of the machinery that regulates intercellular adhesion and polarization in macrophages.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS MACRÓFAGOS ($m\phi$)

El sistema inmunológico está constituido por células, tejidos y órganos cuya función es proteger al cuerpo de sustancias u organismos extraños¹. Dependiendo del tipo de respuesta que se evoque podemos clasificar al sistema inmunológico en inmunidad innata o inmunidad adaptativa. Los macrófagos son células innatas encargadas de presentar antígenos y son la primera línea de defensa del organismo².

Los macrófagos son una población heterogénea de células de origen mieloide que se caracterizan por su habilidad para fagocitar y responder a diversos estímulos con la finalidad de evocar respuestas inmunológicas o de mantener la homeostasis³. Bajo condiciones homeostáticas, estas células constituyen del 5 al 20% de las células residentes en los tejidos y provienen al menos de tres fuentes distintas: el saco vitelino embrionario, el hígado fetal o la médula ósea⁴ (**Figura 1**). Por otra parte, tras un estímulo inflamatorio, grandes cantidades de monocitos son reclutados desde la médula ósea hacia el sitio de inflamación donde son diferenciados a macrófagos los cuales, ahora desempeñarán nuevas funciones dependiendo del contexto fisiopatológico en el que se encuentren⁵.

Para responder de manera eficiente y específica, los macrófagos están equipados con una gran variedad de receptores de reconocimiento de patógenos, de receptores *scavenger*, de receptores de reconocimiento de patrones, de receptores de citocinas y de moléculas de adhesión^{6,7}. Estas células han sido consideradas centinelas del sistema inmunológico debido a su localización estratégica y a su habilidad para iniciar y modular respuestas inmunológicas⁸.

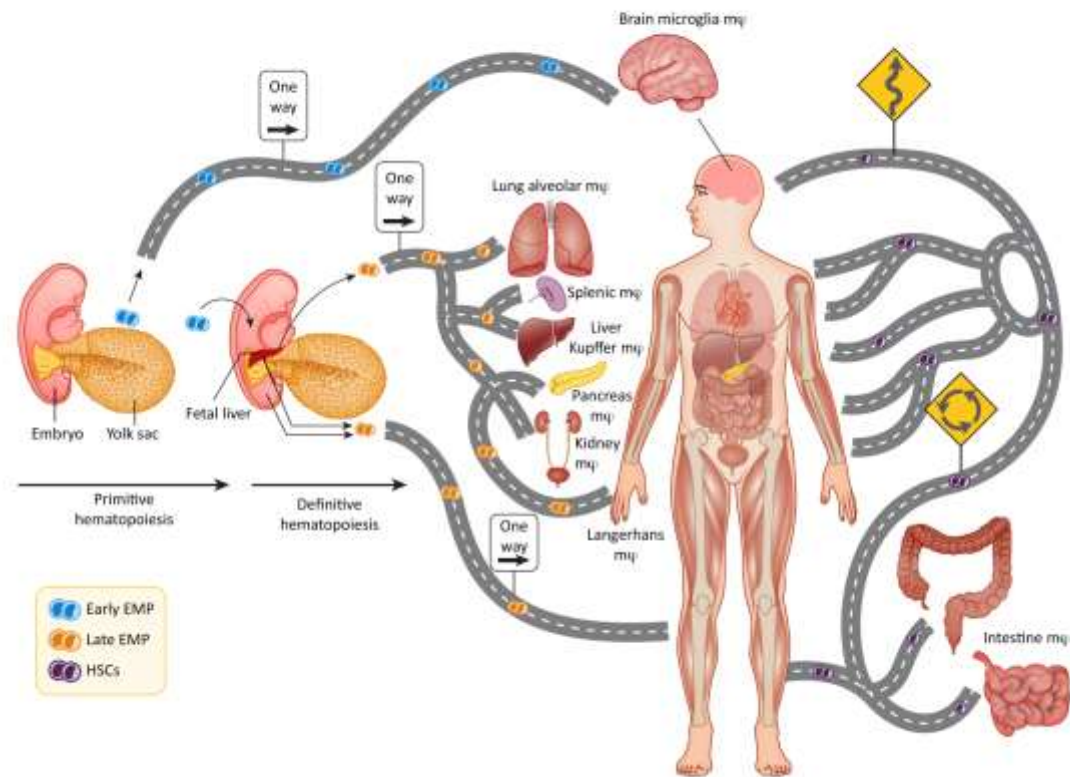


Figura 1. Los macrófagos residentes de tejido. Los macrófagos residentes de tejido provienen al menos de tres fuentes distintas. Los macrófagos provenientes del saco vitelino son independientes de los progenitores de células hematopoyéticas y son los encargados de poblar el cerebro. Los macrófagos del hígado fetal junto a los macrófagos del saco vitelino son la fuente de los macrófagos en el pulmón, el bazo, el páncreas y el riñón. Los macrófagos de la médula ósea pueden poblar la mayoría de los tejidos después de una adaptación homeostática, una infección, una enfermedad o el cáncer⁴. EMP, progenitor eritromieloide; HSCs, progenitor de células hematopoyéticas. Tomado de Guerriero, J. L. Macrophages: The Road Less Traveled, Changing Anticancer Therapy. *Trends Mol. Med.* (2018).doi:10.1016/j.molmed.2018.03.006

LOS MACRÓFAGOS EN EL TEJIDO INTESTINAL

El intestino es la mucosa con mayor superficie del cuerpo humano y es el mayor compartimento del sistema inmunológico⁹. Este tejido está expuesto constantemente a antígenos externos que lo obligan a montar respuestas inmunológicas protectoras para mantener la homeostasis intestinal¹⁰. Los macrófagos son centrales para mantener esta homeostasis y han sido tema de estudio para entender las enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn^{11,12}.

En el intestino, los macrófagos se distribuyen a lo largo de todo el tejido, siendo el colon donde se encuentra la mayor cantidad de estas células¹¹ localizándose principalmente en la lámina propia en estrecha cercanía con la monocapa epitelial¹³. Bajo condiciones homeostáticas, los macrófagos se encargan de fagocitar células apoptóticas y bacterias, presentar antígenos, remodelar el tejido y secretar citocinas anti-inflamatorias y mediadores solubles que estimulan la proliferación de las células epiteliales en las criptas intestinales o al mantenimiento de otras poblaciones como las células T reguladoras¹⁴ (**Figura 2**). Sin embargo, tras la pérdida de la integridad de la barrera epitelial, grandes cantidades de monocitos se infiltran en el tejido donde se diferencian a macrófagos con nuevas funciones^{12,14}. Por ejemplo, durante las enfermedades inflamatorias intestinales o en modelos animales de inflamación intestinal, como la inducción de colitis con DSS¹⁵, podemos encontrar una gran cantidad de macrófagos pro-inflamatorios encargados producir especies reactivas del oxígeno, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-23, etc. que contribuyen al deterioro del epitelio o bien diversas quimiocinas que inducen el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos al sitio de inflamación^{16,17-19}.

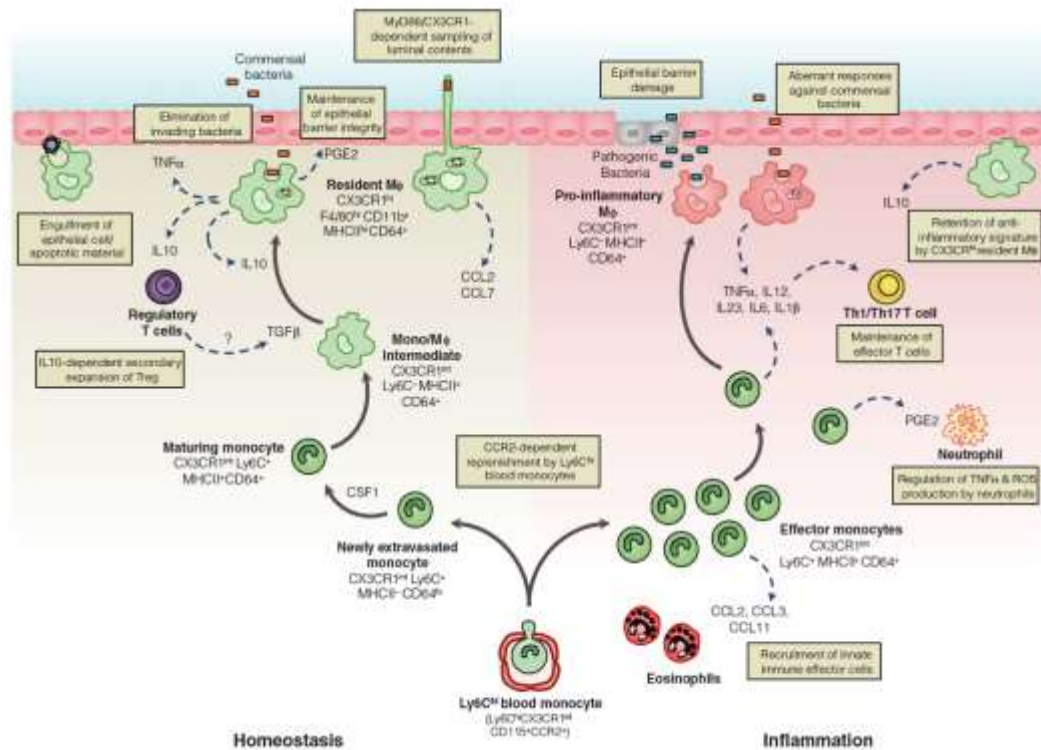


Figura 2. Los macrófagos durante la homeostasis y la inflamación intestinal.

Durante condiciones homeostáticas los monocitos ingresan a la mucosa intestinal y se diferencian a macrófagos. Estos macrófagos se localizan por debajo de la barrera epitelial con la finalidad de fagocitar cualquier agente comensal o patógeno y para eliminar células apoptóticas. Además, secretan IL-10 para facilitar la expansión secundaria de las células T reguladoras quienes a su vez secretan TGF-β responsable de estimular a los monocitos recién extravasados. Cuando la homeostasis se ve perturbada por una inflamación, infección o pérdida de la integridad de la barrera epitelial, grandes cantidades de monocitos, con características inflamatorias, son reclutados para dar origen a los macrófagos inflamatorios. Ambas poblaciones celulares producen citocinas como IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-12, etc. que estimulan a otras células efectoras o bien que orquestan el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos¹⁴. Tomado de Bain, C. C. & Mowat, A. M. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* (2014).doi:10.1111/imr.12192

1.1.1 LA ACTIVACIÓN Y LA POLARIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

Los macrófagos residentes de tejido y los macrófagos recientemente diferenciados a partir de monocitos, presentan una gran plasticidad que les permite ajustarse a cambios del ambiente y responder de maneras rápida y específica²⁰. Así, los macrófagos pueden activarse y diferenciarse hacia un fenotipo particular dependiendo de las señales del microambiente en el que se encuentren en un proceso denominado polarización²¹. La polarización de los macrófagos involucra la activación de diversas vías de señalización, la activación transcripcional y cambios epigenéticos que regulan la plasticidad de los macrófagos²².

Debido a su complejidad, la activación y la polarización de los macrófagos se ha estudiado principalmente en sistemas *in vitro* y se han propuesto dos perfiles generales de polarización: los macrófagos clásicamente activados (M1) o macrófagos pro-inflamatorios y los macrófagos alternativamente activados (M2) o anti-inflamatorios^{23,24} (**Figura 3**).

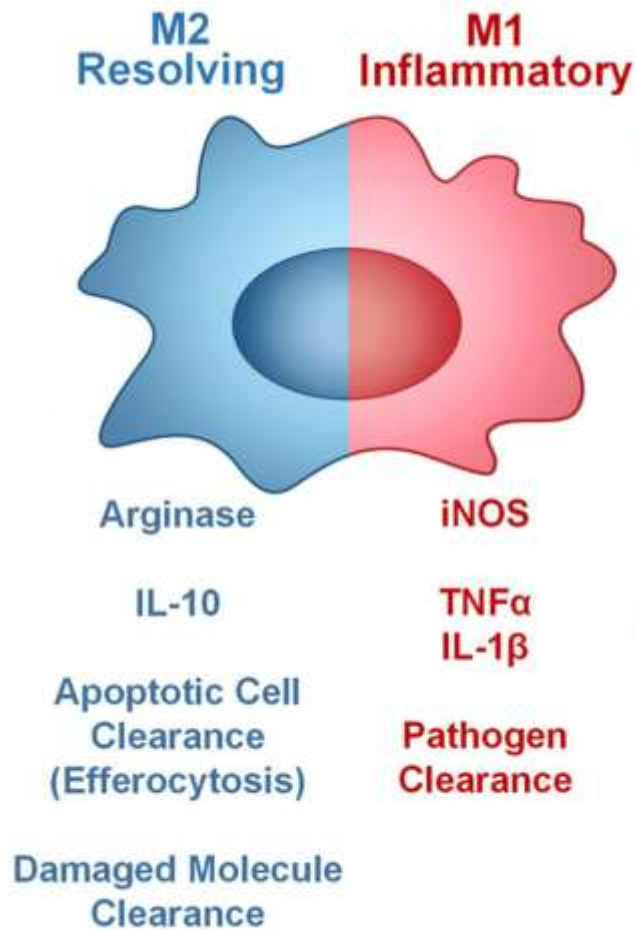


Figura 3. Los macrófagos M1 y M2. En cultivo, los macrófagos M1 son células inducidas tras la estimulación con IFN- γ o por patrones moleculares asociados a patógenos como el LPS. Estas células presentan características inflamatorias y son importantes en la eliminación de patógenos ya que producen grandes cantidades de TNF- α , IL-1 β , iNOS, etc. Los macrófagos M2 son responsables de eliminar células apoptóticas y participan en respuestas parasitarias. Son inducidos por la estimulación con IL-4 y son productores de arginasa 1 y citocinas anti-inflamatorias como la IL-10²⁴. Tomado de Bohlson, S. S., O'Conner, S. D., Hulsebus, H. J., Ho, M. M. & Fraser, D. A. Complement, C1Q, and C1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front. Immunol.* (2014).doi:10.3389/fimmu.2014.00402

Bajo condiciones homeostáticas, los macrófagos residentes exhiben un fenotipo anti-inflamatorio que promueve la homeostasis y la reparación en los tejidos^{25,26}. Sin embargo, tras un estímulo inflamatorio como el LPS y el IFN- γ , se estimula la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio induciendo la producción de oxígeno citotóxico, radicales del nitrógeno y la secreción de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-23, IFN- γ , etc.^{27,28} A pesar de que existen otros estímulos implicados en la polarización M1, el LPS y el IFN- γ son considerados los estímulos clásicos para establecer este fenotipo y se sabe que estimulan diferentes vías de señalización para lograrlo²⁹⁻³³. El IFN- γ activa al transductor de señales JAK1 y al factor de transcripción STAT1 el cual, induce la transcripción de diversos genes involucrados en mediar las respuestas inflamatorias (CSFRB, IL15RA, IL2RA e IL6R, CD36, CD38, CD69, CD97, ICAM1, integrina α L, integrina α 4, integrina β 7, mucina 1, etc)^{34,35}. Por otra parte, el LPS es reconocido a través de TLR4 y activa las vías de señalización dependientes de MyD88 o TRIF regulando así la producción de moléculas inflamatorias (IFN- β , IL-12, IL-23, TNF, IL-6 e IL-1 β , CCL2, CXCL10 y CXCL11)^{36,37,38} (REF).

De manera contraria, durante la resolución de la inflamación, es necesario que ocurra un balance en la activación de los macrófagos, ahora hacia un fenotipo M2, con la finalidad de inhibir o regular la producción de estos mediadores inflamatorios y finalmente restaurar la homeostasis del tejido³⁹. Sin embargo, también se ha reportado que los macrófagos M2 están involucrados en las respuestas contra parásitos, en la progresión de tumores y en el remodelamiento de los tejidos^{4,11,40}. Las citocinas IL-4 e IL-13, son producidas por respuestas tipo Th2, por eosinófilos, basófilo o los mismos macrófagos^{41,42}. Estas citocinas participan en el proceso de polarización hacia el fenotipo M2 ya sea activando a STAT6 o induciendo la producción y secreción de IL-10, la cual induce la activación del factor de transcripción STAT3 río debajo de la molécula JAK^{43,44,45}. La activación de ambos factores de transcripción reprime la producción de las citocinas pro-inflamatorias e

induce la expresión de moléculas anti-inflamatorias como Arginasa1, YM1, CD36, SOCS1, SOCS3, IL-4R, etc.^{43,46}

Además de la señalización a través de las moléculas STAT, la vía PI3K/Akt también está involucrada en la polarización de los macrófagos⁴⁵. Esta vía puede ser activada por receptores de reconocimiento de patógenos como los TLRs, por las citocinas, las quimiocinas y por los receptores para la porción Fc de los anticuerpos (FcR)^{47,48}. Una vez activada, PI3K regula la formación de PIP3 a partir de PIP2 en la membrana plasmática, posteriormente PIP3 recluta a Akt y a mTORC2 hacia la membrana, facilitando la fosforilación de Akt en el residuo S473 por parte de mTORC2⁴⁹. Finalmente, Akt fosforila a mTORC1 para inducir la activación y translocación de factores de transcripción responsables de la síntesis de nuevas proteínas esenciales en la biología del macrófago⁵⁰.

La participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la polarización es controversial. Existen reportes que demuestran que la activación de PI3K o Akt regulan de manera negativa la activación inducida por el LPS, restringiendo así las respuestas pro-inflamatorias^{51,52}. En este sentido se ha demostrado que la inhibición de PI3K induce un incremento en la expresión de la sintasa de óxido nítrico y en la activación del factor de transcripción NF- κ B involucrado en la síntesis de citocinas pro-inflamatorias⁵¹. Además, Akt regula a la molécula Let-7e quien suprime la expresión de TLR-4⁵³, mientras que la inhibición de Akt induce la disminución de los genes involucrados en el fenotipo M2^{54,50}. Si bien, estas evidencias muestran la participación de la vía de señalización PI3K/Akt en la polarización M2, se ha demostrado que isoformas de estas moléculas realizan funciones contrarias en la polarización de los macrófagos⁵⁵. Por ejemplo, la activación de PI3K γ y PI3K δ ha sido implicada en la activación de los macrófagos alveolares e involucrada en la transducción de señales pro-inflamatorias⁵⁶. En la línea celular de monocitos THP-1 la subunidad de PI3K, p110 α , es necesaria para la fagocitosis y la secreción de mediadores inflamatorios⁴⁵, mientras que los macrófagos deficientes de la subunidad p85 α muestran defectos en la producción de óxido nítrico y en la

producción de IL-12 en respuesta a la estimulación con LPS e IFN- γ ⁵⁷. En este sentido, también se ha reportado que los macrófagos deficientes de Akt2 poseen un fenotipo semejante al M2 al expresar marcadores como Arg1, Ym1 y Fizz1 además de niveles elevados de IL-10⁵⁵.

A pesar de que se conocen algunas de las moléculas involucradas en la polarización de los macrófagos aún existen muchos mecanismos sin entender. Además, en los tejidos y en los sitios de inflamación, son liberados múltiples estímulos simultáneamente, lo que representa que la adquisición de un fenotipo especializado por parte de los macrófagos, requerirá una respuesta dinámica y específica dependiendo de los estímulos presentes.

LAS INTEGRINAS EN LA FISIOLÓGÍA DE LOS MACRÓFAGOS

La adhesión de los macrófagos es un evento complejo y multiproteico que no solo une los receptores de adhesión al citoesqueleto de actina sino que también integra y regula diversas vías de señalización importantes para la fisiología de las células^{58,59}. Los receptores de adhesión incluyen diferentes familias de moléculas donde las integrinas son las principales involucradas en la adhesión de las células hematopoyéticas⁶⁰.

Las integrinas son receptores transmembranales heterodiméricos $\alpha\beta$ que conectan la matriz extracelular con el citoesqueleto y permiten las interacciones célula-célula⁶¹. Constituyen una gran familia de 24 receptores de adhesión y son conocidas por adoptar conformaciones de baja, intermedia y alta afinidad⁶² (**Figura 4**).

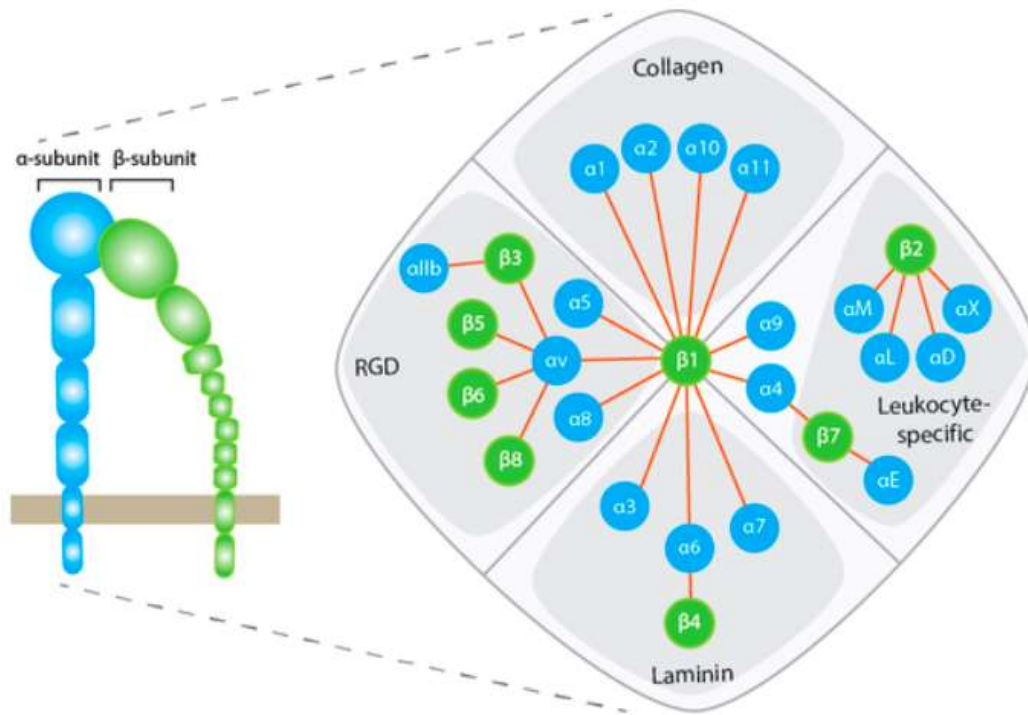


Figura 4. La familia de las integrinas y sus receptors. Las integrinas son receptores heterodiméricos expresados en la superficie celular que se unen a proteínas de la matriz extracelular. Están conformadas por una subunidad α y una subunidad β . En esta imagen se ejemplifican algunas de los heterodímeros y sus ligandos extracelulares. Es importante mencionar que una misma integrina puede tener más de un ligando, lo cual determinará el tipo de respuesta celular evocada. Tomado de <http://www.ivaskalab.com/overview.html>

La unión de las integrinas a sus ligandos permite formar agregados de integrinas, inducir rearrreglos del citoesqueleto, inducir la formación de grandes complejos de adhesión y activar vías de señalización que desencadenan en eventos celulares como la migración y el *spreading*, la proliferación celular y la expresión de genes⁶³.

En los macrófagos, los miembros de la subfamilia $\beta 2$ son expresados abundantemente y permiten la adhesión de estas células al endotelio o a otras células⁶⁴. Sin embargo también se ha reportado la expresión de otras integrinas como las integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 5$ las cuales contribuyen de manera importante en mediar la adhesión, la fagocitosis y las respuestas inflamatorias en los macrófagos⁶⁵⁻⁶⁷. En el caso particular de la integrina $\beta 3$ se ha demostrado su participación en mediar la polarización de los macrófagos hacia un perfil inflamatorio^{32,68}. Antonov y colaboradores demostraron que la integrina $\alpha v\beta 3$, tras la unión a su ligando, regula la activación de los macrófagos y su polarización a través de la vía de señalización PI3K/Akt, la cual induce la activación de NF κ B y como consecuencia la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6⁶⁷. Estos hallazgos fueron comprobados más tarde al demostrarse, en un modelo murino de daño muscular, que la ausencia de la integrina $\beta 3$ induce el infiltrado de macrófagos M2 hacia el tejido dañado. En ensayos *in vitro*, la ausencia de esta integrina disminuyó la expresión de IFN- γ e incrementó la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 así como de la molécula CD206, todos ellos marcadores importantes de los macrófagos M2³². En concordancia con estos descubrimientos, en 2016, Su y colaboradores demostraron experimentalmente que la señalización inducida por la integrina $\beta 3$ favorece la activación de STAT1, factor de transcripción importante en la polarización M1, y suprime la activación de STAT6, molécula que regula la polarización M2, así mismo, al utilizar un inhibidor de la integrina $\beta 3$ se favoreció la diferenciación de los macrófagos hacia un fenotipo M2, demostrando así la participación de esta integrina en la polarización de los macrófagos M1⁶⁹.

Además de estos mecanismos, es posible que la integrina $\beta 3$ utilice otras vías de señalización para regular la polarización de los macrófagos. Por ejemplo, la integrina $\beta 3$, tras su activación, se une a la proteína ILK a través de su dominio citoplasmático⁷⁰. ILK es una proteína de andamiaje con la capacidad de unirse a diferentes proteínas del citoesqueleto como vinculina, paxilina, parvina, PINCH, etc. formando así un complejo molecular encargado de regular diversos procesos celulares al unirse a moléculas de la vía JNK, induciendo la fosforilación de moléculas como Akt o GSK3 β o bien regulando la vías de las GTPasas pequeñas (**Figura 5**)⁷¹⁻⁷³. De tal forma que el mecanismo a través del cual la integrina $\beta 3$ regula la polarización podría ser más complejo que el ya descrito.

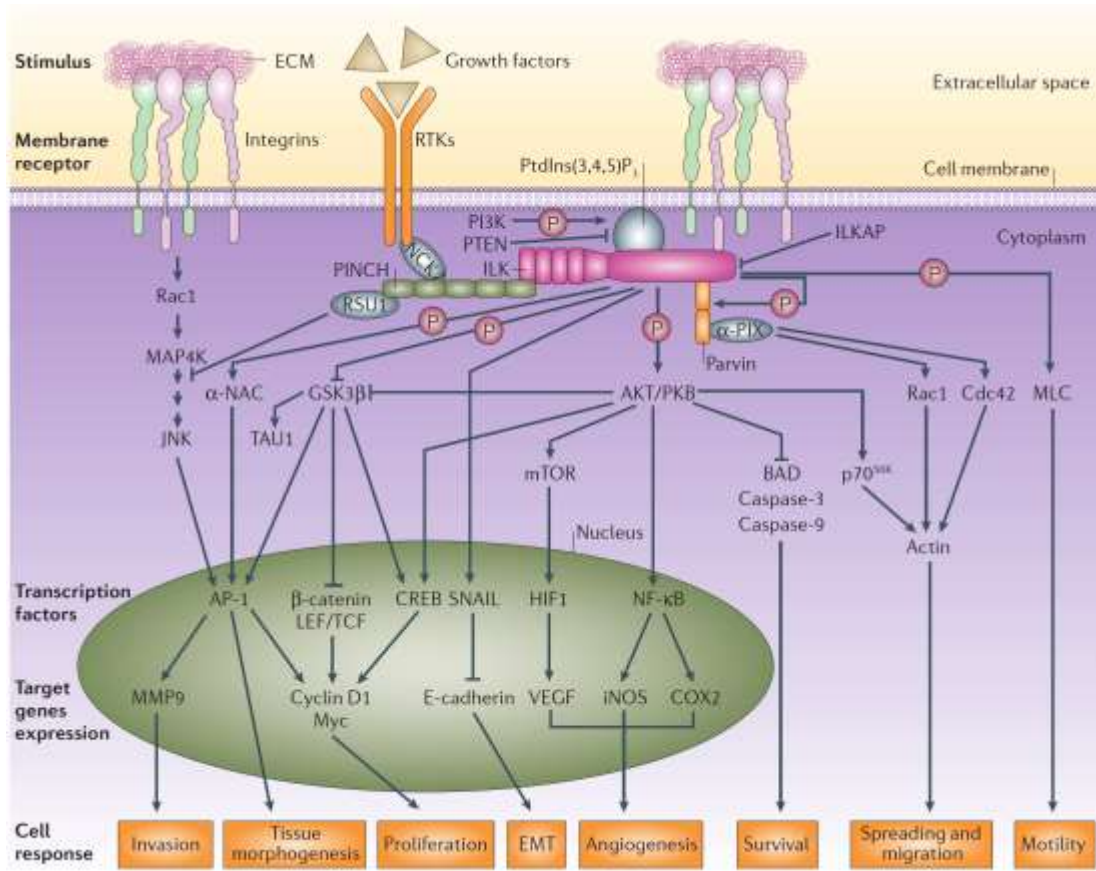


Figura 5. ILK induce la activación de diversas vías de señalización a través de la formación de complejos proteico. ILK es una molécula capaz de interactuar con la proteína PINCH y Parvina para formar el complejo IPP. Este complejo ha sido implicado en el control de diversas vías de señalización a través de inducir la fosforilación de AKT y GSK3 β y por unirse a efectores río arriba de la vía de señalización de JNK y a reguladores de las GTPasas pequeñas. La actividad del complejo está regulada por PI3K, por la fosfatasa de ILK (ILKAP) y por PTEN generando diversas respuestas celulares como la invasión, la morfogénesis de los tejidos, la proliferación, la angiogénesis, la supervivencia, la migración, etc.⁷² Tomado de Legate, K. R., Montañez, E., Kudlacek, O. & Fässler, R. ILK, PINCH and parvin: The tIPP of integrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2006).doi:10.1038/nrm1789.

1.2. LAS MIOSINAS

Las miosinas constituyen unas de las familias de proteínas más grandes y divergentes en las células eucariotas y son los únicos motores moleculares de unión a actina que se conocen⁷⁴. Se han identificado cerca de 40 clases de miosinas clasificadas de acuerdo a la homología de su secuencia de aminoácidos y a la presencia de dominios conservados^{75,76}. Estas proteínas se caracterizan por ser complejos heterodiméricos formados por una o dos cadenas pesadas y un número variable de cadenas ligeras (**Figura 6**)⁷⁷. Las cadenas pesadas están constituidas por un dominio motor, un dominio del cuello y un dominio de la cola (**Figura 7**). El dominio motor se encuentra cerca del extremo amino terminal y constituye un sitio catalítico para la hidrólisis del ATP y la unión al citoesqueleto de actina. El dominio del cuello está constituido por un número variable de motivos IQ que permiten la unión de las cadenas ligeras y sirve como un brazo tipo palanca que permite el movimiento del dominio motor. Finalmente, el dominio de la cola es el responsable de la función específica de cada tipo de miosina ya que posee diversos motivos como regiones de dimerización tipo “coiled-coil”, FERM (dominios de proteínas de la familia de Ezrina, Radixina y Moesina), dominios SH3 para la interacción proteína-proteína sobre regiones ricas en prolina y dominios PH para la interacción con lípidos de la membrana⁷⁸⁻⁸⁰.

Actualmente se sabe que las miosinas están implicadas en una variedad de funciones intracelulares como la migración y la adhesión celular, el transporte y la localización de organelos y macromoléculas, la transducción de señales, la supresión de tumores, la contracción muscular y el mantenimiento de la forma de la célula⁸¹⁻⁸⁴.

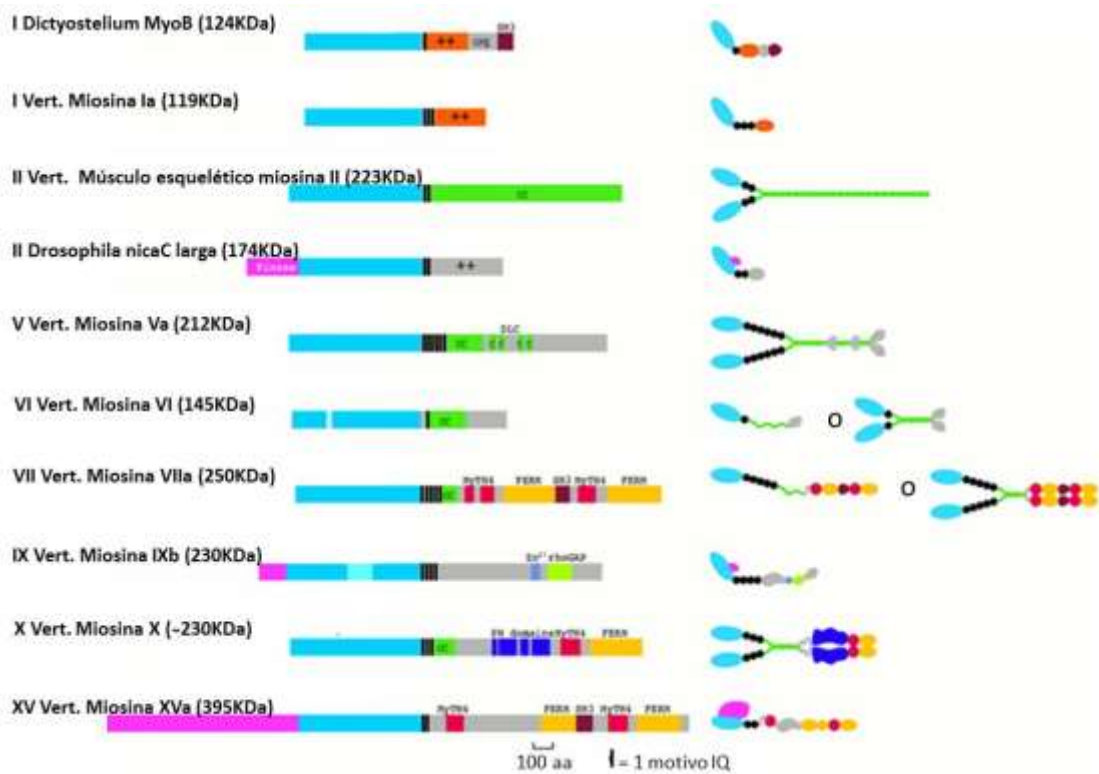


Figura 6. Las miosinas en eucariotes. Representación esquemática de la estructura de la cadena pesada de las diferentes clases de miosinas en vertebrados (vert). Las miosinas de clase VI y VII pueden existir tanto de forma dimérica como monomérica⁷⁷. Tomado de Krendel, M. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology* (2005).doi:10.1152/physiol.00014.2005

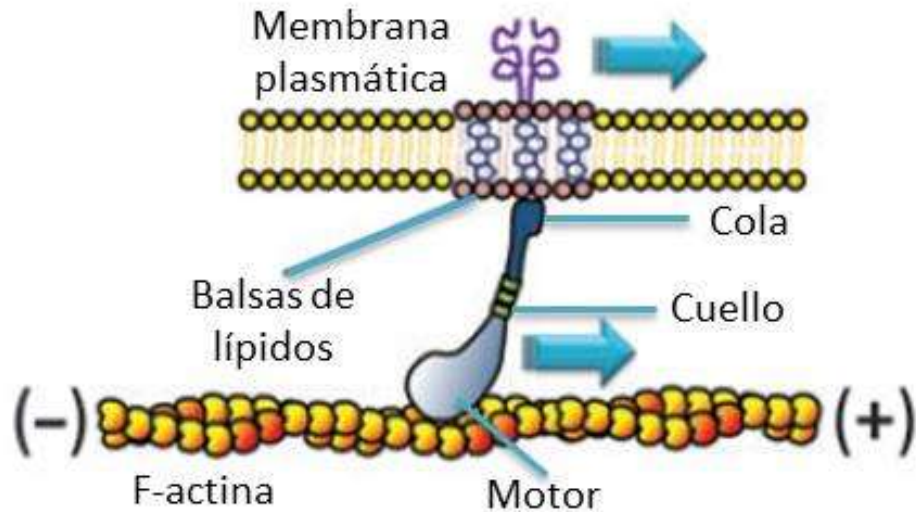


Figura 7. Dominios de las miosinas. Las miosinas están constuidas por 3 dominios; el dominio motor con dominios de unión a actina y a ATP; el dominio del cuello a donde se unen las cadenas ligeras y el dominio de la cola, el cual puede variar en el número de motivos según el tipo de miosina permitiendo la interacción con la membrana plasmática y con otras proteínas⁷⁹.

1.3. LAS MIOSINAS DE CLASE I

Las miosinas de clase I son motores moleculares monoméricos que no forman filamentos con un peso molecular de 110 a 140 kDa⁸⁵. Su dominio motor está constituido por 700 aminoácidos con un tamaño de 80kDa aproximadamente. El siguiente dominio es el del cuello, el cual es una alfa hélice que contiene uno o más tramos de 29 aminoácidos con la secuencia consenso IQXXXRGXXXR, denominada motivos IQ. El número de motivos IQ difiere entre las miosinas de clase I. En la región carboxilo terminal se encuentra el dominio de la cola, el cual se divide en 3 motivos, TH1, TH2 y TH3. El motivo TH1 está conformado por aminoácidos básicos y permite la interacción con fosfolípidos de la membrana. El motivo TH2 es una región rica en glicina, prolina y alanina/glutamina que posee un sitio de unión a actina o a microtúbulos y finalmente, el dominio TH3 es un dominio de homología a Src 3 (SH3) común para proteínas involucradas en la transducción de señales, la

dinámica de actina y el tránsito de la membrana⁸⁶ Se ha reportado que este dominio SH3 en Myo3p y Myo5p de levadura puede interactuar con Bee1p/Las17p y Vrp1p que son homólogos de las proteínas WASP y WIP encontradas en humanos, así como con el complejo de nucleación de actina Arp2/3. Por otra parte, en *Dictyostelium* el dominio SH3 interactúa con CARMIL quien media la interacción entre las miosinas de clase I y el complejo Arp2/3, lo cual sugiere que las miosinas que poseen este dominio SH3 podrían tener una función como proteínas remodeladoras del citoesqueleto de actina⁸⁷.

En humano y en ratón existen ocho genes que codifican para miosinas de clases I, seis de los cuales codifican para formas de cola corta (poseen un dominio TH1) como Myo1a, Myo1b, Myo1c, Myo1d, Myo1g y Myo1h y dos genes más codifican formas de cola larga (poseen tres dominios TH) como Myo1e y Myo1f (**Figura 8**)⁸⁸.

Estas miosinas participan en el transporte intracelular, la formación de proyecciones de superficie, la regulación del citoesqueleto y la regulación de eventos como la exocitosis, endocitosis y fagocitosis⁸⁶.

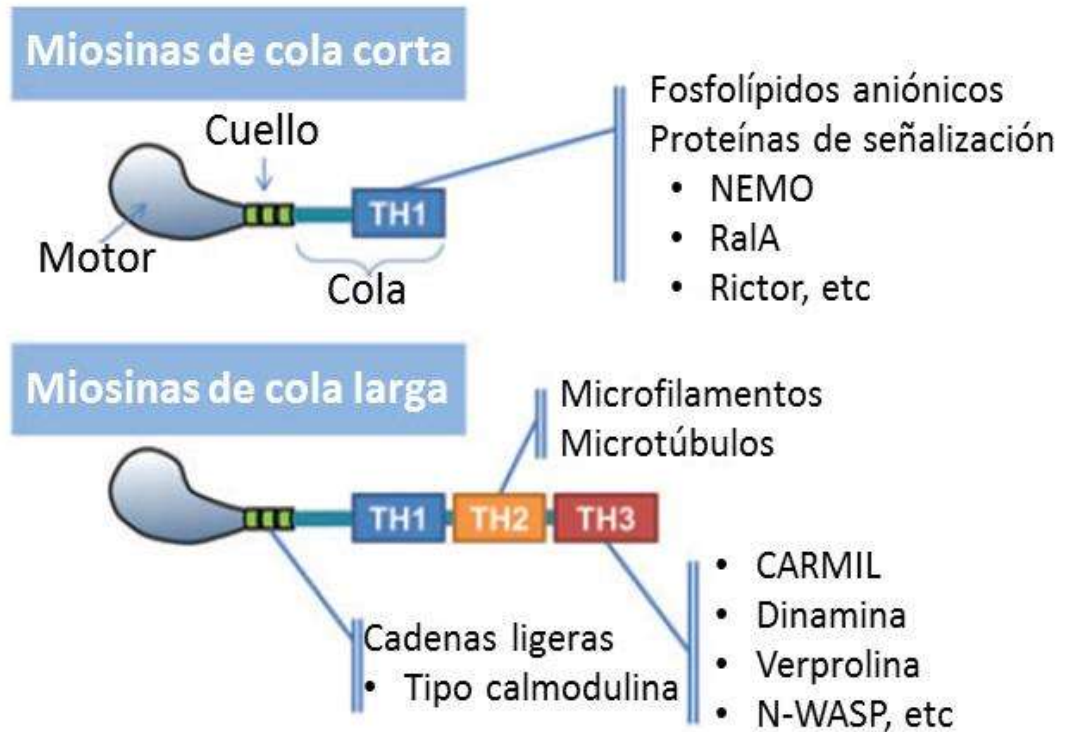


Figura 8. Diferencias entre las miosinas de cola corta y miosinas de cola larga. Las miosinas de cola corta poseen solo un dominio de la cola (TH1) que permite su asociación con la membrana plasmática, mientras que las miosinas de cola larga tienen 2 dominios adicionales TH2 y TH3 que permiten la interacción con diversas proteínas⁸⁵.

1.3.1 La Miosina 1F

La Miosina 1F (Myo1F) es una miosina de cola larga, caracterizada inicialmente a partir de una genoteca de cDNA de un órgano auditivo de ratón (cóclea) y a partir de este trabajo se determinó el gen ortólogo en humano, así como su localización⁸⁹. La *Myo1f* en ratón, se encuentra localizada en el cromosoma 17 17.98cM, mientras que en humano se encuentra en 19p13.2-13.3, teniendo 28 exones y codificando una proteína de 1098 aminoácidos con un dominio de la cabeza en el N-terminal, un dominio del cuello con un solo motivo IQ y una cola con dominios TH1, TH2 y SH3^{89,90}. La *Myo1f* se expresa en órganos como el bazo, los ganglios linfoides mesentéricos, el timo y el

pulmón, así como en neutrófilos, células dendríticas, macrófagos y células *natural killer*, a nivel de RNA mensajero⁸⁸.

Actualmente se conoce muy poco sobre la función de Miosina 1F. Se ha reportado que esta proteína se encuentra localizada cerca de la membrana citoplasmática en la línea celular COS-7 y que puede tener interacción con ella al unirse a fosfoinosítidos como PI(3,4,5)P3, PI(4,5)P2 y en menor proporción a PI(3,4)P2⁹¹. Así mismo se demostró que el dominio IQ, más la región de la cola, son los dominios indispensables para que esta miosina pueda tener interacción con la membrana⁸⁰.

Los neutrófilos son las células del sistema inmune donde se ha descrito de manera más extensa la función de la miosina 1F. En ausencia de esta miosina, los neutrófilos expresan altos niveles de integrinas $\beta 2$ en la membrana, lo que tiene como consecuencia un incremento en la adhesión celular e importantes defectos en la migración⁸⁸. Sin embargo, el mecanismo a través del cual la Myo1F realiza esta función no ha sido descrito. Recientemente fue publicado que la participación de la miosina 1F en la migración de los neutrófilos podría implicar un mecanismo más complejo que el descrito sólo a través de las integrinas, ya que se demostró que esta miosina es indispensable para la extravasación de los neutrófilos durante un proceso inflamatorio, donde podría estar participando en permitir la deformación celular o nuclear, necesaria para la transmigración de los neutrófilos a través de espacios pequeños en el organismo ⁹².

A pesar de que no se conocen con certeza las funciones de la miosina 1F en las células del sistema inmune, es posible pensar que esta proteína realiza funciones muy específicas dada su expresión restringida a ciertas estirpes celulares y dado que se ha reportado su posible contribución durante contextos inmunológicos tan específicos como la inflamación. En este sentido, ha sido reportado que la Myo1F, en macrófagos, puede ser blanco de fosforilación en su dominio de la cola tras la estimulación con LPS⁹³, lo que sugiere un posible mecanismo de regulación funcional.

II. JUSTIFICACIÓN

Los monocitos son células de origen mieloide que se reclutan a los tejidos y se diferencian a macrófagos los cuales pueden presentar características pro-inflamatorias o anti-inflamatorias dependiendo del contexto fisiopatológico en el que se encuentren. Actualmente se sabe que moléculas como las integrinas podrían estar participando en esta polarización, sin embargo, los mecanismos moleculares exactos que regulan la adquisición de estos fenotipos son desconocidos.

La miosina 1F es una miosina no convencional que se expresa principalmente en células de origen mieloide y se le ha atribuido una participación en la regulación de las integrinas, en la adhesión y en la migración de los neutrófilos. No obstante, la función que realiza en la fisiología de los macrófagos no se ha investigado. Por lo tanto, en este trabajo nos dimos a la tarea de investigar si la miosina 1F tiene una función relevante en la polarización de los macrófagos.

III. HIPÓTESIS

La miosina 1F regula positivamente la polarización de los macrófagos pro-inflamatorios a través de la activación de las vías de señalización río debajo de las integrinas.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación de Myo1f en la polarización de los macrófagos.

Objetivos particulares

1. Evaluar las propiedades de adhesión de los macrófagos pro y anti-inflamatorios.
2. Analizar la participación de la miosina 1F en la adhesión de los macrófagos.
3. Investigar la participación de la miosina 1F en polarización de los macrófagos.
4. Identificar el mecanismo molecular a través del cual la miosina 1F regula la polarización de los macrófagos.
5. Analizar el efecto de la ausencia de la miosina 1F en un modelo de inflamación crónica o aguda.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales empleados

Para la realización de este trabajo se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 silvestres y deficientes de la miosina 1F de 6 a 8 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en condiciones estándar de ciclos diurnos/nocturnos con libre acceso a alimento y agua. Todos los animales fueron producidos en el bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN). Todos los procedimientos con estos animales se ajustaron al reglamento del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Consideraciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio".

Genotipificación de ratones deficientes de la miosina 1F

Extracción de DNA

Se utilizó tejido de la oreja de ratones para extraer el DNA. Se colocó el tejido en 75µL de buffer de lisis alcalina (NaOH 25mM, EDTA 0.2mM, pH12) y se calentó a 95°C durante 30 minutos, posteriormente se enfrió a 4°C durante 10 minutos y finalmente se le adicionaron 75µL de buffer de neutralización (Tris-HCl 40mM, pH 5). El DNA obtenido se cuantificó empleando un espectrofotómetro.

Reacción de PCR

Los ratones deficientes de miosina 1f fueron genotipificados utilizando la reacción de PCR, para lo cual se utilizaron 200ng de DNA y los siguientes iniciadores:

- 1.- Sentido: CATGTGCATTTACATACACCAC
- 2.- Anti-sentido: CTGAGAGTGTTTGCTTCTCTA
- 3.- Anti-sentido: CTCAGCACATTTTCAGAAATTTC

Las condiciones para la reacción de PCR fueron:

	94°C	2 min	
}	94°C	30 seg	35 ciclos
	57°C	30 seg	
	72°C	2:14 min	
	72°C	5 min	
	4°C	∞	

El producto esperado como resultado de la reacción, al utilizar los iniciadores 1 y 2 es de 665pb, al utilizar DNA del ratón silvestre, y la ausencia de amplificado para el DNA del ratón deficiente de Myo1F. Para el par de iniciadores 1 y 3 se espera una banda de 2224 pb para el ratón silvestre y 570pb para el ratón deficiente de miosina 1F.

Líneas celulares y macrófagos diferenciados de médula ósea

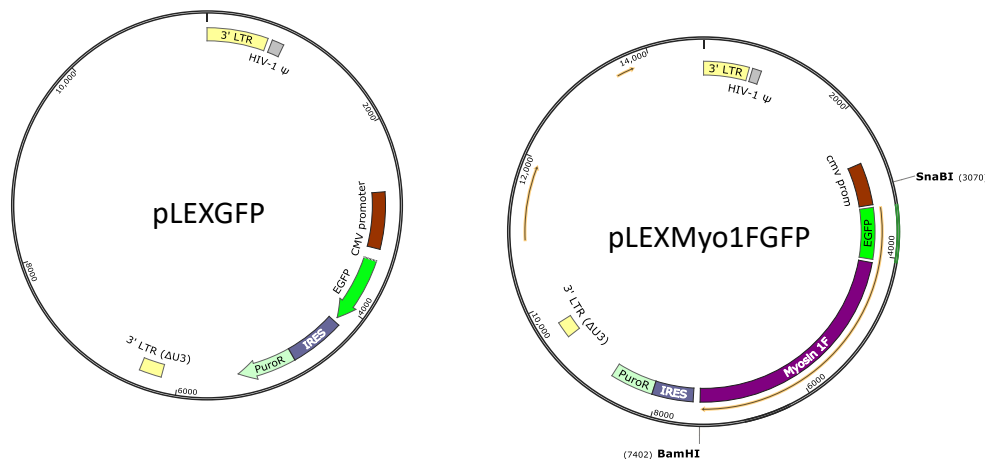
Las líneas celulares de macrófagos J774 y Raw264.7 se cultivaron en el medio DMEM F-12+glutaMAX (Gibco, NY, Estados Unidos) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (biowest, Mi, Estados Unidos) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, Estados Unidos).

La generación de los macrófagos diferenciados a partir de monocitos de médula ósea se realizó como previamente fue descrito (REF). 4×10^6 células se sembraron en cajas de plástico estériles tratadas para cultivo de 6 pozos y se cultivaron en medio DMEM F-12 suplementado con 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina y GM-CSF (20ng/ml) (Millipore, Ma, Estados Unidos). Las células fueron lavadas dos veces con PBS los días 2, 4 y 6 de la diferenciación para eliminar las células en suspensión y se adicionó medio nuevo suplementado con GM-CSF a la concentración inicial. Los macrófagos se diferenciaron por 7 días. Para inducir la polarización, se estimularon por 24h con LPS (1 μ g/ml) (Sigma, Mi, Estados Unidos) + IFN- γ (20ng/ml) para el

fenotipo M1 y con IL-4 (20ng/ml) (Peprotech, NJ, Estados Unidos) para el fenotipo M2.

Generación del vector lentiviral y transducción celular.

El gen de la miosina 1F se amplificó a partir de cDNA obtenido de macrófagos reclutados a la cavidad peritoneal por 4 días con tioglicolato al 1% y se clonó en el vector pEGFP-C1 (Addgene, Ma, Estados Unidos) usando los siguientes iniciadores: F-5'-gtcgacatgggcagagcgctttcact-3' y R-5'-ggatcctcagatccatagtttctgg-3'. A continuación, se subclonó la Myo1F-GFP en el vector pLEX (Addgene, Ma, Estados Unidos) usando los sitios de restricción: SnaBI y BamHI. Las partículas lentivirales para la transducción se produjeron usando el Trans-Lentiviral Packing System cat. # TPL5912 (Dharmacon, Co, Estados Unidos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células positivas fueron seleccionadas con puromicina (10µg/ml).



Mapa de los plásmidos lentivirales pLEXGFP y pLEXMyo1FGFP

Aislamiento de células de colon y citometría de flujo.

Las células del colon se aislaron y se tiñeron para citometría de flujo como se describió previamente⁹⁴. Las células del sistema inmunológico se identificaron de la siguiente manera: macrófagos, CD45⁺, IAb⁺, Cd11b⁺, F4/80⁺; células dendríticas, Cd45⁺, IAb⁺, Cd11c⁺, CD103⁺ y monocitos, CD45⁺, CD11b⁺,

Ly6C⁺, Gr1⁻. El ensayo de citometría de flujo se realizó en el citómetro Cyto FLEX (Beckman-Coulter, Ca, Estados Unidos) y se analizó con el software CytExpert (Beckman-Coulter, Ca, Estados Unidos).

Ensayo de agregación celular.

Los macrófagos diferenciados de la médula ósea y las líneas celulares transducidas, Raw264 y J774, fueron colectadas y resuspendidas en medio DMEM F-12 sin suero. La suspensión celular fue colocada en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml pre-incubados con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% y agitados en un agitador rotatorio durante 45 minutos a 37°C. Dependiendo del experimento se adicionó un inhibidor de la integrina β 3 (Cilegitide trifluoroacetic acid salt, Sigma-Aldrich, CA, Estados Unidos cat. #SML1594) a una concentración de 1 μ M o vitronectina (Advanced BioMatrix, Ca, Estados Unidos, cat. #5051) a 1.5 μ g/ml. El ensayo de agregación se finalizó adicionando glutaraldehído 2% (vol/vol). Las células agregadas fueron observadas por microscopía.

Anticuerpos y reactivos.

Los anticuerpos primarios fueron los siguientes:

Anticuerpos/ Reactivos	No. Cat.	Concentración de uso	Compañía
Myo1F	HPA055242	WB: 1/1000	Sigma-Aldrich, MI, Estados Unidos
GAPDH	Sc-322	WB: 1/5000	Santa Cruz Biotechnology®, CA, Estados Unidos
pSTAT1-Tyr701	9167	WB/IF: 1/2000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
pSTAT1-Ser727	9177	WB: 1/2000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
pSTAT3-Tyr705	9145	WB/IF: 1/2000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
pSTAT3-Ser727	94994	WB: 1/2000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
STAT1	9176	WB: 1/2000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
STAT3	9139	WB: 1/2000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
pAkt-Ser473	4060	WB: 1/2000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
Akt1	2967	WB: 1/2000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
E- Caderina	3195	IF: 1/500	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
Integrina β 3	13166	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
NLRP3	15101	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
IL-1 β	12703	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
Caspasa 1	3866	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
iNOS	13120	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
Arginasa 1	93668	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
pSTAT6	56554	WB: 1/1000	Cell Signaling Technology, MA, Estados Unidos
ILK	MABT66	WB: 1/1000	Millipore, MA, Estados Unidos
Integrina α V	SC-6617	WB: 1/250	Santa Cruz Biotechnology®, CA, Estados Unidos
Anti-conejo AF594	A-11037	IF: 1/1000	Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos
Anti-conejo HRP	111-035-144	IF: 1/10000	Jackson ImmunoResearch, Pe, Estados Unidos
Anti-ratón HRP	115-035-003	IF: 1/10000	Jackson ImmunoResearch, Pe, Estados Unidos
DAPI	SC-3598	IF: 1/1000	Santa Cruz Biotechnology®, CA, Estados Unidos

El IFN- γ recombinante de ratón (Peprotech, NJ, Estados Unidos) se disolvió en albúmina sérica de ratón al 0.002% (MSA; Sigma-Aldrich, CA, Estados Unidos) y se usó a 2.5 μ g/kg de peso de ratón. Se disolvió el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0111: B4 (Sigma-Aldrich, CA, Estados Unidos) en albúmina sérica de ratón al 0.002% y se utilizó a 100 μ g/ratón. AZD8055 ((5-{2,4-Bis [(3S) -3-metilmorfolin-4-il] pirido [2,3-d] pirimidin-7-il} -2-metoxifenil)

metanol) de Aztra Zeneca se disolvió en DMSO y uso a 20nM. El dextrán sulfato de sodio (DSS) cat. # YD318041799 (Carbosynth, Compton, Inglaterra) se disolvió al 2,5% en agua corriente. El inhibidor cdp22 (Millipore, Ma, Estados Unidos) se disolvió en DMSO y se utilizó a una concentración de 4 μ M. El inhibidor ciligentide (Sigma-Aldrich, CA, Estados Unidos) se disolvió en PBS y se utilizó a una concentración de 1 μ M.

Inducción de la colitis con DSS

Para la inducción de la colitis se utilizaron ratones machos de 6 semanas de edad, silvestres y deficientes de la miosina 1F. Los ratones se sometieron a un proceso de ambientación, durante el cual bebieron agua purificada por 4 días. Al término de este periodo se les dio a beber DSS al 2.5% disuelto en agua purificada (ad libitum) por 5 días. Durante todo el tratamiento los ratones fueron pesados diariamente, se analizó la consistencia de las heces y la presencia de sangre en las heces con la finalidad de determinar el índice de actividad de la enfermedad. Al concluir el tratamiento los animales fueron sacrificados y se extrajo el colon para realizar diferentes experimentos (Western blot, H&E, Inmunofluorescencia, análisis de citocinas, etc).

El ensayo de recuperación de la enfermedad consistió en inducir la colitis con DSS como previamente se describió, pero utilizando DSS al 2%. Al término del quinto día de tratamiento se les retiró el DSS y se les dio a beber agua purificada por 10 días más. Finalmente se extrajo el colon y se procedió a realizar los experimentos.

Inmunofluorescencia e histología

Los experimentos de inmunofluorescencia e histología de la mucosa de colon, se realizaron como se describió previamente⁹⁵. Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron en células cultivadas en insertos de filtro transparente (cámara transwell) o en secciones de tejido de 20 μ m. La fijación se llevó a cabo con PFA al 4% y la permeabilización con metanol al 100% a -20°C durante 20 minutos. Las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Las imágenes se tomaron en un microscopio

confocal LSM 510 (Zeiss). La tinción de H&E se realizó como se describió previamente⁹⁶.

Cuantificación de la secreción de citocinas.

La liberación de citocinas se cuantificó utilizando el kit LEGENDplex (BioLegend, Ca, Estados Unidos, cat. #740150) en sobrenadantes obtenidos de cultivos celulares o de explantes de colon. La cuantificación de IL-1 β e IL-6 se cuantificó mediante ensayos de ELISA (BioLegend, Ca, Estados Unidos, cat. #432605 y cat. #431305).

Western blot

Para el Western blot, las muestras se recolectaron en el amortiguador RIPA (NaCl 150mM, EDTA 5mM, NP-40 1%, Deoxicolato de sodio 1%, Tritón X100 1%, SDS 0.1% y Tris-HCl pH7.6 25mM) y se sonicaron para posteriormente centrifugar por a 14,000 rpm por 10min. El sobrenadante que contiene las proteínas se cuantificó utilizando el ensayo de cuantificación BCA (ThermoFisher, Ma, Estados Unidos). Una cantidad igual de proteína se utilizó para realizar electroforesis en geles de poliacrilamida, los geles fueron corridos a 80V durante 2h. Al término de la electroforesis, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Ca, Estados Unidos) durante 1.5 horas a 120V en un amortiguador de Towbin (Glicina 193mM, Tris base 25mM, metanol 20% v/v), después la membrana se bloqueó con TBS-Tween 1.5% (TBS-T) conteniendo leche descremada a una concentración del 1% durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, la membrana se incubó con los anticuerpos correspondientes durante toda la noche a 4°C en agitación. Terminada la incubación, la membrana se lavó 3 veces con TBS-T, y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a HRP durante 1 hora en agitación. Terminada esta incubación la membrana se lavó 6 veces con PBS-T. Finalmente se procedió a revelar la membrana por quimioluminiscencia utilizando el equipo ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Ca, Estados Unidos).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con Prism 6.0 (GraphPad Software, Ca, Estados Unidos). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía y prueba t de Student de dos colas, una $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa.

VI. RESULTADOS

La integrina $\beta 3$ participa en la adhesión intercelular de los macrófagos M1.

En el intestino, al igual que en otros tejidos, los macrófagos mantienen la homeostasis⁹⁷. Sin embargo, bajo condiciones de inflamación una gran cantidad de monocitos son reclutados hacia el intestino donde se diferencian a macrófagos secretores de mediadores inflamatorios¹⁴. Teniendo esto en mente, decidimos analizar la presencia de macrófagos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios en el colon de los ratones control y de los ratones a los cuales se les indujo colitis con DSS por 5 días. Mediante microscopía confocal, pudimos observar que en condiciones control o de homeostasis, los macrófagos se encontraban localizados alrededor de las criptas formando una línea muy definida. Por el contrario, durante la colitis los macrófagos mostraron una forma tipo epitelial y formaron agregados bajo el epitelio (**Figura 9A**). Estos resultados nos sugirieron que los macrófagos pro y anti-inflamatorios mostraban diferentes propiedades de adhesión en el colon. Por tal motivo, analizamos las propiedades de adhesión de los macrófagos diferenciados de médula ósea polarizados a los fenotipos M1 y M2. Como se esperaba⁹⁸, los macrófagos M1 (IFN- γ /LPS) mostraron una morfología aplanada con largas prolongaciones. En contraste, los macrófagos polarizados a M2 con IL-4 fueron principalmente esféricos y algunos mostraron pequeñas prolongaciones (**Figura 9B**). Además, en un ensayo de adhesión en suspensión los macrófagos M1 formaron grandes agregados, mientras que los macrófagos M2 permanecieron principalmente como células independientes (**Figura 9C**). Debido a que se ha reportado la participación de la integrina $\beta 3$ en la polarización de los macrófagos, analizamos la expresión de esta integrina y pudimos evidenciar que la adhesión observada en los macrófagos M1 estuvo mediada por un aumento en la expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ (**Figura 9D**). En conjunto estos resultados sugieren que los macrófagos M1 presentan

importantes propiedades de adhesión intercelular que probablemente se encuentran ausentes en los macrófagos M2.

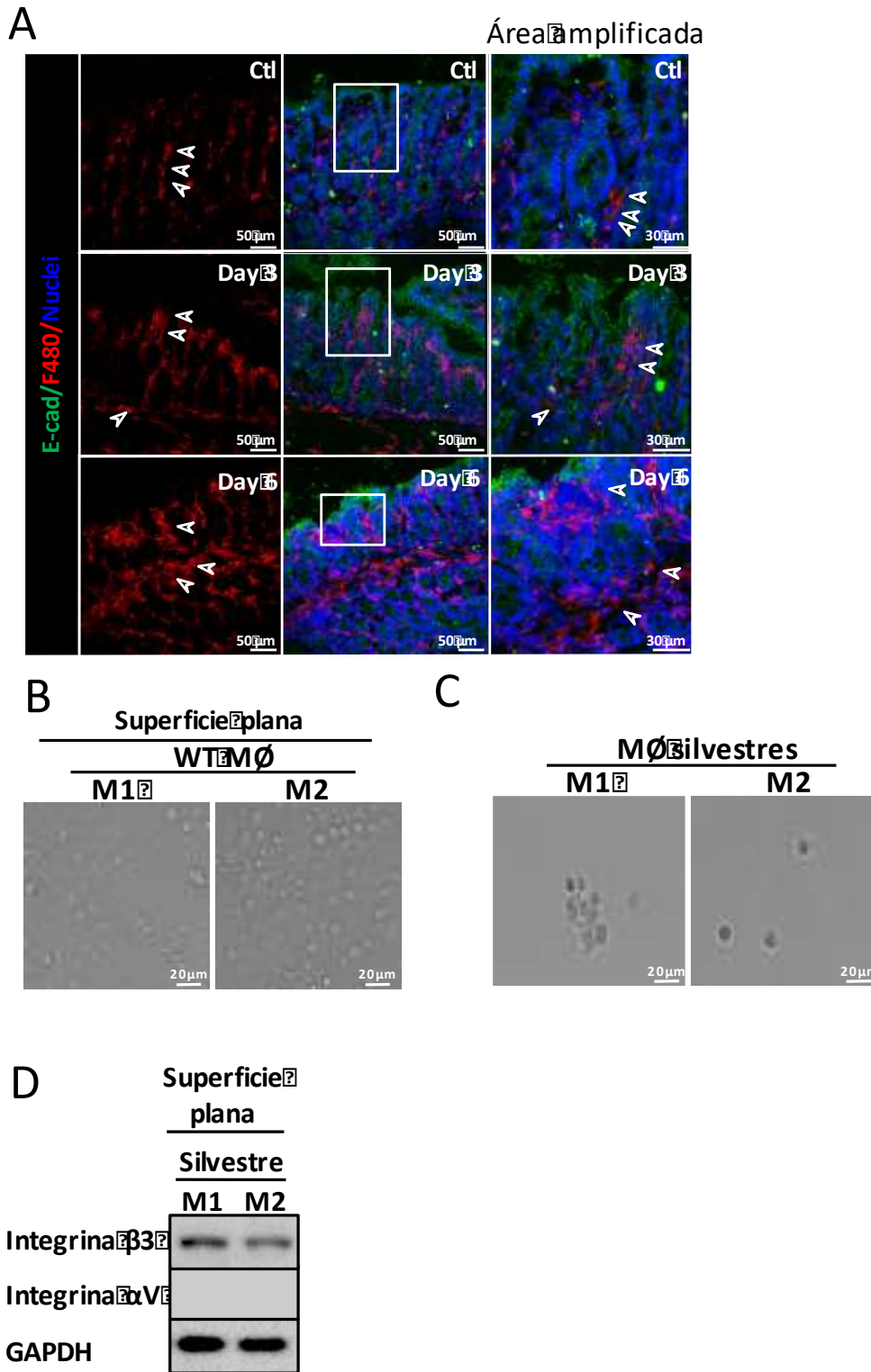


Figura 9. La integrina $\alpha v \beta 3$ media las propiedades de adhesión intercelular de los macrófagos M1.

(A) Tinción de inmunofluorescencia representativa para E-caderina (verde) y F4/80 (rojo) en la mucosa del colon de los ratones C57BL/6J a los cuales se les indujo colitis. Los macrófagos en el epitelio del colon fueron identificados como células F4/80⁺ y las células epiteliales fueron definidas por la expresión de E-caderina. La colitis fue inducida por la administración de DSS al 2.5% disuelto en agua. Los animales control recibieron agua sola. El núcleo fue teñido con Dapi (azul). Barra= 50 μ m. Las flechas blancas definen el área con presencia de macrófagos. Se muestran imágenes amplificadas de las áreas marcadas con un rectángulo blanco. Barra= 30 μ m. n=10

(B) Imágenes en campo claro de BMM polarizados al fenotipo M1 o M2 sobre superficies planas. Barra=30 μ m. n=5

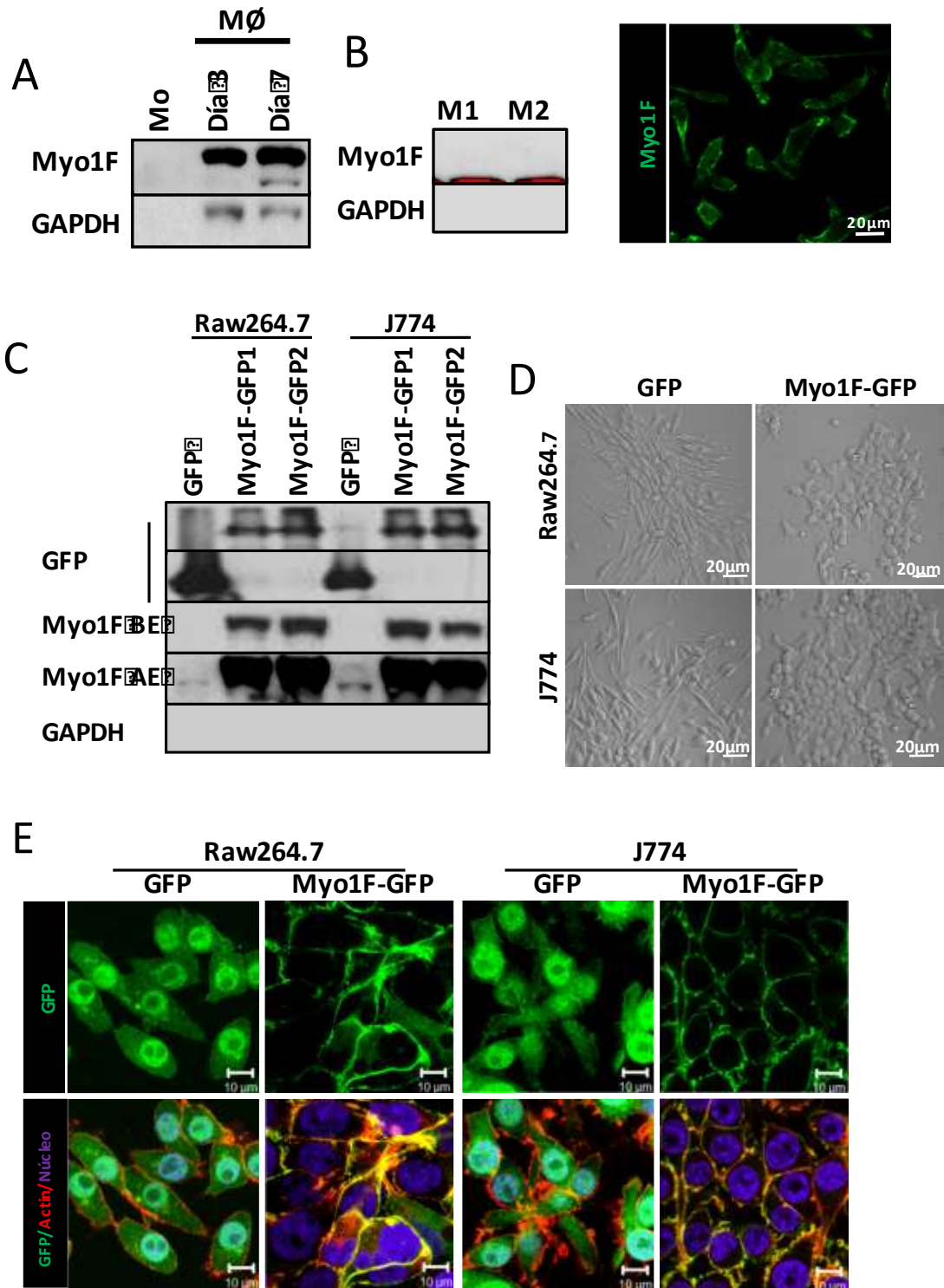
(C) Imágenes en campo claro de BMM polarizados al fenotipo M1 o M2 en suspensión. Barra=30 μ m. n=5

(D) Western blot para las integrinas αv y $\beta 3$ realizado en lisados de BMM obtenidos de ratones C57BL/6J que fueron polarizados a M1 o M2 como se describe en materiales y métodos. GAPDH fue usado como control de carga.

La miosina 1F participa en la adhesión intercelular mediada por la integrina $\alpha v \beta 3$ en los macrófagos

Las modificaciones del citoesqueleto y la localización de las integrinas son importantes para regular la adhesión celular y se sabe que las miosinas también realizan una función muy importante en estos procesos⁹⁹⁻¹⁰¹. Teniendo esto en mente, investigamos cómo la miosina 1F (Myo1F) se encontraba expresada durante la diferenciación de los macrófagos. Como se muestra en la **figura 10A**, se observó un incremento en la expresión de la Myo1F en monocitos diferenciados a macrófagos. Además, observamos un incremento en los niveles de expresión de esta proteína en los macrófagos que fueron polarizados al fenotipo M1 en comparación con los macrófagos M2 (**Figura 10B**). Esta expresión de la Myo1F en los macrófagos M1 fue observada en el borde celular. Con estos datos nosotros hipotetizamos que la presencia de la miosina 1F podría estar relacionada con los cambios observados en las propiedades de adhesión de los macrófagos M1. Para comprobar esta idea, analizamos las propiedades adhesivas de dos líneas

celulares de macrófagos, J774 y Raw264.7, las cuales fueron establemente transducidas con la proteína Myo1F-GFP o GFP. Por western blot, observamos grandes cantidades de la miosina 1F en las células transducidas con la proteína Myo1F-GFP, sin embargo, también detectamos niveles basales de esta proteína en las células transducidas con GFP (**Figura 10C**). Como se muestra en la **figura 10D** las células que expresan GFP mostraron una morfología alargada y se observaron adheridas a lo largo de toda la superficie de la placa de cultivo. Por el contrario, las células que expresaban Myo1F-GFP presentaron una morfología tipo “epiteloide” y se observaron formando pequeñas colonias que asemejan a lo reportado para células epiteliales¹⁰². En el análisis de microscopía confocal fue posible demostrar que la Myo1F se localiza en el borde de las células mientras que la proteína GFP se observó enriquecida en el citosol y en el núcleo celular (**Figura 10E**). Además, como se muestra en la **figura 10F**, la sobre expresión de la miosina 1F indujo un incremento en la expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ en ambas líneas celulares, Raw264.7 y J774. A continuación, realizamos un ensayo de adhesión intercelular y pudimos demostrar que la sola sobreexpresión de la Myo1F resultó en la formación de grandes agregados formados por más de 15 células Raw264.7. En contraste, las células Raw264.7 GFP se observaron principalmente como células aisladas o formando pequeños agregados de 8 a 10 células (**Figura 10G**). Para demostrar que la adhesión intercelular observada era mediada por la integrina $\beta 3$, utilizamos un inhibidor funcional de esta integrina (cilengitide) o vitronectina monomérica soluble durante los ensayos de adhesión. Observamos que ambos tratamientos redujeron la agregación celular inducida por la Myo1F e indujeron una reducción en la expresión de la integrina $\beta 3$, sin embargo, no se observaron cambios en la integrina αv (**Figura 10H y 10I**). Así, nuestros resultados sugieren que la miosina 1F regula positivamente la adhesión intercelular en los macrófagos a través de la integrina $\alpha v \beta 3$.



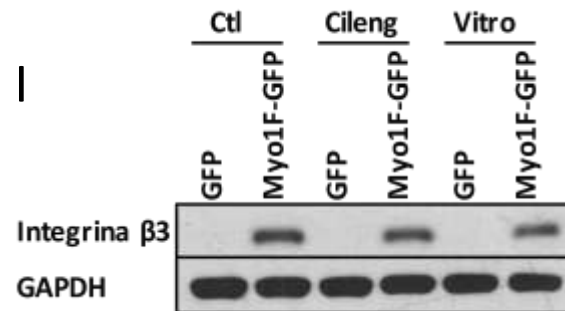
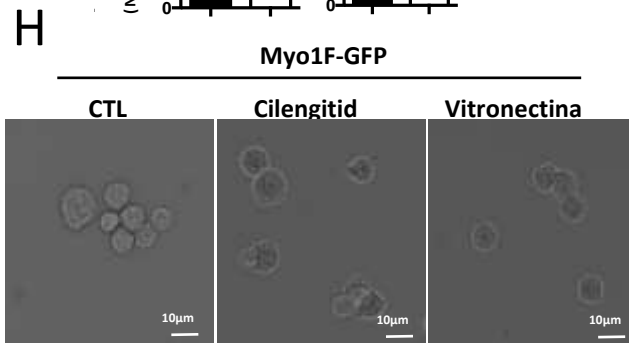
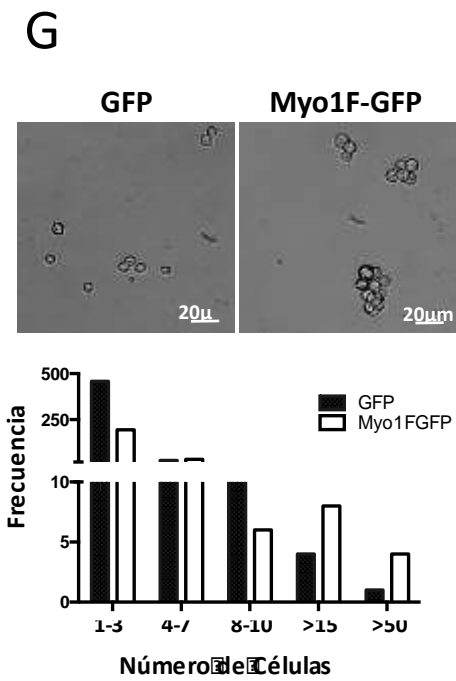
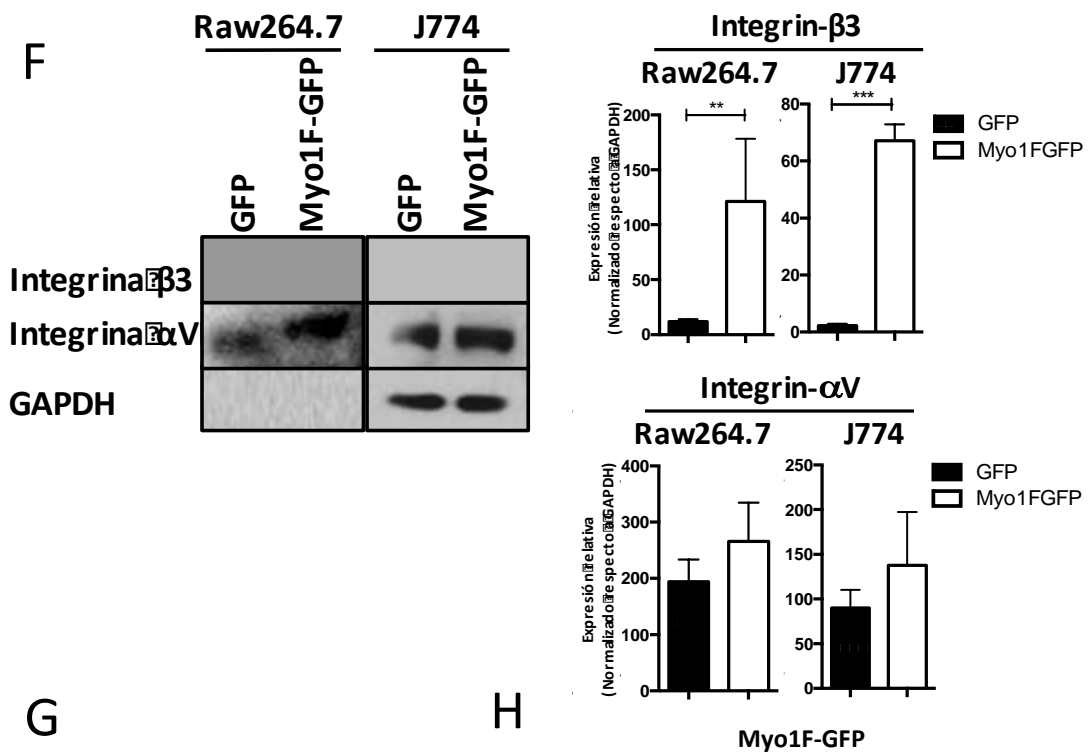


Figura 10. La miosina 1F incrementa la adhesión intercelular mediada por la integrina $\alpha v \beta 3$ en los macrófagos.

(A) Los monocitos (Mo) fueron obtenidos de la médula ósea de los ratones C57BL/6J y diferenciados a macrófagos como se describe en materiales y métodos. La expresión de la miosina 1F fue analizada por western blot. GAPDH fue utilizado como control de carga. n=3

(B) Panel izquierdo: La expresión de la Myo1F fue analizada por western blot en lisados celulares de BMM obtenidos de ratones C57BL/6J y diferenciados a los fenotipos M1 y M2. GAPDH fue utilizado como control de carga. Panel derecho: la tinción de inmunofluorescencia para la miosina 1F (verde) se realizó en los macrófagos M1 obtenidos de ratones C57BL/6J. n=3

(C) La expresión de la miosina 1F y la GFP se analizó por western blot a partir de lisados celulares de las células Raw264.7 y J774 que sobre expresan Myo1F-GFP o GFP. Los macrófagos fueron transducidos como se describe en la sección de materiales y métodos. GAPDH se utilizó como control de carga. BE= baja exposición. AE= alta exposición. n=5

(D) Imágenes en campo claro de las células Raw264.7 y J774 que sobre expresan Myo1F-GFP o GFP. Barra= 20 μ m. n=5

(E) La localización de la miosina 1F fue evaluada por microscopía confocal en células transducidas que sobre expresan la Myo1F-GFP o el control GFP. GFP= verde. Actina= rojo. Núcleo= azul. Barra= 10 μ m. n=5

(F) La expresión de las integrinas αv y $\beta 3$ se analizó por western blot a partir de lisados de células Raw267.7 y J774 que sobre expresan Myo1F-GFP o GFP. GAPDH se utilizó como control de carga. El análisis densitométrico obtenido de estos resultados se muestra como gráficas. * $p=0.05$, ** $p=0.01$, *** $p=0.0005$, **** $p<0.0001$.

(G) El ensayo de adhesión celular se realizó con las células Raw264.7 que sobre expresan a la Myo1F-GFP o GFP. En campo claro se muestran imágenes representativas del ensayo. Las células fueron mantenidas en suspensión por 30 minutos, en medio sin suero y con agitación suave. Barra= 20 μ m. n=5. Se muestra una representación gráfica del resultado del ensayo de adhesión celular.

(H) El ensayo de adhesión celular se realizó con las células Raw264.7 que sobre expresan a la Myo1F-GFP o GFP en presencia del inhibidor cilengitide o la vitronectina. En campo claro se muestran imágenes representativas del ensayo. Barra= 10 μ m. n=3

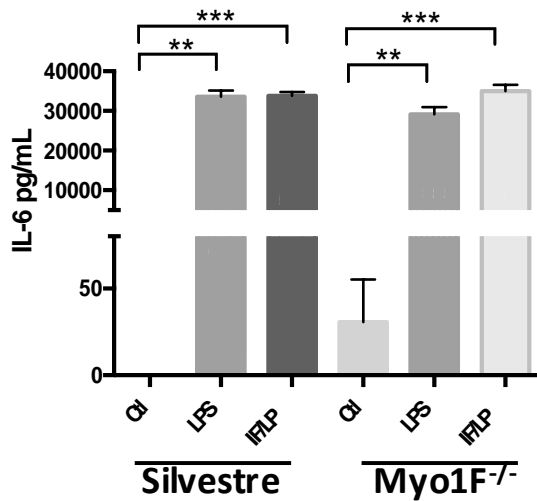
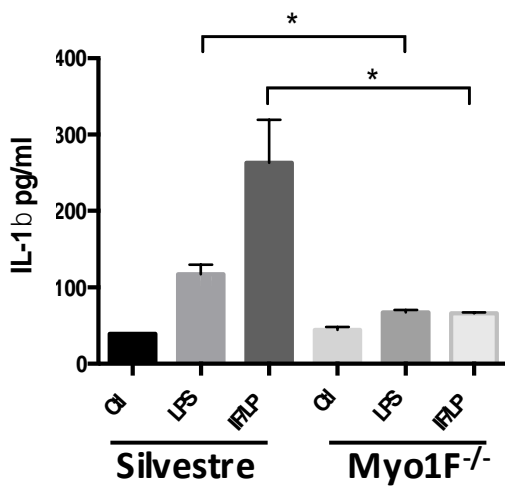
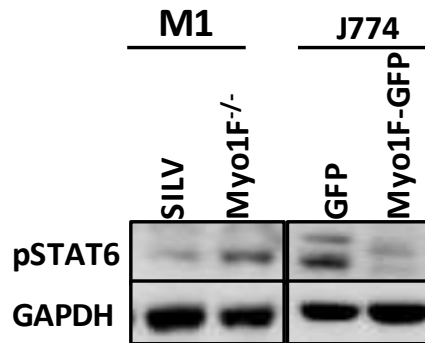
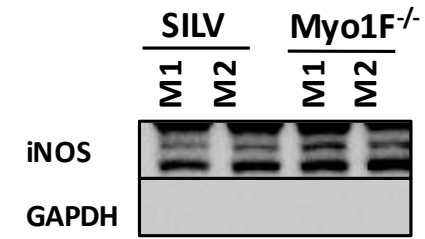
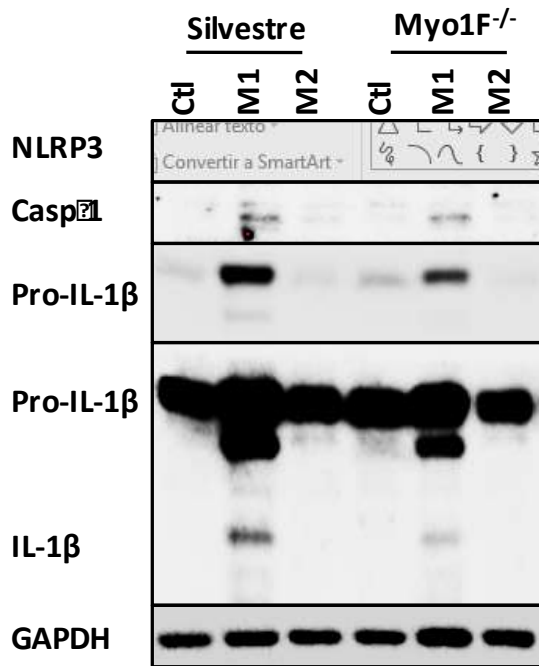
(I) El western blot para la integrina $\beta 3$ se realizó utilizando lisados de las células J774 que sobre expresan a la Myo1F o GFP y que estuvieron en presencia de cilengitide o vitronectina. La expresión de la integrina $\beta 3$ se analizó durante un ensayo de adhesión celular en suspensión. GAPDH fue utilizado como control de carga.

La miosina 1F estimula el fenotipo pro-inflamatorio en los macrófagos.

La integrina $\beta 3$ participa en la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1^{32,67,69}. Por tal motivo, investigamos si la miosina 1F afectaba la polarización de los macrófagos. Para este objetivo, analizamos la producción *in vitro* de la IL-1 β , una citocina pro-inflamatoria secretada por los macrófagos M1, en los macrófagos diferenciados a partir de médula ósea de ratones silvestres y de ratones deficientes de la Myo1F (Myo1F^{-/-}) y polarizados a los fenotipos M1 y M2. Como se esperaba, la proteína NLRP3 (componente del inflamosoma), la proteína pro-IL-1 β e IL-1 β aumentaron en los macrófagos M1 de origen silvestre, sin embargo, estas proteínas se observaron disminuidas en los macrófagos M1 deficientes de la miosina 1F (**Figura 11A**), además no se observaron cambios en la proteína caspasa 1. Para el caso de los macrófagos M2 de origen silvestre y Myo1F^{-/-}, se observaron niveles bajos de estas proteínas en comparación con los niveles expresados en los macrófagos M1. La proteína iNOS es otro mediador pro-inflamatorio que es expresado de manera importante en los macrófagos M1. La expresión de iNOS fue claramente disminuida en los macrófagos M1 deficientes de la miosina 1F en comparación con los macrófagos m1 de origen silvestre (**Figura 11B**). Como se esperaba, iNOS no se detectó en los macrófagos M2 de origen silvestre o Myo1F^{-/-}. Adicionalmente, en los macrófagos M1 carentes de la Myo1F^{-/-} pudimos detectar altos niveles de pSTAT6, un represor transcripcional conocido por limitar la respuesta inflamatoria en los macrófagos³¹ (**Figura 11C**). Por el contrario, la sobre expresión de la Myo1F disminuyó la presencia de este represor. A pesar de los datos anteriores, los niveles de secreción de IL-1 β fueron similares entre los macrófagos de origen silvestre y los macrófagos Myo1F^{-/-} en ausencia de estimulación (**Figura 11D**). Sin embargo, la secreción de IL-1 β fue inducida en los macrófagos de origen silvestre estimulados con LPS o con IFN- γ más LPS, proceso que se vio disminuido en ausencia de la miosina 1F (**Figura 11D**). Contrario a lo observado para IL-1 β , bajo condiciones control, la secreción de la citocina pro-inflamatoria IL-6 fue estimulada en los macrófagos Myo1F^{-/-} en comparación con los macrófagos de origen silvestre. Sorprendentemente, la secreción de IL-6 que fue

estimulada por el tratamiento con LPS o IFN- γ más LPS, fue similar entre los macrófagos Myo1F^{-/-} silvestres (**Figura 11D**).

Para corroborar estos hallazgos, investigamos si la sobre expresión de la miosina 1F inducía un fenotipo pro-inflamatorio en las células J774. Para este objetivo, las proteínas NLRP3, Caspasa 1, pro-IL-1 β e IL-1 β se analizaron en las células J774 GFP y J774 Myo1F-GFP. Como se muestra en la **figura 11E y 11F**, la sobre expresión de la Myo1F indujo una pequeña pero constante acumulación de NLRP3 y aumentó el procesamiento y secreción de IL-1 β . Sin embargo, su presencia falló para incrementar pro-IL-1 β o Caspasa 1. Además, como se esperaba, iNOS se incrementó en las células que sobre expresaban Myo1F (**Figura 11G**) así como la secreción de IL-1 β , sin embargo, su presencia redujo la liberación de IL-6 (**Figura 11F**). Esta secreción de IL-1 β inducida por la sobre expresión de la Myo1F fue comparable a la observada en las células J774 GFP que fueron estimuladas con LPS o la mezcla IFN- γ más LPS. Por otro lado, la secreción de IL-6 fue estimulada en las células J774 GFP y J774 Myo1F-GFP que fueron estimuladas con LPS o IFN- γ más LPS. Sin embargo, la secreción de IL-6 inducida por estos ambos estímulos en las células J774 GFP fue considerablemente mayor que la observada en las células J774 Myo1F-GFP (**Figura 11F**). En conjunto todos estos datos sugieren fuertemente que la miosina 1F confiere a los macrófagos características que asemejan a las descritas para los macrófagos M1.



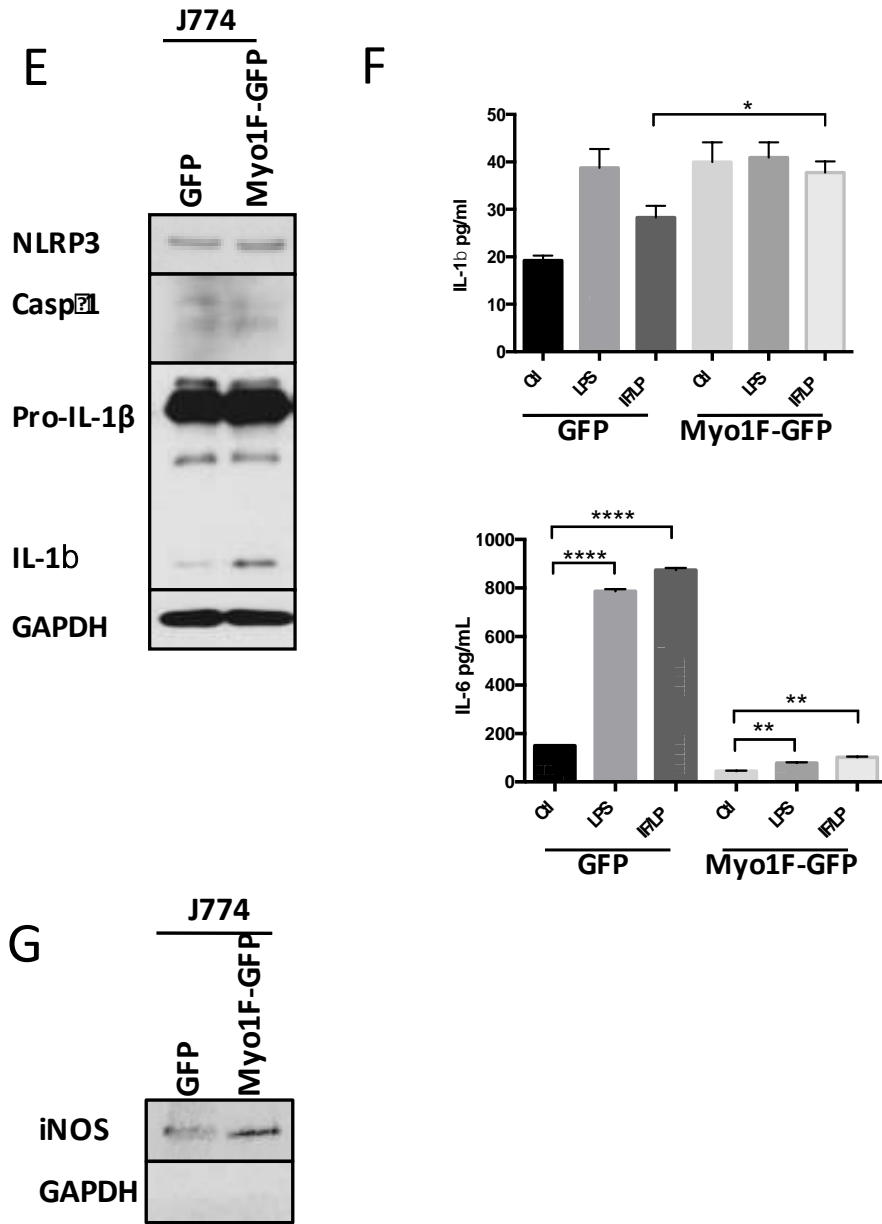


Figura 11. La miosina 1F es requerida para inducir el fenotipo pro-inflamatorio de los macrófagos.

(A) Las proteínas NLRP3, Caspasa1, ProIL-1 β e IL-1 β fueron analizadas por western blot a partir de lisados celulares de BMM diferenciados a macrófagos M1 o M2 provenientes de ratones C57BL/6 silvestres o Myo1F^{-/-}. El fenotipo M1 fue inducido por la estimulación con IFN- γ /LPS (20ng/ml; 1 μ g/ml) y el fenotipo M2 con IL-4 (20ng/ml). GAPDH fue utilizado como control de carga. n=3.

- (B) Resultado representativo del ensayo de western blot para la molécula iNOS en macrófagos diferenciados de médula ósea proveniente de ratones silvestres o Myo1F^{-/-} polarizados a M1 o M2. GAPDH fue usado como control de carga. n=3.
- (C) La expresión de pSTAT6 fue evaluada por western blot en lisados de BMM de origen WT o Myo1F^{-/-} polarizados al fenotipo M1 o en lisados de células J774 transducidas con GFP or Myo1F-GFP. GAPDH fue usado como control de carga. n=3.
- (D) La secreción de IL-1 β e IL-6 se midió por ensayos de ELISA a partir de sobrenadantes de BMM de origen silvestre o Myo1F^{-/-}. Se realizó una estimulación con IFN- γ /LPS o LPS por 5 horas. Las gráficas son derivadas de experimentos independientes realizados por duplicado. n=3. Los resultados se muestran como valores \pm SEM. * $p=0.05$, ** $p=0.01$.
- (E) El ensayo de Western blot para las proteínas NLRP3, Caspasa1, pro-IL-1 β e IL-1 β fue realizado a partir de lisados de células J774 que sobre expresan a la Myo1F o GFP bajo condiciones homeostáticas. GAPDH fue utilizado como control de carga. n=3
- (F) La secreción de IL-1 β e IL-6 se midió por ensayos de ELISA a partir de sobrenadantes de células J774 que sobre expresan a la Myo1F-GFP o GFP. Se realizó una estimulación con IFN- γ /LPS por 5 horas. Las gráficas son derivadas de experimentos independientes realizados por duplicado. n=3. Los resultados se muestran como valores \pm SEM. * $p=0.05$, ** $p=0.01$.
- (G) Resultado representativo del ensayo de western blot para la molécula iNOS en las células transducidas J774 GFP o J774 Myo1F-GFP. GAPDH fue utilizado como control de carga. n=3

La ausencia de la miosina 1F atenúa vía de señalización Akt/STAT en los macrófagos.

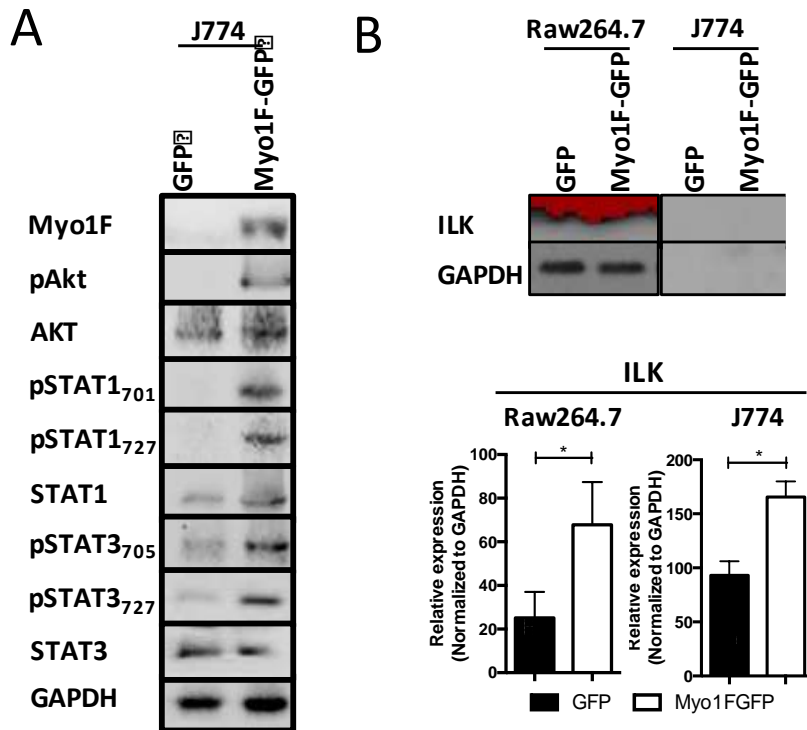
El siguiente objetivo en este trabajo fue identificar el mecanismo a través del cual la miosina 1F estimula la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio. La vía de señalización de Akt está involucrada en la polarización de los macrófagos río abajo de la integrina $\alpha v \beta 3$ ⁶⁷, molécula regulada por miosina 1F. Por tal motivo, investigamos el estatus de Akt en las

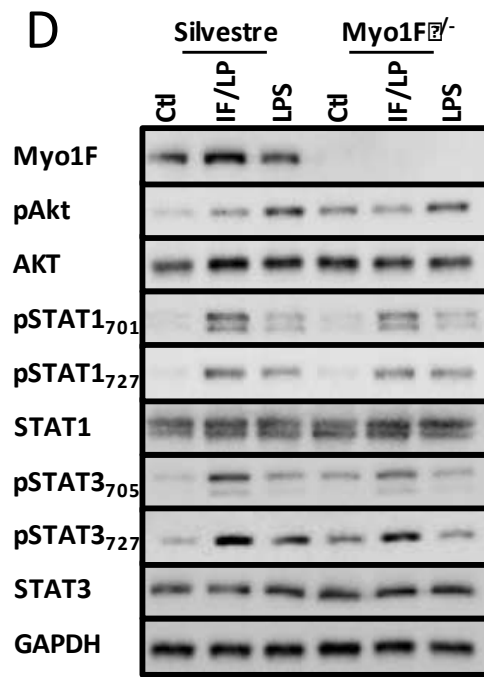
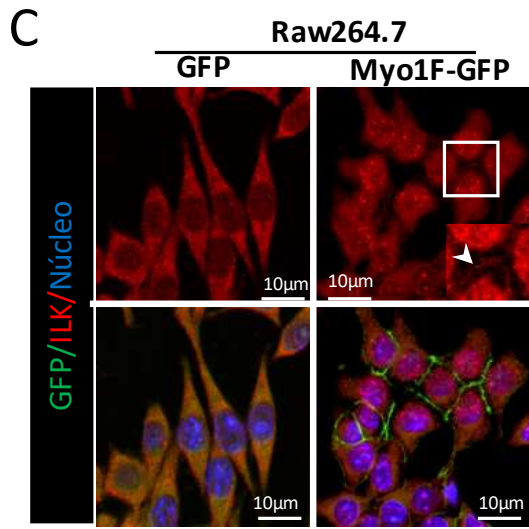
células J774 transducidas con GFP o con la Myo1F-GFP. Como se muestra en la **figura 12A**, la sobre expresión de las Myo1F indujo la activación de Akt (S473, desde ahora pAkt) sin afectar los niveles totales de la proteína. Nosotros hipotetizamos que este fenómeno podría ser consecuencia del incremento en la expresión y la relocalización de la proteína ILK, una cinasa conocida por activar Akt río debajo de la integrina $\alpha v \beta 3^{72}$ (**Figura 12B y 12C**). Interesantemente, también observamos que la sobre expresión de la Myo1F incrementó la fosforilación de STAT 1 (Y701 y S727) y STAT3 (Y705, S727), dos factores de transcripción implicados en la polarización M1 de los macrófagos¹⁰³. Este fenómeno ocurre sin afectar los niveles totales de las proteínas STAT1 o STAT3 (**Figura 12A**).

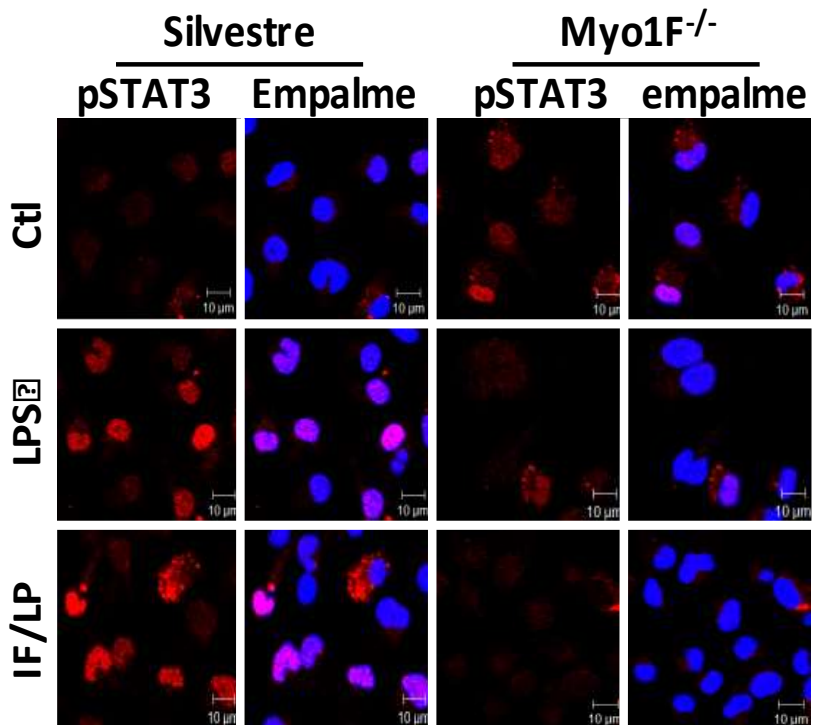
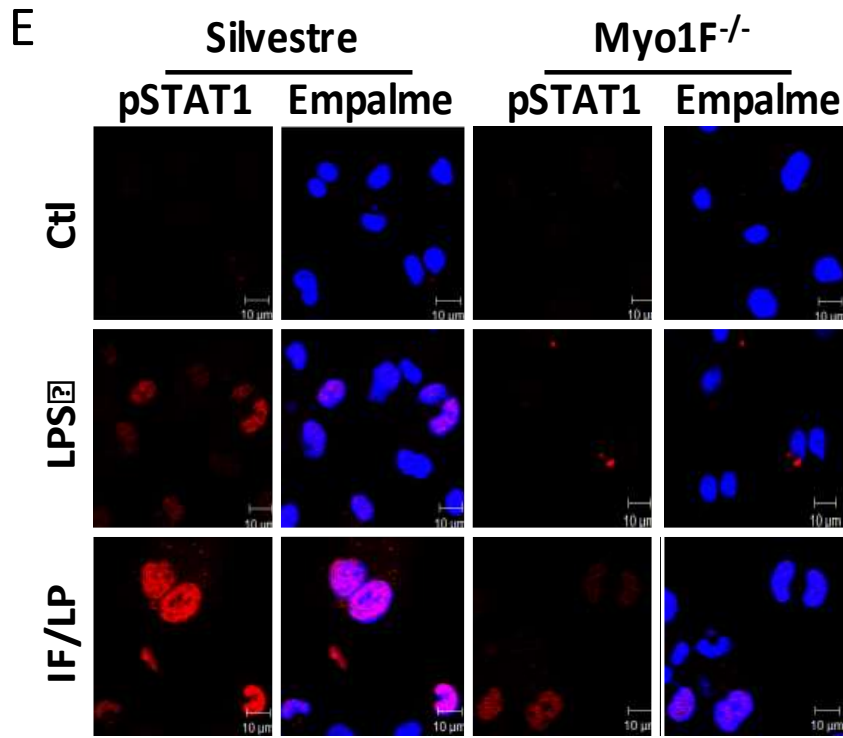
Para corroborar estos resultados, analizamos el estatus de las vías de señalización Akt y STAT en los macrófagos diferenciados de médula ósea de ratones silvestres o deficientes de la miosina 1F que fueron estimulados con LPS o IFN- γ más LPS. Como se muestra en la **figura 12D**, se observó un incremento en la fosforilación de Akt, STAT1 y STAT3 en los macrófagos de origen silvestre, mientras que su activación se vio atenuada en los macrófagos Myo1F^{-/-}. Nuevamente no se observaron cambios en las proteínas totales de estas moléculas. Además, la estimulación de las células indujo la acumulación nuclear de pSTAT1₇₀₁ y pSTAT3₇₀₅ en los macrófagos silvestres, proceso que se vio disminuido en los macrófagos Myo1F^{-/-} (**Figura 12E**). Estos resultados concordaron con la regulación de la vía de señalización integrina $\alpha v \beta 3$ /ILK mediada por la miosina 1F. No está de más mencionar que bajo condiciones control los macrófagos deficientes de la miosina 1F mostraron niveles elevados de pAkt y pSTAT3 (**Figura 12D y 4E**).

A continuación, investigamos la activación de la vía de señalización STAT *in vivo*, en la mucosa del colon de los ratones silvestres y Myo1F^{-/-}, para lo cual administramos de manera intraperitoneal IFN- γ más LPS y pudimos observar una disminución en la acumulación de pSTAT1 y pSTAT3 en el núcleo de las células epiteliales (punta de flecha) y de los macrófagos (células F4/80⁺) (Asterisco) presentes en la mucosa del colon en los ratones Myo1F^{-/-}

comparados con los ratones silvestres (**Figura 12F**). Además, de acuerdo con nuestros resultados previos, en ausencia de la Myo1F se observó una disminución en la secreción de IL-1 β al compararla con los niveles secretados en el ratón silvestre (**Figura 12G**). Así nuestros datos sugieren que, en el colon, la miosina 1F promueve la activación de las moléculas Akt y STAT a través de la vía integrina $\alpha v\beta 3$ /ILK en los macrófagos para promover un fenotipo pro-inflamatorio.







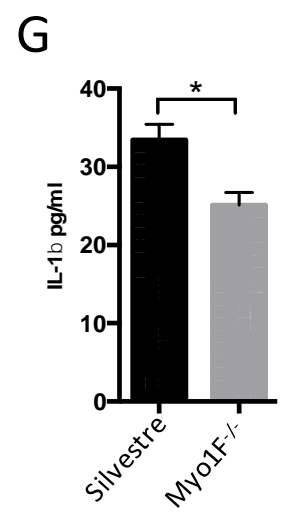
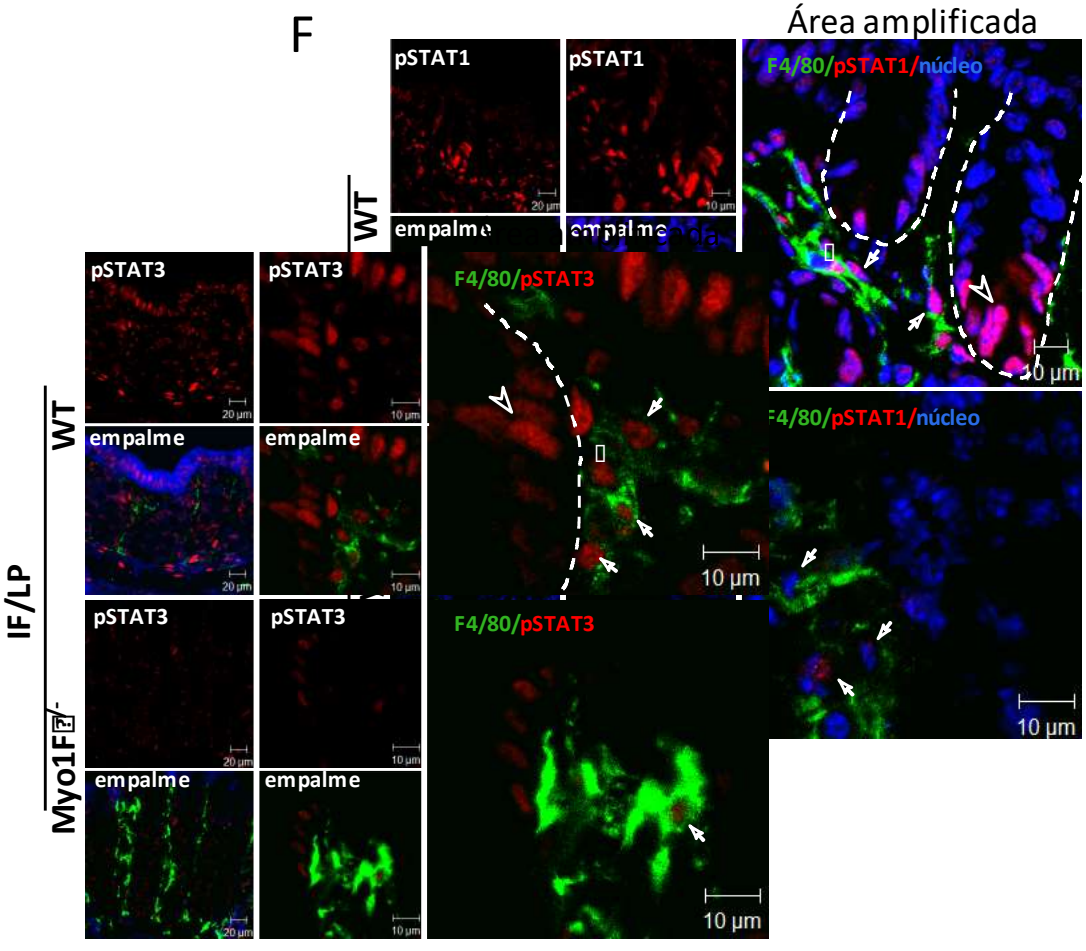


Figura 12. En los macrófagos, la miosina 1F participa en la señalización a través de Akt/STAT durante un estímulo inflamatorio.

(A) La expresión de las proteínas Myo1F, pAkt₄₇₃, AKT, pSTAT₇₀₁, pSTAT₇₂₇, STAT1, pSTAT3₇₀₅, pSTAT3₇₂₇ y STAT3 se analizó por western blot a partir de lisados de células J774 que sobre expresan a la Myo1F o GFP. Las células fueron sembradas a confluencia 12 horas antes de la lisis. GAPDH fue utilizado como control de carga. n=3.

(B) Western blot representativo para la proteína ILK realizado a partir de lisados celulares de las líneas J774 o Raw264.7 transducidas con GFP o con Myo1F-GFP. GAPDH se utilizó como control de carga. n=3. Las gráficas corresponden al análisis densitométrico derivado de 3 experimentos independientes. * $p=0.05$.

(C) Tinción de inmunofluorescencia para ILK (rojo) realizada en células Raw264.7 transducidas con GFP o Myo1F-GFP. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Barra= 10 10 μ m.

(D) La expresión de las proteínas Myo1F, pAkt₄₇₃, AKT, pSTAT₇₀₁, pSTAT₇₂₇, STAT1, pSTAT3₇₀₅, pSTAT3₇₂₇ y STAT3 se analizó por western blot a partir de lisados BMM de origen silvestre o deficientes de la miosina 1F. Los lisados celulares se obtuvieron bajo condiciones control o tras la estimulación por 5 horas con IFN- γ (20ng/ml) más LPS o LPS solo (1 μ g/ml). GAPDH fue utilizado como control de carga. n=3.

(E) La tinción de inmunofluorescencia para pSTAT1 y pSTAT3 (rojo) se realizó en BMM de origen silvestre y deficientes de la miosina 1F sembrados sobre superficies de vidrio. Las células se fijaron después de 5 horas de estimulación con IFN- γ (20ng/ml) más LPS, LPS solo (1 μ g/ml) o en condiciones control (Ctl). El núcleo fue teñido con DAPI (azul). Barra= 10 μ m.

(F) Imagen representativa de una tinción de inmunofluorescencia para F4/80 (verde) y pSTAT₇₀₁ (rojo) o pSTAT3₇₀₅ (rojo) en el epitelio del colon de ratones silvestres o Myo1F^{-/-} a los cuales se les administró intraperitonealmente IFN- γ /LPS por 5h. El núcleo fue teñido con Dapi (azul). Barra= 20 μ m. Se muestran áreas amplificadas de las imágenes. Barra= 10 μ m. n=5.

(G) Cuantificación de la IL-1 β secretada en explantes de colon de ratones silvestres y deficientes de la miosina 1F estimulados con IFN- γ /LPS. El estímulo inflamatorio se administró por 5 horas. La IL-1 β fue cuantificada por ELISA. Las

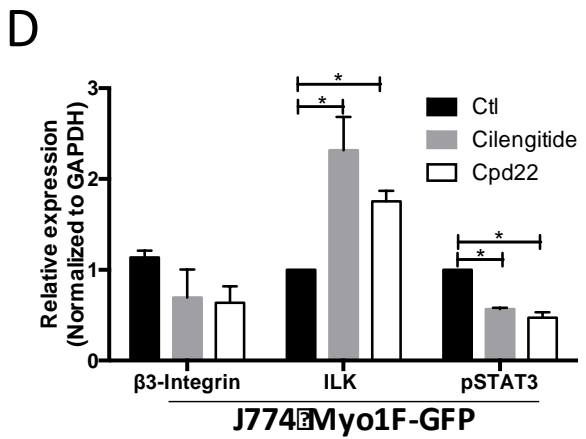
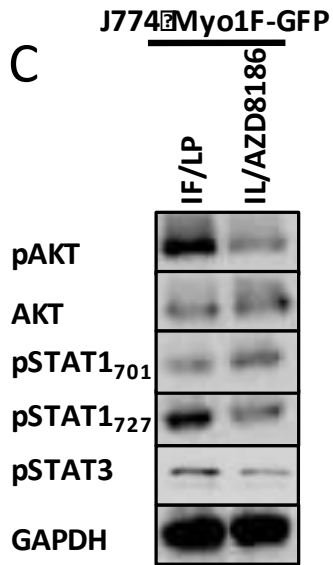
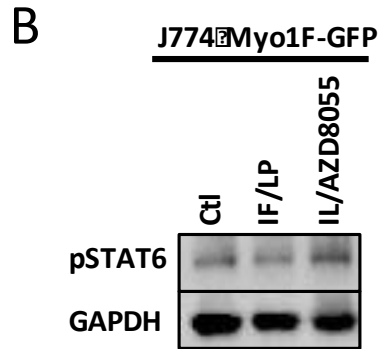
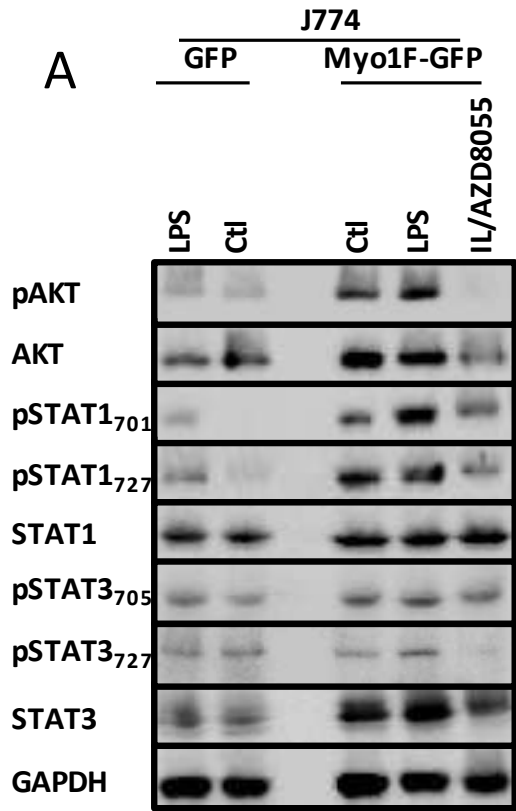
gráficas son derivadas de tres experimentos independientes. n=6. Los resultados se muestran como valores \pm SEM. * $p=0.05$, ** $p=0.01$.

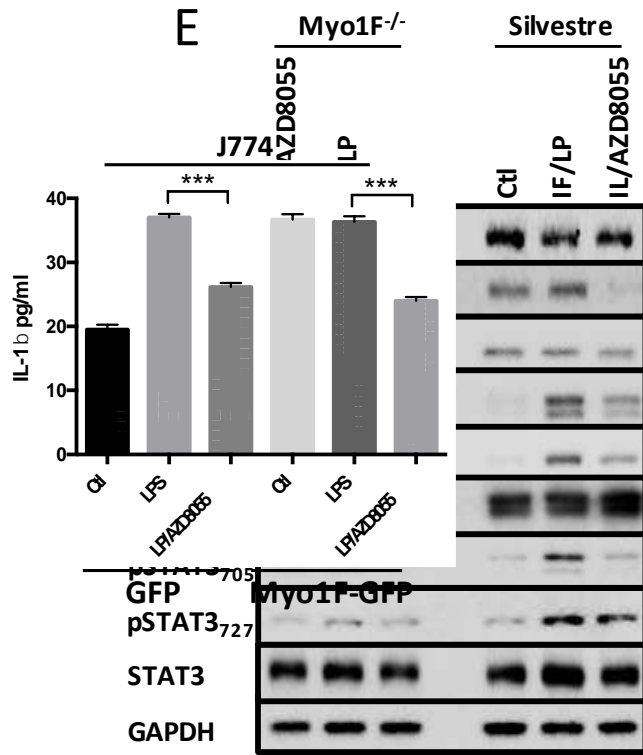
La ausencia de la Myo1F disminuye la activación de STAT a través de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR

La activación de STAT1 y STAT3 río debajo de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR promueve la polarización de los macrófagos M1, un proceso que implica la fosforilación del residuo serina 727 en ambos factores de transcripción^{48,104}. A continuación, analizamos el estado de activación de STAT1 y STAT3 en las células J774 GFP y J774 Myo1F-GFP que fueron tratadas con el inhibidor de mTOR AZD8055 antes de la estimulación con LPS. Como se muestra en la **figura 13A** el AZD8055 previno el incremento de pSTAT1 y pSTAT3 inducido por el LPS en ambas líneas celulares. Interesantemente, nuestros resultados también mostraron que el tratamiento con LPS redujo los niveles de pSTAT6 en las células J774 Myo1F-GFP, pero el inhibidor de mTOR revirtió este efecto (**Figura 13B**). La reducción en la fosforilación de Akt demostró la eficiencia del tratamiento. Además, la administración del inhibidor de PI3K, AZD8186, mostró resultados similares en la inhibición de la activación de STAT1 y STAT3 (**Figura 13C**) y no observamos cambios importantes en las proteínas totales de STAT1, STAT3 y Akt en ninguno de los tratamientos. En concordancia con nuestra hipótesis de que la integrina $\alpha v \beta 3$ regula la polarización de los macrófagos vía ILK para inducir la activación de STAT, observamos una clara reducción en la activación de STAT3 en las células J774 que sobre expresan a la miosina 1F y que fueron expuestas al inhibidor de la integrina $\beta 3$, cilengitide, o al inhibidor de ILK, Cpd22. Ambos tratamientos redujeron los niveles proteicos de la integrina $\beta 3$ pero sorprendentemente ILK fue incrementada (**Figura 13D**). Como se muestra en la **figura 13E**, la fosforilación de STAT1 y STAT3 inducida por el estímulo IFN- γ /LPS en los macrófagos diferenciados de médula ósea de ratones silvestres o ratones Myo1F^{-/-} se redujo tras el tratamiento con el inhibidor AZD8055, además, la activación de Akt y STAT inducida por la

mezcla IFN- γ /LPS se mostró reducida en los macrófagos deficientes de la miosina 1F (**Figura 13E**).

Debido a que se ha reportado que la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR estimula la secreción de diversas citocinas en las células, decidimos investigar si el inhibidor AZD8055 afectaba la secreción de IL-1 β en las células J774 GFP y J774 Myo1F-GFP. Como se muestra en la **figura 13F**, AZD8055 disminuyó la liberación de IL-1 β en ambas líneas celulares. AZD8055 también redujo la secreción de IL-1 β y parcialmente la de IL-6 en los macrófagos diferenciados de médula ósea proveniente de los ratones silvestres que fueron estimulados con IFN- γ /LPS (**Figura 13G**). En los macrófagos Myo1F^{-/-} la secreción de IL-1 β fue menor comparada con la observada en los macrófagos silvestres y el inhibidor AZ8055 mostró efectos mínimos en su secreción. Sin embargo, la inhibición de mTOR disminuyó la secreción de IL-6 que fue inducida por el estímulo IFN- γ /LPS en los macrófagos Myo1F^{-/-} a niveles similares a los observados en los macrófagos silvestres. En conjunto estos resultados sugieren que la miosina 1F promueve la polarización de los macrófagos M1 a través de inducir la activación de STAT a través de la vía PI3K/Akt/mTOR.





F

G

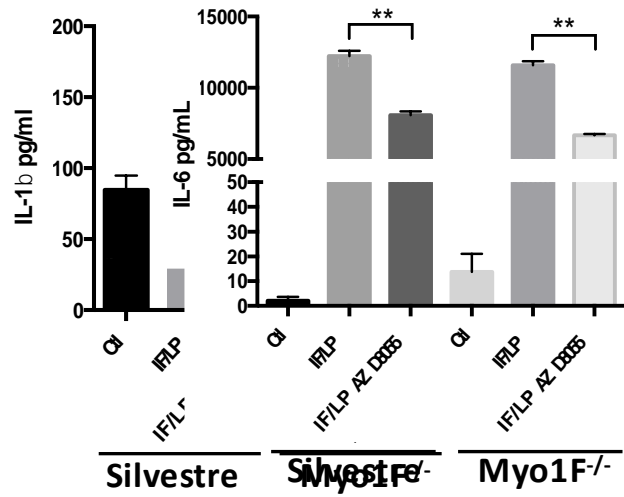


Figura 13. La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR induce la señalización a través de la molécula STAT río debajo del eje Myo1F/integrina α v β 3.

(A) Las moléculas pAkt₄₇₃, Akt, pSTAT₇₀₁, pSTAT₇₂₇, STAT1, pSTAT3₇₀₅, pSTAT3₇₂₇, y STAT3 fueron analizadas en células in J774 GFP o J774 Myo1F-GFP. Se realizó una estimulación con LPS (1 μ g/ml) por 5h. El inhibidor AZD8055 (20nM) se adicionó 30 minutos antes de la estimulación con LPS. GAPDH se utilizó como control de carga. n=3

(B) Western blot representativo para pSTAT6 realizado a partir de lisados de células J774 transducidas con GFP o Myo1F-GFP estimuladas con IFN- γ (20ng/ml) por 1 hora, seguido de la estimulación con LPS (1 μ g/ml) por 5 horas (IF/LP). El inhibidor AZD8055 (20nM) se administró 30 minutos antes de la estimulación IF/LP. GAPDH se utilizó como control de carga. n=3

(C) Western blot representativo para pAkt, Akt, pSTAT₇₀₁, pSTAT₇₂₇, STAT1, pSTAT3₇₂₇ and STAT3 en lisados de células J774 que sobre expresan Myo1F-GFP, las cuales fueron estimuladas con IFN- γ (20ng/ml) por 1 hora, seguido de la estimulación con LPS (1 μ g/ml) por 5 horas (IF/LP). El inhibidor AZD8186 (20nM) se administró 30 minutos antes de la estimulación IF/LP. GAPDH se utilizó como control de carga. n=3

(D) La expresión de la integrina β 3, ILK y pSTAT3 se analizó en lisados celulares de células J774 transducidas con GFP o Myo1F-GFP. El Cilengitide (inhibidor de la integrina β 3; 1 μ M) y el Cpd22 (inhibidor de ILK; 4 μ M) se administró por 6 horas. Las gráficas corresponden al análisis densitométrico derivado de tres experimentos independientes. n=3. * $p=0.05$

(E) Las moléculas Myo1F, pAkt₄₇₃, Akt, pSTAT₇₀₁, pSTAT₇₂₇, STAT1, pSTAT3₇₀₅, pSTAT3₇₂₇, y STAT3 fueron analizadas en macrófagos derivado de médula ósea proveniente de ratones silvestres o Myo1F^{-/-}. Se realizó una estimulación con IFN- γ (20ng/ml)/LPS (1 μ g/ml) por 5h (IF/LP). El inhibidor AZD8055 (20nM) se adicionó 30 minutos antes de la estimulación con IF/LP. GAPDH se utilizó como control de carga.

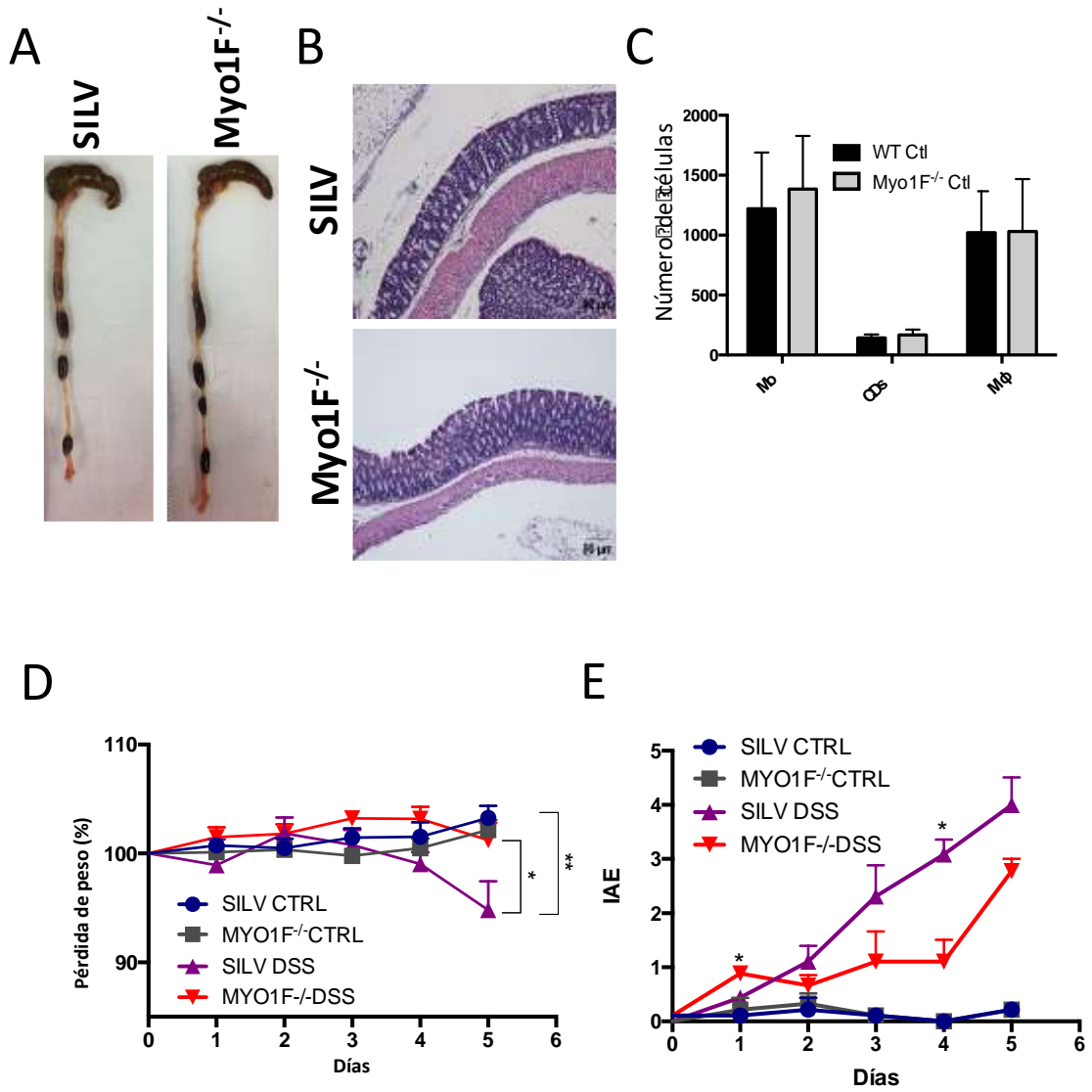
(F) Cuantificación de la secreción de la IL-1 β en sobrenadantes de células J774 GFP o J774 Myo1F-GFP estimuladas con LPS (1 μ g/ml) por 5 horas. El inhibidor AZD8055 (20nM) se adicionó 30 minutos antes de la estimulación. Las gráficas son derivadas de tres experimentos independientes. n=6. Los resultados se muestran como valores \pm SEM. * $p=0.05$, ** $p=0.01$.

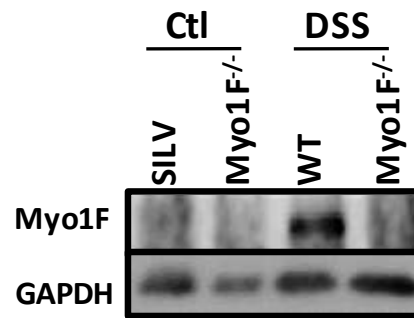
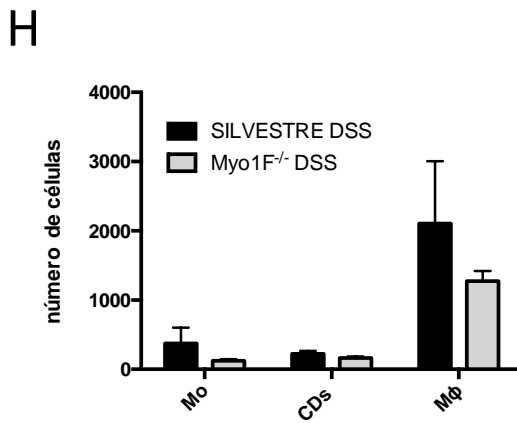
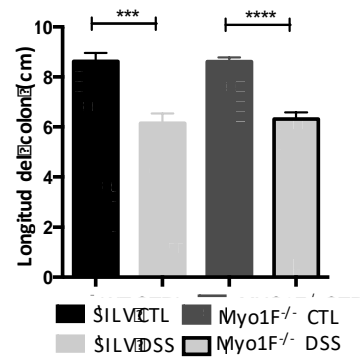
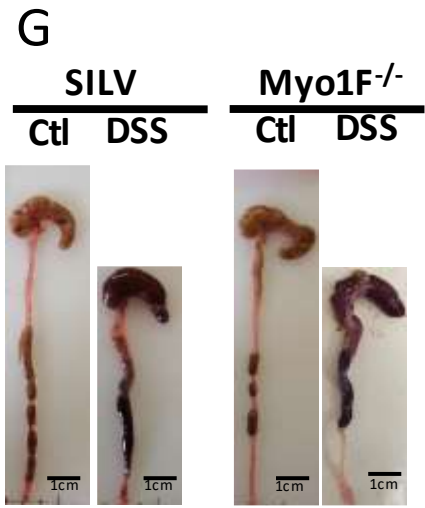
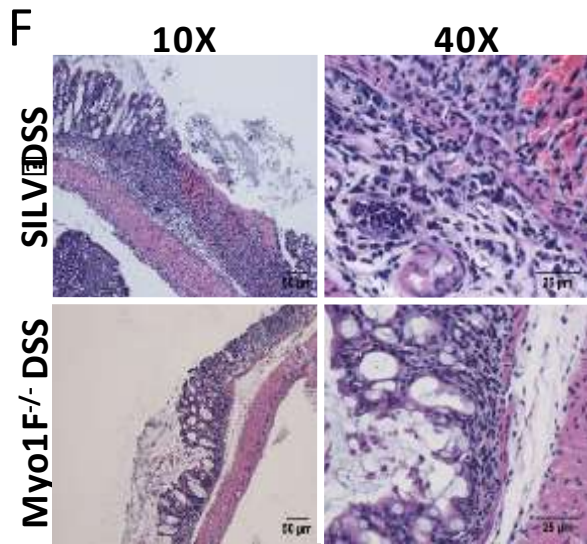
(G) Cuantificación de la secreción de la IL-1 β e IL-6 en sobrenadantes de macrófagos derivados de médula ósea de ratones silvestres y deficientes de la miosina 1F que fueron estimulados con LPS (1 μ g/ml) con IFN- γ (20ng/ml)/LPS (1 μ g/ml) por 5h. El inhibidor AZD8055 (20nM) se adicionó 30 minutos antes de la estimulación. Las gráficas son derivadas de experimentos independientes realizados por duplicado. n=3. Los resultados se muestran como valores \pm SEM. * $p=0.05$, ** $p=0.01$

La ausencia de la miosina 1F reduce el daño del epitelio intestinal e incrementa la restitución epitelial en un modelo de colitis inducido por DSS

Finalmente, analizamos la relevancia funcional de la polarización de los macrófagos mediada por la miosina 1F en un modelo de inflamación. Para este objetivo, investigamos si la ausencia de la Myo1F afectaba el desarrollo de la colitis inducida por la administración de DSS. Es importante mencionar que en condiciones basales no se observaron anomalías o cambios histológicos importantes en la arquitectura de las criptas de los ratones Myo1F^{-/-} cuando se compararon con los ratones silvestres (**Figura 14A y 14B**). Tampoco se observaron diferencias significativas en el número de monocitos, macrófagos o células dendríticas presentes en la mucosa del colon de los ratones silvestres y Myo1F^{-/-} (**Figura 14C**). Sin embargo, el tratamiento con DSS indujo una colitis menos severa en el ratón deficiente de la miosina 1F, el cual mostró una menor pérdida de peso, menor índice de actividad de la enfermedad y menores cambios histológicos (menor número de ulceraciones, menor infiltrado celular y ausencia de edema) en comparación con el ratón silvestre (**Figura 14D-14F**). Por otra parte, la reducción en la longitud del colon, inducida por el tratamiento, fue similar entre ambos ratones (**Figura 14G**). A continuación, investigamos si la ausencia de la miosina 1F afectaba el reclutamiento de algunas células mieloides durante la inflamación de la mucosa. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en el número de monocitos, macrófagos o células dendríticas presentes en la mucosa

inflamada de ambos ratones (**Figura 14H**). Además, analizamos la presencia de la Myo1F, la integrina $\alpha v \beta 3$ e ILK en lisados de la mucosa de los animales. Como se muestra en las **Figuras 14I y 14J**, la miosina 1F se enriqueció en la mucosa del colon de los ratones silvestres a los que se les indujo colitis y más específicamente en los macrófagos aislados de la mucosa durante la colitis. En contraste, mínimos cambios fueron observados en la expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ o ILK entre la mucosa de los ratones silvestres y los ratones Myo1F^{-/-} durante colitis (**Figura K**). Estos resultados sugieren fuertemente que la deficiencia de la miosina 1F disminuye los síntomas de la colitis inducida por DSS a través de un mecanismo que no involucra el reclutamiento de monocitos, macrófagos y dendríticas al área inflamada.





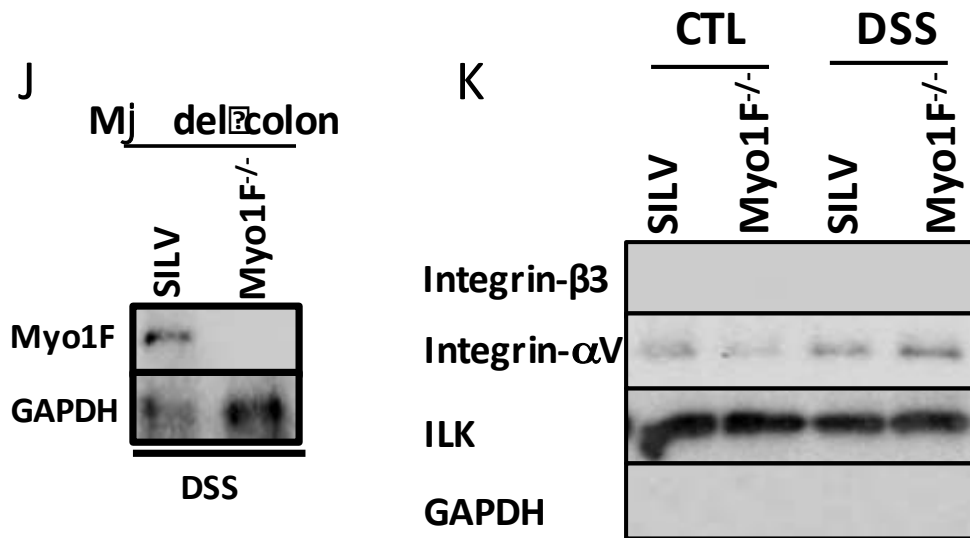


Figura 14. La miosina 1F regula la homeostasis intestinal.

A) Imágenes representativas de la longitud del colon de los ratones silvestres y deficientes de la Myo1F bajo condiciones control. Todos los resultados se derivan de experimentos independientes. n = 5 ratones por grupo. * p = 0.05.

B) Tinción de hematoxilina y eosina en secciones de colon obtenidas de los ratones silvestres y deficientes de la Myo1F bajo condiciones control. Barra= 50μm

C) Cuantificación de monocitos, macrófagos y células dendríticas aisladas del colon de ratones silvestres y Myo1F^{-/-} en condiciones control. La purificación y cuantificación de las poblaciones celulares se realizó por citometría de flujo. Todos los resultados se derivan de experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

D) Pérdida de peso, expresada en porcentaje, de los ratones silvestres y de los ratones deficientes de la Myo1F a los cuales se les indujo colitis. Todos los resultados se derivan de experimentos independientes. n = 5 ratones por grupo. * p = 0.05.

E) Índice de actividad de la enfermedad (pérdida de peso, presencia de sangre en las heces y consistencia de las heces) los ratones silvestres y de los deficientes de la Myo1F a los cuales se les indujo colitis con DSS al 2.5% disuelto en agua potable. Todos los resultados se derivan de experimentos. n = 5 ratones por grupo. * p = 0.05.

F) Tinción de hematoxilina y eosina en secciones de colon obtenidas de ratones silvestres o Myo1F^{-/-} a los cuales se les indujo colitis con DSS. El DSS 2.5% se

administró en agua potable durante 5 días. Barra = 50 μ m. Se muestra el área de amplificación. Bar = 25 μ m

G) Imágenes representativas y gráficas de la longitud del colon de los ratones silvestres y los Myo1F^{-/-} a los cuales se les indujo colitis. El DSS (2.5%) se disolvió en agua corriente y se administró durante 5 días. Los animales de control recibieron agua sola. Todos los resultados se derivan de experimentos independientes. n = 3 ratones por grupo. * p = 0.05, ** p = 0.01, *** p = 0.0005, **** p < 0.0001. Barras de escala: 1cm.

H) Cuantificación de monocitos (Mo), macrófagos (M ϕ) y células dendríticas (CDs) aisladas del colon de ratones silvestres y Myo1F^{-/-} a los cuales se les indujo colitis con DSS por 5 días. La purificación y cuantificación de las poblaciones celulares se realizó por citometría de flujo. Todos los resultados se derivan de experimentos independientes llevados a cabo por duplicado.

I) La expresión de la Myo1F se evaluó mediante western blot en lisados de células de colon de ratones silvestres y ratones deficientes de la Myo1F a los cuales se les indujo colitis con DSS. El tratamiento se llevó a cabo durante 5 días. Los animales de control recibieron solo agua potable. Se usó GAPDH como control de carga. n = 5.

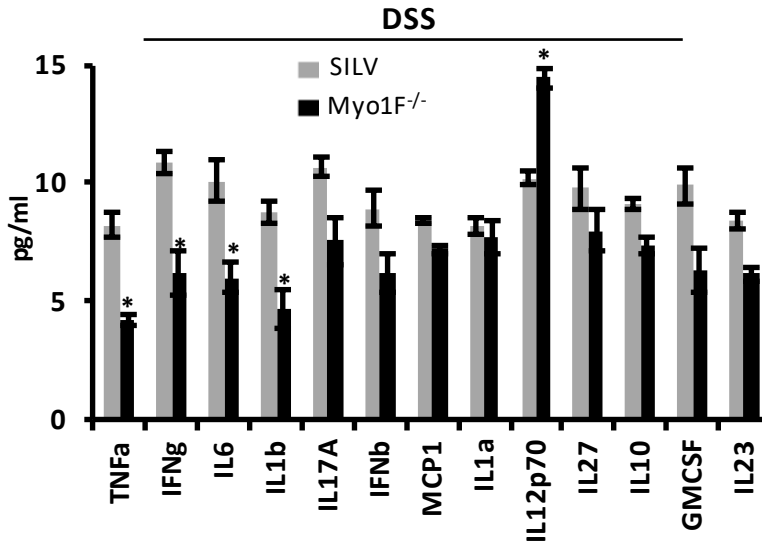
J) La expresión de la Myo1F se evaluó, mediante western blot, en macrófagos aislados del colon de los ratones silvestres y Myo1F^{-/-} como se describe en materiales y métodos. GAPDH se utilizó como control de carga. n=3

K) Western blot para la integrina- α v, la integrina- β 3 e ILK realizado en lisados celulares de tejido de colon obtenido de ratones silvestres y Myo1F^{-/-} a los que se les indujo colitis durante 5 días. GAPDH fue utilizado como control de carga.

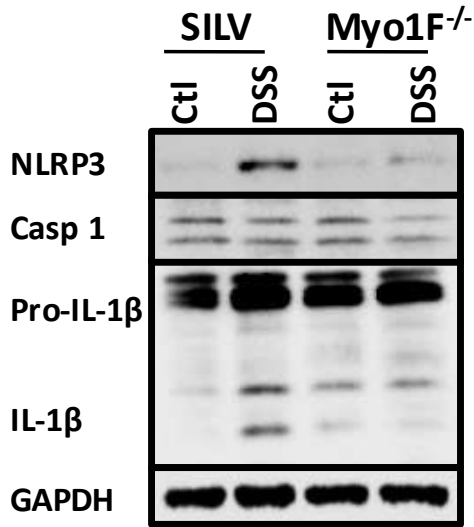
Los macrófagos M1 secretan citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN tipo I, CXCL1-3, CXCL-5 y CXCL8-10)¹⁰⁵ (REF) asociadas al daño de la mucosa epitelial durante la colitis inducida por DSS así como por evitar la restitución del epitelio^{106,107}. A continuación, analizamos la secreción de algunas citocinas en explantes de colon de los ratones silvestres y los ratones Myo1F^{-/-} a los cuales se les indujo colitis por 5 días. Pudimos observar que la secreción de TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β disminuyó en los ratones deficientes de la miosina 1F en comparación con los ratones silvestres, sin embargo, se detectó un incremento en la citocina IL12p70 y no se detectaron cambios significativos en la secreción de IL-17A, IFN- α , MCP1, IL-1 α , IL-27, IL-10, GM-SCF o IL2-3 (**Figura 15A**). Además, en concordancia con estos resultados, los niveles proteicos de NLRP3, pro-IL- β e IL-1 β se mostraron reducidos en la mucosa del colon de los ratones Myo1F^{-/-} con colitis en comparación con los ratones silvestres (**Figura 15B**). Posteriormente, analizamos la expresión proteica de Akt, STAT1 y STAT3 en los lisados de colon de los ratones silvestres y Myo1F^{-/-} durante la colitis. Interesantemente, detectamos una disminución en la fosforilación de AKT y STAT3 en el colon de los ratones Myo1F^{-/-} sin embargo, los niveles de fosforilación de STAT1 en ambos ratones fue similar (**Figura 15C**). El análisis de inmunofluorescencia demostró la ausencia de pSTAT1 en el núcleo de las células de la mucosa de ambos ratones (**Figura 15D**). No obstante, observamos tinción para pSTAT3 en el núcleo de las células epiteliales del intestino (flecha) y en los macrófagos (asterisco) presentes en la lámina propia. Un análisis más detallado (área amplificada) demostró una clara reducción de pSTAT3 nuclear en los macrófagos deficientes de la miosina 1F (asterisco). Además, la deficiencia de esta miosina también indujo la acumulación nuclear de pSTAT3 en células no epiteliales que fueron negativas para el marcador F4/80, bajo condiciones control o durante la inflamación (**Figura 15E, punta de flecha**). Estas células se mostraron ausentes en la mucosa del colon de los animales silvestres. Así, nuestros resultados sugieren que la presencia de la miosina 1F incrementa la activación de Akt y STAT3 en los macrófagos del colon durante la colitis.

Finalmente, analizamos a largo plazo los efectos de la ausencia de la myo1F en el modelo de colitis inducida con DSS, en esta ocasión se administró Dss por 5 días a los ratones y posteriormente se les dio a beber agua corriente por 10 días más para inducir la recuperación del epitelio intestinal. Al final del tratamiento, los ratones deficientes de la miosina 1F mostraron una enfermedad menos severa comparada con los ratones silvestres, los cuales perdieron peso rápidamente e incrementaron los síntomas de la enfermedad (**Figura 15F y 15G**). Después del sacrificio, se evidenció la presencia de lesiones ulcerosas a lo largo de todo el colon de los ratones silvestres, sorprendentemente estas lesiones se mostraron ausentes en el colon de los ratones Myo1F^{-/-} (**Figura 15H**). Estas observaciones demostraron que la presencia de Myo1F reduce la reparación del tejido dañado por la administración de DSS y sustentan nuestra hipótesis de que la Myo1F induce la polarización M1 de los macrófagos durante la colitis a través de inducir su adhesión intercelular a través de la integrina $\alpha v \beta 3$ quien a su vez activa la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR/STAT.

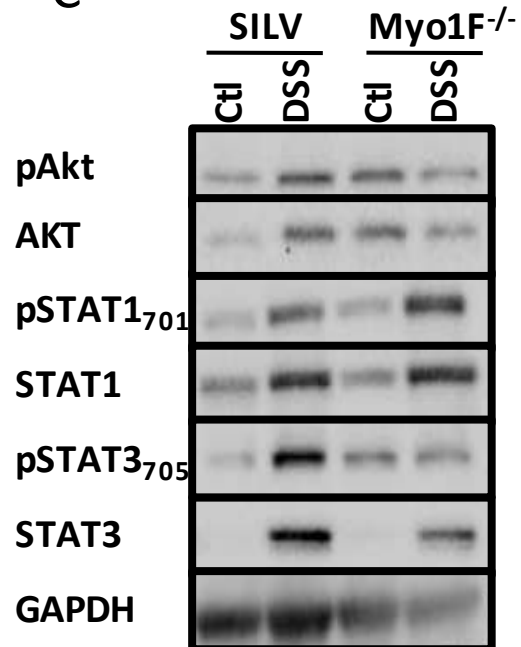
A

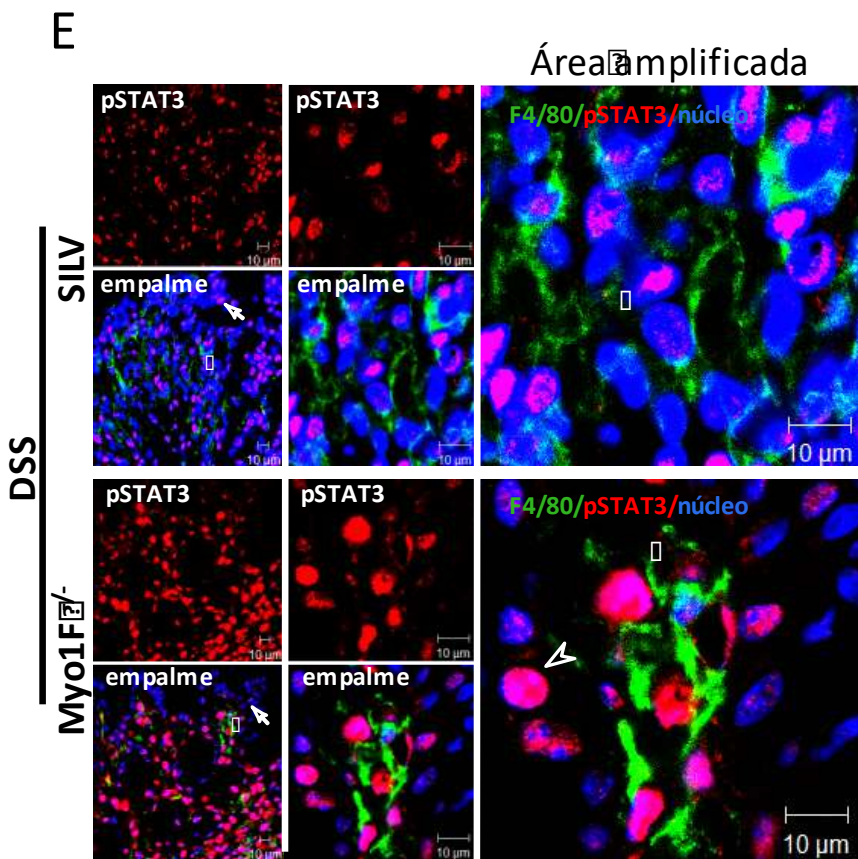
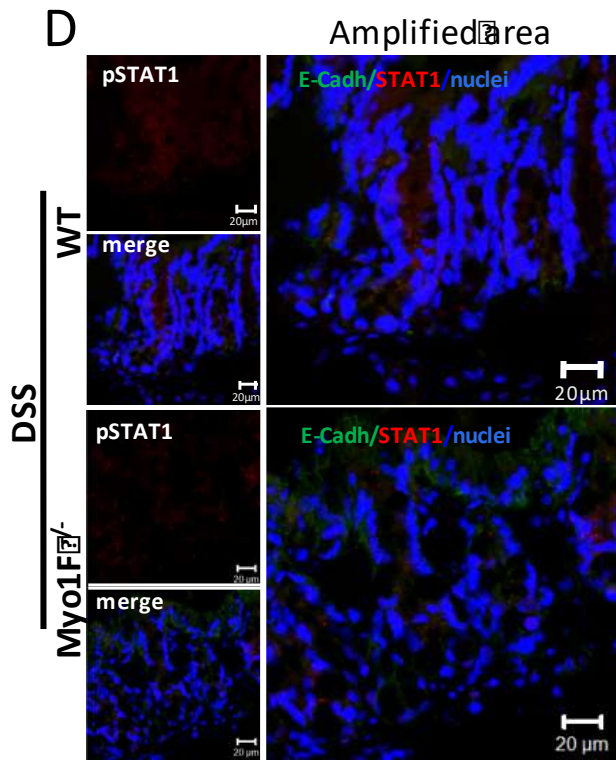


B



C





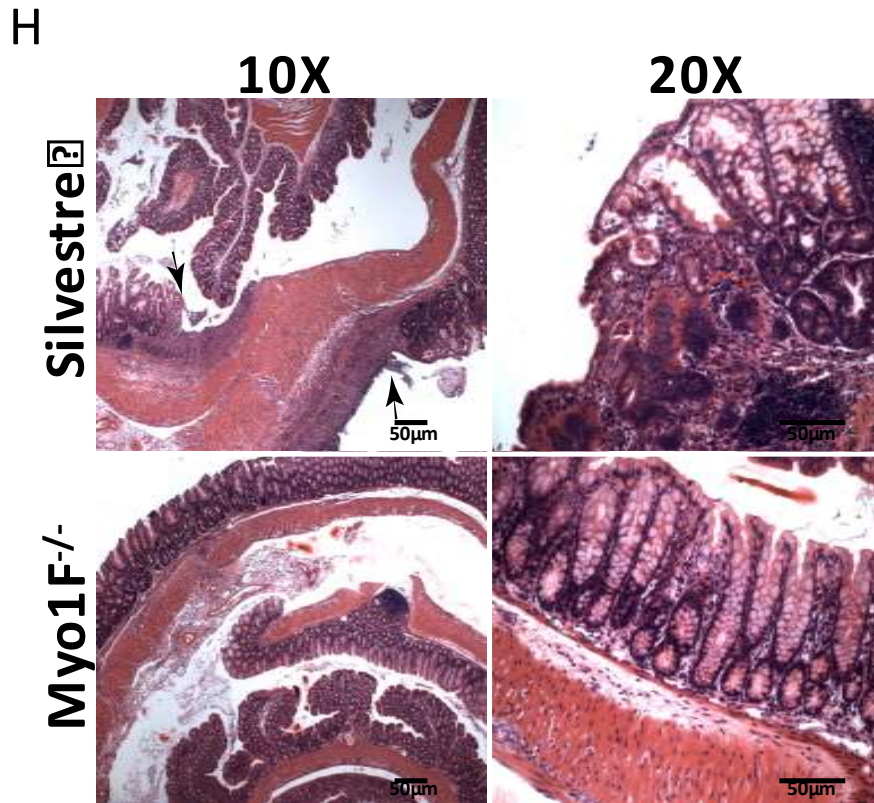
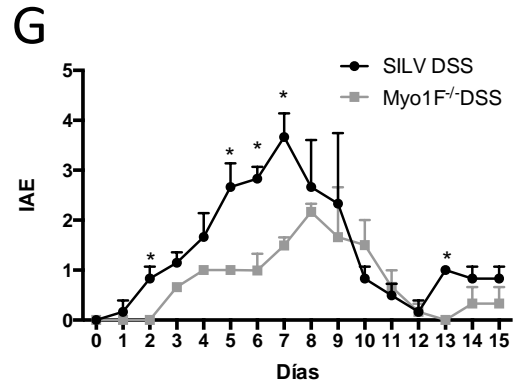
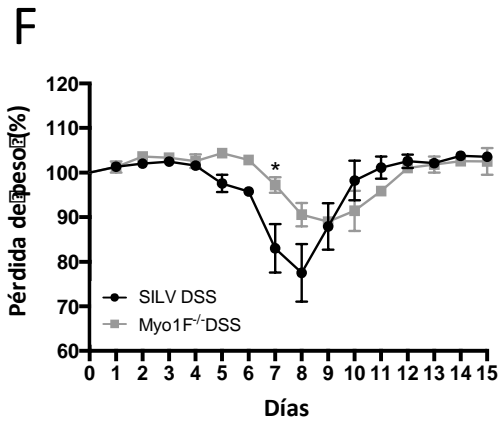


Figura 15. La mucosa del colon de los ratones Myo1F^{-/-} presentan una reducción en el daño epitelial intestinal y una mayor restitución de la mucosa después de la inducción de colitis.

(A) La secreción de citoquinas y quimiocinas se analizó mediante el uso de un ensayo multiplex en explantes de colon de ratones silvestres y Myo1F^{-/-} a los cuales se les indujo colitis durante 5 días. Los resultados se muestran como valores medios \pm SEM. * $p = 0.05$.

(B) NLRP3, Caspasa 1 e IL-1 β se evaluaron en lisados celulares de epitelio de colon de ratones silvestres o Myo1F^{-/-} bajo condiciones de control o después de 5 días de tratamiento con DSS. Se usó GAPDH como control de carga. $n = 5$.

(C) pAkt₄₇₃, Akt, pSTAT₇₀₁, STAT1, pSTAT₃₇₀₅ y STAT3 se analizaron en lisados de tejido de colon de ratones silvestres y Myo1F^{-/-} a los que se les indujo colitis con DSS. Se usó GAPDH como control de carga. $n = 3$.

(D) Tinción de inmunofluorescencia para E-caderina (verde) y pSTAT1 (rojo) en epitelio de colon de ratones silvestres y Myo1F^{-/-} después de 5 días de tratamiento con DSS. Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Se área ampliada. Barra= 20 μ m.

(E) Imagen representativa de la tinción de inmunofluorescencia para F4/80 (verde) y pSTAT₃₇₀₅ (rojo) en epitelio de colon de ratones silvestres y Myo1F^{-/-} a los que se les indujo colitis. Los núcleos se tiñeron con Dapi (azul). Barra= 20 μ m. Se muestran las áreas ampliadas de las imágenes. Barra= 10 μ m. $n = 5$.

(F) Cambio porcentual en el peso corporal de los ratones silvestres y Myo1F^{-/-} en un ensayo de recuperación después de la inducción de colitis con DSS con 5 días. * $p = 0.05$.

(G) El índice de la actividad de la enfermedad se determinó en los ratones silvestres o Myo1F^{-/-} que se sometieron a la recuperación después de la inducción de colitis por 5 días. Los resultados se derivan de experimentos independientes. $n = 5$ ratones por grupo. * $p = 0.05$

(H) Cambios histológicos analizados en los ratones silvestres o Myo1F^{-/-} que se sometieron a la recuperación después de la inducción de colitis por 5 días. La tinción con hematoxilina y eosina se llevó a cabo como se describe en los materiales y métodos. Barra= 50 μ m. La flecha marca las zonas ulceradas. Todos los resultados se derivan de experimentos independientes. $n = 5$ ratones por grupo.

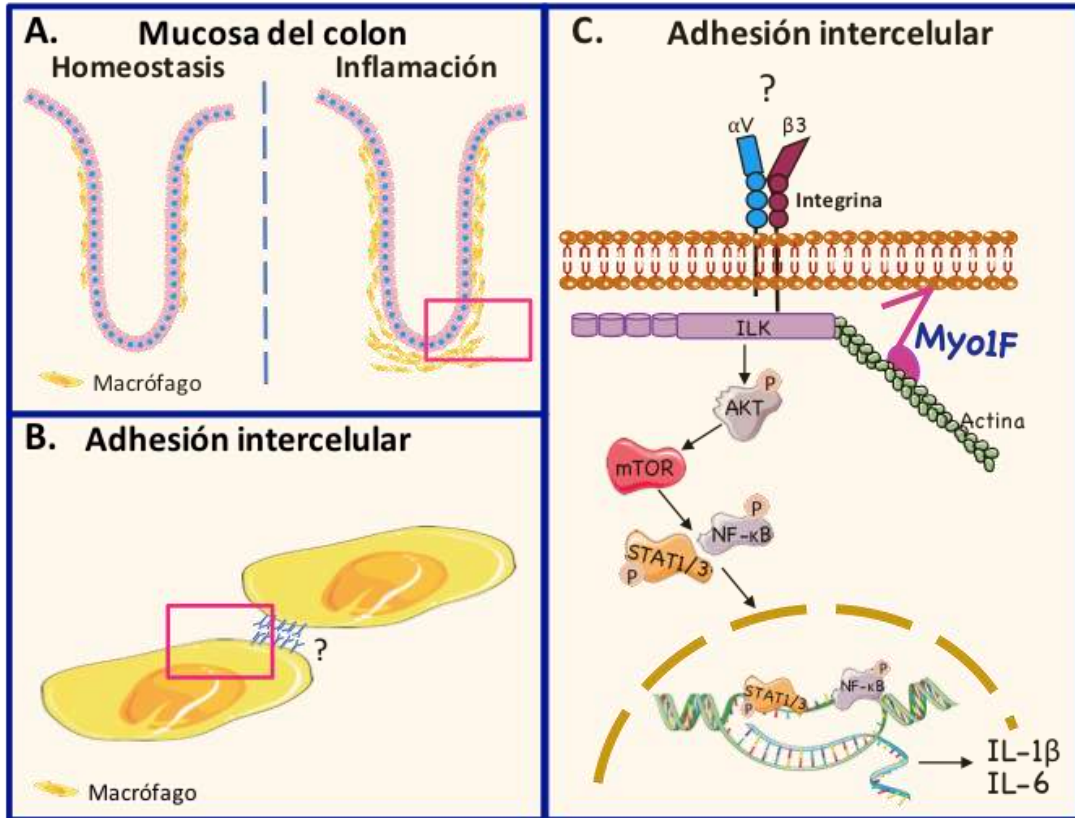


Figura 16. Modelo.

- A) Representación esquemática de la mucosa del colon en la homeostasis y en la inflamación.
- B) La integrina- $\alpha V\beta 3$ mejora las propiedades de adhesión intercelular en macrófagos colónicos durante la inflamación.
- C) El eje integrina- $\alpha V\beta 3$ /ILK está regulada positivamente por la Myo1F para inducir la señalización de STAT a través de Akt/mTORC1. Por lo tanto, la regulación positiva de la Myo1F, inducida por estímulos pro-inflamatorios, da como resultado la polarización M1 de los macrófagos.

VII. DISCUSIÓN

Las citocinas pro-inflamatorias contribuyen a la ruptura de la homeostasis intestinal y al desarrollo y establecimiento de patologías crónicas como son las enfermedades inflamatorias del intestino^{108,109}. En este trabajo, demostramos que la miosina 1F, expresada en los macrófagos inflamatorios del colon durante la colitis, estimula la producción y secreción de IL-1 β a través de la vía de señalización Akt/STAT. En ausencia de la Myo1F, los macrófagos del colon mostraron una reducción en la producción de IL- β durante la colitis, lo que tuvo como consecuencia una mayor reparación epitelial.

Nuestros hallazgos mostraron que la Myo1F está involucrada en la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo que asemeja al linaje descrito tras una respuesta inducida por la administración de DSS¹¹⁰.

Es posible pensar que la sobre expresión de la Myo1F podría estimular dichos fenómenos a través de la activación de la vía de señalización de STAT1 y STAT3 mediante la estimulación del eje integrina β 3/ILK/PI3K/Akt/mTOR, un proceso bien documentado en otros modelos^{67,69,111,112}.

En este trabajo demostramos que la sobre expresión de la miosina 1F induce un incremento en la expresión de la integrina β 3 y de ILK, fenómenos que fueron observados en conjunto con el cambio morfológico de los macrófagos, con el incremento en la adhesión intercelular y con la relocalización de ILK hacia los sitios de contacto célula-célula. Si bien, la inhibición funcional de la integrina β 3 o la presencia de la vitronectina redujo la agregación/adhesión celular, ambos tratamientos indujeron una discreta reducción en la expresión de esta integrina, por lo que no se puede descartar la participación de otras integrinas y/o la participación de otros ligandos β 3 en este fenómeno. En este sentido se ha reportado que la matriz extracelular que rodea a las células es capaz de activar vías de señalización específicas que dirigen a eventos celulares distintos¹¹³. Así mismo, se ha reportado que estas proteínas de matriz tienen la capacidad de regular la expresión de las integrinas¹¹⁴ e incluso la diferenciación y polarización de los macrófagos¹¹⁵. Por lo que evaluar si estas proteínas están participando en regular la expresión

de la integrina $\beta 3$ y contribuyendo así a los fenómenos aquí observados, es un hecho que debe ser analizado.

La adhesión celular y las vías de señalización activadas río debajo de las integrinas contribuyen a la polarización de los macrófagos^{32,68} y en este trabajo mostramos evidencias adicionales de estos hechos ya que el solo incremento en la expresión de la miosina 1F indujo cambios en la adhesión celular e incremento de las vías de señalización Akt/STAT manteniendo a las células en un estado contantemente activado semejante al observado en los macrófagos pro-inflamatorios⁴⁵.

Además, en esta tesis demostramos la importancia de la miosina 1F en la fisiología de los macrófagos, ya que por primera vez se demostró que la Myo1F se encuentra ausente en los monocitos y es expresada sólo cuando las células han iniciado su diferenciación hacia macrófagos, un fenómeno que sugiere funciones específicas en estas células en procesos celulares como la polarización, ya que además se observó una mayor expresión de la Myo1F en los macrófagos pro-inflamatorios en comparación con los macrófagos anti-inflamatorios.

Por otro lado, nuestros hallazgos también destacaron varios hechos desconocidos sobre la polarización de macrófagos. Por ejemplo, durante la colitis inducida por el DSS, pSTAT1 nunca se detectó en el núcleo de los macrófagos o en núcleo de las células epiteliales del intestino. En contraste, la tinción nuclear de pSTAT3 se observó en ambos tipos de células en la mucosa de los animales silvestres. Por lo tanto, especulamos que, durante la polarización M1 de los macrófagos, la actividad transcripcional de STAT1 podría ser estimulada transitoriamente por la Myo1F. En ese contexto, las modificaciones epigenéticas inducidas durante la activación de STAT1 permitirán que STAT3 estimule un fenotipo pro-inflamatorio en lugar de las funciones antiinflamatorias asociadas con esta molécula^{116,117}. De hecho, se ha demostrado que bajo ciertas condiciones STAT1 e IRF-1 se unen al ADN y preparan a la cromatina para el reclutamiento de otros factores de transcripción a sitios específicos en los genes para TNF, IL-6 e IL-12B¹¹⁷. Un

proceso clave de este último mecanismo implica la activación sostenida de STAT1³³, un fenómeno que se ha observado en nuestro modelo al sobre expresar a la Myo1F. Por lo tanto, podríamos especular que bajo estas condiciones se reclutan menos moléculas de STAT1 a sitios específicos del DNA en el núcleo de las células y, en consecuencia, son indetectables o bien, que se indujo una remodelación de la cromatina debido a la ocupación transitoria de los promotores por parte de esta molécula. Sin embargo, también es plausible que la activación transitoria de STAT1 estimule la expresión de proteínas (por ejemplo, NF-κB) que son necesarias para la polarización M1. En ese contexto, la activación sostenida de STAT3 favorecerá la formación de los complejos STAT3/NF-κB en lugar de los homodímeros STAT3/STAT3. Tal proceso estimularía la activación transcripcional de IL-6 e IL-1β^{118,119}, un proceso que conduciría a los resultados observados aquí. Además, las funciones alternativas de pSTAT1, aparte de su función como factor de transcripción, abren la posibilidad de que la activación sostenida de STAT1 sea necesaria para regular un proceso biológico diferente, como la mitofagia¹²⁰.

A pesar de la controversia previa, nuestros resultados mostraron claramente que la presencia de la Myo1F potencia la fosforilación de STAT1 y de STAT3, un proceso que mejora la interacción de las proteínas STAT con sus sitios de acoplamiento análogos¹²¹. El mecanismo por el cual la Myo1F potencia y sostiene la activación de las proteínas STAT en los macrófagos debe investigarse, pero podría estar mediado por la interacción directa de la Myo1F con Syk y las proteínas adaptadoras que contienen motivos ITAM (motivo de inmunoreceptor activable por tirosina)³³. Los dominios de interacción proteína-proteína (SH3) identificados en Myo1F podrían permitir que la proteína cree tales interacciones⁹¹. Sin embargo, los resultados presentados aquí demuestran claramente que la vía PI3K/Akt/mTORC1 también juega un papel importante en este proceso. El mecanismo para dicho proceso implica la fosforilación directa de la serina 727 por parte de mTORC1 tanto en STAT1 como en STAT3^{122,123}. Sin embargo, el mecanismo podría ser

más complejo ya que aquí mostramos que la inhibición de PI3K o mTOR también redujo la fosforilación de STAT1 y STAT3 en tirosina 701 y 705 respectivamente. Así, la activación de la vía de señalización de PI3K por la Myo1F podría tener más implicaciones en la biogénesis de los macrófagos pro-inflamatorios que solo la de estimular la activación de STAT1 y STAT3. De hecho, podría ser un componente clave en la regulación del movimiento, la secreción y la síntesis de proteínas en los macrófagos. En ese contexto, también observamos que la ausencia de Myo1F reduce la secreción y el procesamiento de IL-1 β a través de Akt, probablemente mediante el control de la exocitosis, el ensamblaje de inflamomas o la función de NF- κ B^{124,125}. El mecanismo exacto implicado en la biosíntesis de IL-1 β activa por parte de la Myo1F podría ser muy complejo e implicar la secreción de esta citosina a través de vías no convencionales^{126,127}, la activación de IL-1 β mediante autofagia y el almacenamiento de IL-1 β en vesículas intracelulares¹²⁸ (REF). Por lo tanto, la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1 podría ser más importante de lo que se pensaba anteriormente respecto a la producción y/o liberación de citocinas pro-inflamatorias.

La activación de STAT3 a través de mTORC1 promueve la supervivencia y algunas de las características tipo “stem” de las células cancerosas^{104,122}, un fenotipo no observado en las células que sobre expresan a la miosina 1F. No obstante, debido a que los macrófagos deficientes de la miosina 1F mostraron un fenotipo M2 caracterizado por la activación de Akt, STAT3 y STAT6^{31,46}, suponemos que la activación de STAT1 por mTORC1 río abajo de la Myo1F podría ser un factor esencial en la polarización M1 de los macrófagos. El mecanismo empleado por la miosina 1F para activar a STAT1 a través de mTORC1 podría representar el interruptor que desencadena dicho proceso. Además, debido a que la Myo1F participa en la diferenciación de los macrófagos, la huella genética de los macrófagos silvestres y los deficientes de la Myo1F podría ayudar a dilucidar los mecanismos y la maquinaria implicada en el compromiso de los fenotipos M1 y M2.

El mecanismo por el cual la presencia de la miosina 1F incrementa el daño en la mucosa intestinal podría estar relacionado directamente con un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos. Al respecto, en este trabajo y en otros previamente publicados se ha demostrado que el IFN- γ , el TNF- α , la IL-6 y la IL-1 β estimulan diversas vías de señalización que inducen la muerte celular y reducen la proliferación de las células epiteliales del intestino en la mucosa de los ratones a los cuales se les ha inducido colitis. La mejoría en los síntomas de la colitis y la pronta recuperación del daño epitelial observado en la mucosa de los ratones Myo1F^{-/-} respalda firmemente estos hallazgos¹⁹. Por lo tanto, en los macrófagos, la miosina 1F podría ser un buen blanco para reducir los síntomas observados durante la colitis.

En conjunto, nuestros datos aquí descritos muestran una función desconocida de la Myo1F como parte de la maquinaria que regula la adhesión intercelular y la polarización de los macrófagos

VIII. CONCLUSIÓN

En conclusión, en este trabajo demostramos que la miosina 1F induce la polarización de los macrófagos a un fenotipo pro-inflamatorio a través de la estimulación de la vía de señalización PI3K/Akt/STAT. Así mismo, la ausencia de esta miosina reduce el daño epitelial y estimula la recuperación del epitelio intestinal en un modelo de colitis inducido por DSS.

IX. PERSPECTIVAS

- La sobre expresión de la Myo1F evidenció la participación de esta proteína en la adhesión intercelular, de tal forma que es relevante analizar detalladamente cómo la Myo1F regula este proceso.
- Analizar si la miosina 1F regula la expresión de otras integrinas expresadas en los macrófagos.
- Identificar el ligando de la integrina $\alpha_v\beta_3$ que está induciendo la polarización de los macrófagos.
- Identificar las interacciones de la Myo1F con las proteínas que conforman la vía de señalización integrina $\alpha_v\beta_3$ /PI3K/Akt/mTOR para entender exactamente cómo esta miosina regula la polarización de los macrófagos.
- Analizar si la miosina 1F regula la secreción de otras citocinas pro-inflamatorias.
- Caracterizar por citometría de flujo a los macrófagos M1 y M2 en ausencia de la miosina 1F con la finalidad de identificar defectos en la polarización.
- Evaluar si la miosina 1F utiliza otras vías de señalización para regular la polarización de los macrófagos.
- Evaluar la participación de la miosina 1F en otros modelos de inflamación.
- Analizar la expresión y función de la miosina 1F en otras células del sistema inmune.
- Evaluar, en macrófagos humanos, la función de la Myo1F reportada en este trabajo.

X. REFERENCIAS

1. Villani, A.-C., Sarkizova, S. & Hacohen, N. Systems Immunology: Learning the Rules of the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* (2018).doi:10.1146/annurev-immunol
2. Yatim, K. M. & Lakkis, F. G. A brief journey through the immune system. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* (2015).doi:10.2215/CJN.10031014
3. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
4. Guerriero, J. L. Macrophages: The Road Less Traveled, Changing Anticancer Therapy. *Trends Mol. Med.* (2018).doi:10.1016/j.molmed.2018.03.006
5. Kasmí, K. C. EL & Stenmark, K. R. Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function. *Semin. Immunol.* (2015).doi:10.1016/j.smim.2015.09.001
6. Taylor, P. R. *et al.* MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* (2005).doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816
7. Ocaña-Guzman, R., Vázquez-Bolaños, L. & Sada-Ovalle, I. Receptors That Inhibit Macrophage Activation: Mechanisms and Signals of Regulation and Tolerance. *J. Immunol. Res.* (2018).doi:10.1155/2018/8695157
8. Glass, C. K. & Natoli, G. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat. Immunol.* (2016).doi:10.1038/ni.3306
9. Mowat, A. M. & Agace, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* (2014).doi:10.1038/nri3738
10. Maloy, K. J. & Powrie, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* (2011).doi:10.1038/nature10208
11. Isidro, R. A. & Appleyard, C. B. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* (2016).doi:10.1152/ajpgi.00123.2016
12. Kühn, A. A., Erben, U., Kredel, L. I. & Siegmund, B. Diversity of intestinal macrophages in inflammatory bowel diseases. *Front. Immunol.* (2015).doi:10.3389/fimmu.2015.00613
13. Gabanyi, I. *et al.* Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell* (2016).doi:10.1016/j.cell.2015.12.023
14. Bain, C. C. & Mowat, A. M. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunol. Rev.* (2014).doi:10.1111/imr.12192
15. Eichele, D. D. & Kharbanda, K. K. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* (2017).doi:10.3748/wjg.v23.i33.6016
16. Jeengar, M. K., Thummuri, D., Magnusson, M., Naidu, V. G. M. & Uppugunduri, S. Uridine Ameliorates Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Sci. Rep.* (2017).doi:10.1038/s41598-017-04041-9
17. Steinbach, E. C. & Plevy, S. E. The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* (2014).doi:10.1097/MIB.0b013e3182a69dca
18. Laukoetter, M. G., Nava, P. & Nusrat, A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **14**, 401–407 (2008).
19. Bauer, C. *et al.* Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut* **59**, 1192–1199 (2010).
20. Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* (2010).doi:10.1038/ni.1937

21. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 541–566 (2017).
22. Shapouri-Moghaddam, A. *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* (2018).doi:10.1002/jcp.26429
23. Vogel, D. Y. S. *et al.* Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* (2014).doi:10.1016/j.imbio.2014.05.002
24. Bohlsón, S. S., O’Conner, S. D., Hulsebus, H. J., Ho, M. M. & Fraser, D. A. Complement, C1Q, and C1q-related molecules regulate macrophage polarization. *Front. Immunol.* (2014).doi:10.3389/fimmu.2014.00402
25. Bosurgi, L. *et al.* Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science (80-.).* (2017).doi:10.1126/science.aai8132
26. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* (2016).doi:10.1016/j.immuni.2016.02.015
27. Valledor, A. F., Comalada, M., Santamaría-Babi, L. F., Lloberas, J. & Celada, A. Macrophage Proinflammatory Activation and Deactivation. A Question of Balance. *Adv. Immunol.* (2010).doi:10.1016/B978-0-12-380995-7.00001-X
28. Martínez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, (2014).
29. Wager, C. M. L. *et al.* STAT1 signaling within macrophages is required for antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* **83**, 4513–4527 (2015).
30. Ehrt, S. Reprogramming of the Macrophage Transcriptome in Response to Interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: Signaling Roles of Nitric Oxide Synthase-2 and Phagocyte Oxidase. *J. Exp. Med.* **194**, 1123–1140 (2001).
31. Czimmerer, Z. *et al.* The Transcription Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation of Alternatively Polarized Macrophages. *Immunity* **48**, 75–90.e6 (2018).
32. Zhang, L., Dong, Y., Dong, Y., Cheng, J. & Du, J. Role of integrin- β 3 protein in macrophage polarization and regeneration of injured muscle. *J. Biol. Chem.* (2012).doi:10.1074/jbc.M111.292649
33. Tassioulas, I. *et al.* Amplification of IFN- α -induced STAT1 activation and inflammatory function by Syk and ITAM-containing adaptors. *Nat. Immunol.* **5**, 1181–1189 (2004).
34. Hu, X., Chakravarty, S. D. & Ivashkiv, L. B. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol. Rev.* (2008).doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00707.x
35. Lucas, D. M., Lokuta, M. a, McDowell, M. a, Doan, J. E. & Paulnock, D. M. Analysis of the IFN-gamma-signaling pathway in macrophages at different stages of maturation. *J. Immunol.* (1998).
36. Meng, F. & Lowell, C. A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* (1997).doi:10.1084/jem.185.9.1661
37. Andreakos, E. *et al.* Distinct pathways of LPS-induced NF- κ B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. *Blood* (2004).doi:10.1182/blood-2003-04-1356
38. Seow, V. *et al.* Inflammatory Responses Induced by Lipopolysaccharide Are Amplified in Primary Human Monocytes but Suppressed in Macrophages by Complement Protein C5a. *J. Immunol.* (2013).doi:10.4049/jimmunol.1301355
39. Ariel, A., Maridonneau-Parini, I., Rovere-Querini, P., Levine, J. S. & Mühl, H.

- Macrophages in inflammation and its resolution. *Front. Immunol.* (2012).doi:10.3389/fimmu.2012.00324
40. Li, Y. Y., Hsieh, L. L., Tang, R. P., Liao, S. K. & Yeh, K. Y. Interleukin-6 (IL-6) released by macrophages induces IL-6 secretion in the human colon cancer HT-29 cell line. *Hum. Immunol.* (2009).doi:10.1016/j.humimm.2009.01.004
 41. LaPorte, S. L. *et al.* Molecular and Structural Basis of Cytokine Receptor Pleiotropy in the Interleukin-4/13 System. *Cell* (2008).doi:10.1016/j.cell.2007.12.030
 42. Oeser, K., Maxeiner, J., Symowski, C., Stassen, M. & Voehringer, D. T cells are the critical source of IL-4/IL-13 in a mouse model of allergic asthma. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* (2015).doi:10.1111/all.12705
 43. Gong, M., Zhuo, X. & Ma, A. STAT6 Upregulation Promotes M2 Macrophage Polarization to Suppress Atherosclerosis. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* (2017).doi:10.12659/MSMBR.904014
 44. Gómez-Suárez, M. *et al.* 14-3-3 Proteins regulate Akt Thr308 phosphorylation in intestinal epithelial cells. *Cell Death Differ.* **23**, 1060–1072 (2016).
 45. Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K. & Tsatsanis, C. Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization. *J. Immunol.* (2017).doi:10.4049/jimmunol.1601515
 46. Komohara, Y. *et al.* M2 Macrophage/Microglial Cells Induce Activation of Stat3 in Primary Central Nervous System Lymphoma. *J. Clin. Exp. Hematop.* **51**, 93–99 (2011).
 47. Troutman, T. D., Bazan, J. F. & Pasare, C. Toll-like receptors, signalingadapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K. *Cell Cycle* (2012).doi:10.4161/cc.21572
 48. Nguyen, H., Ramana, C. V., Bayes, J. & Stark, G. R. Roles of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Interferon- γ -dependent Phosphorylation of STAT1 on Serine 727 and Activation of Gene Expression. *J. Biol. Chem.* **276**, 33361–33368 (2001).
 49. Porta, C., Paglino, C. & Mosca, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front. Oncol.* (2014).doi:10.1109/ICOSP.2006.345786
 50. Covarrubias, A. J., Aksoylar, H. I. & Horng, T. Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling. *Semin. Immunol.* (2015).doi:10.1016/j.smim.2015.08.001
 51. Diaz-Guerra, M. J. M., Castrillo, A., Martin-Sanz, P. & Bosca, L. Negative regulation by phosphatidylinositol 3-kinase of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *J. Immunol.* (1999).doi:10.4049/jimmunol.180.6.4218
 52. Luyendyk, J. P. *et al.* Genetic Analysis of the Role of the PI3K-Akt Pathway in Lipopolysaccharide-Induced Cytokine and Tissue Factor Gene Expression in Monocytes/Macrophages. *J. Immunol.* (2008).doi:10.4049/jimmunol.180.6.4218
 53. Fan, W. *et al.* FoxO1 regulates Tlr4 inflammatory pathway signalling in macrophages. *EMBO J.* (2010).doi:10.1038/emboj.2010.268
 54. Ruckerl, D. *et al.* Induction of IL-4R α -dependent microRNAs identifies PI3K/Akt signaling as essential for IL-4-driven murine macrophage proliferation in vivo. *Blood* (2012).doi:10.1182/blood-2012-02-408252
 55. Arranz, A. *et al.* Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2012).doi:10.1073/pnas.1119038109
 56. Konrad, S. *et al.* Phosphoinositide 3-kinases α and β , linkers of coordinate C5a receptor-Fc γ receptor activation and immune complex-induced inflammation. *J. Biol. Chem.* (2008).doi:10.1074/jbc.M804617200
 57. Sakai, K. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxide synthesis in macrophage:

- Critical dimerization of inducible nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* (2006).doi:10.1074/jbc.M601896200
58. Newman, K. D., Elamanchili, P., Kwon, G. S. & Samuel, J. Protein and surface effects on monocyte and macrophage adhesion, maturation, and survival. *J. Biomed. Mater. Res.* (2002).doi:10.1002/jbm.10043
 59. Irwin, E. F. *et al.* Modulus-dependent macrophage adhesion and behavior. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* (2008).doi:10.1163/156856208786052407
 60. Evans, R. *et al.* Integrins in immunity. *J. Cell Sci.* (2009).doi:10.1242/jcs.019117
 61. Ata, R. & Antonescu, C. N. Integrins and cell metabolism: An intimate relationship impacting cancer. *Int. J. Mol. Sci.* (2017).doi:10.3390/ijms18010189
 62. Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res.* (2010).doi:10.1007/s00441-009-0834-6
 63. Margadant, C., Monsuur, H. N., Norman, J. C. & Sonnenberg, A. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* (2011).doi:10.1016/j.ceb.2011.08.005
 64. Arnaout, M. A. Biology and structure of leukocyte $\beta 2$ integrins and their role in inflammation. *F1000Research* (2016).doi:10.12688/f1000research.9415.1
 65. McNally, A. K. & Anderson, J. M. $\beta 1$ and $\beta 2$ integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation. *Am. J. Pathol.* (2002).doi:10.1016/S0002-9440(10)64882-1
 66. Ballana, E. *et al.* $\alpha 5$ Integrin Is the Major Contributor to the αv Integrin-Mediated Blockade of HIV-1 Replication. *J. Immunol.* (2011).doi:10.4049/jimmunol.1002693
 67. Antonov, A. S. *et al.* $\alpha 3 \beta 1$ integrin regulates macrophage inflammatory responses via PI3 kinase/Akt-dependent NF- κB activation. *J. Cell. Physiol.* (2011).doi:10.1002/jcp.22356
 68. Cha, B. H. *et al.* Integrin-Mediated Interactions Control Macrophage Polarization in 3D Hydrogels. *Adv. Healthc. Mater.* (2017).doi:10.1002/adhm.201700289
 69. Su, X. *et al.* Antagonizing integrin $\beta 3$ increases immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* (2016).doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2663
 70. Honda, S. *et al.* Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood* (2009).doi:10.1182/blood-2008-07-169136
 71. Li, F., Zhang, Y. & Wu, C. Integrin-linked kinase is localized to cell-matrix focal adhesions but not cell-cell adhesion sites and the focal adhesion localization of integrin-linked kinase is regulated by the PINCH-binding ANK repeats. *J. Cell. Sci.* (1999).doi:10.1006/cimm.1996.1057
 72. Legate, K. R., Montañez, E., Kudlacek, O. & Fässler, R. ILK, PINCH and parvin: The tIPP of integrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2006).doi:10.1038/nrm1789
 73. Pasquet, J. M., Noury, M. & Nurden, A. T. Evidence that the platelet integrin $\alpha IIb \beta 3$ is regulated by the integrin-linked kinase, ILK, in a PI3-kinase dependent pathway. *Thromb. Haemost.* (2002).doi:10.1017/S1355617715000740
 74. Sweeney, H. L. & Houdusse, A. Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism. *Annu. Rev. Biophys.* (2010).doi:10.1146/annurev.biophys.050708.133751
 75. Hartman, M. A. & Spudich, J. A. The myosin superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 1627–1632 (2012).
 76. Syamaladevi, D. P., Spudich, J. A. & Sowdhamini, R. Structural and functional insights on the myosin superfamily. *Bioinform. Biol. Insights* (2012).doi:10.4137/BBI.S8451
 77. Krendel, M. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology* (2005).doi:10.1152/physiol.00014.2005

78. Maravillas-Montero, J. L. & Santos-Argumedo, L. The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *J. Leukoc. Biol.* **91**, 35–46 (2012).
79. Santos-Argumedo, L., Maravillas-Montero, J. L. & López-Ortega, O. Class I myosins in B-cell physiology: Functions in spreading, immune synapses, motility, and vesicular traffic. *Immunol. Rev.* (2013).doi:10.1111/imr.12105
80. Patino-Lopez, G. *et al.* Myosin 1G is an abundant class I myosin in lymphocytes whose localization at the plasma membrane depends on its ancient divergent pleckstrin homology (PH) domain (Myo1PH). *J. Biol. Chem.* (2010).doi:10.1074/jbc.M109.086959
81. Cheng, J., Grassart, A. & Drubin, D. G. Myosin 1E coordinates actin assembly and cargo trafficking during clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* (2012).doi:10.1091/mbc.E11-04-0383
82. Bond, L. M., Brandstaetter, H., Kendrick-Jones, J. & Buss, F. Functional roles for myosin 1c in cellular signaling pathways. *Cell. Signal.* (2013).doi:10.1016/j.cellsig.2012.09.026
83. Makowska, K. A. A., Hughes, R. E. E., White, K. J. J., Wells, C. M. M. & Peckham, M. Specific Myosins Control Actin Organization, Cell Morphology, and Migration in Prostate Cancer Cells. *Cell Rep.* (2015).doi:10.1016/j.celrep.2015.11.012
84. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. & Horwitz, A. R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2009).doi:10.1038/nrm2786
85. Maravillas-Montero, J. L., Gillespie, P. G., Patino-Lopez, G., Shaw, S. & Santos-Argumedo, L. Myosin 1c Participates in B Cell Cytoskeleton Rearrangements, Is Recruited to the Immunologic Synapse, and Contributes to Antigen Presentation. *J. Immunol.* (2011).doi:10.4049/jimmunol.1004018
86. McIntosh, B. B. & Ostap, E. M. Myosin-I molecular motors at a glance. *J. Cell Sci.* (2016).doi:10.1242/jcs.186403
87. Kim, S. V. & Flavell, R. A. Myosin I: From yeast to human. *Cell. Mol. Life Sci.* (2008).doi:10.1007/s00018-008-7435-5
88. Kim, S. V. *et al.* Modulation of cell adhesion and motility in the immune system by Myo1f. *Science (80-.)*. **314**, 136–139 (2006).
89. Crozet, F. *et al.* Cloning of the genes encoding two murine and human cochlear unconventional type I myosins. *Genomics* (1997).doi:10.1006/geno.1996.4526
90. Hasson, T. *et al.* Mapping of unconventional myosins in mouse and human. *Genomics* (1996).doi:10.1006/geno.1996.0488
91. Chen, C. L., Wang, Y., Sesaki, H. & Iijima, M. Myosin I links PIP3 signaling to remodeling of the actin cytoskeleton in chemotaxis. *Sci. Signal.* **5**, (2012).
92. Salvermoser, M. *et al.* Myosin 1f is specifically required for neutrophil migration in 3D environments during acute inflammation. *Blood* (2018).doi:10.1182/blood-2017-10-811851
93. Wenzel, J., Ouderkerk, J. L., Krendel, M. & Lang, R. Class I myosin Myo1e regulates TLR4-triggered macrophage spreading, chemokine release, and antigen presentation via MHC class II. *Eur. J. Immunol.* **45**, 225–237 (2015).
94. Medina-Contreras, O. *et al.* CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 4787–4795 (2011).
95. Babbin, B. A. *et al.* Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *J. Immunol.* **181**, 5035–5044 (2008).
96. Fernández-Martínez, E. *et al.* Hepatoprotective effects of nonpolar extracts from

- inflorescences of thistles *Cirsium vulgare* and *Cirsium ehrenbergii* on Acute liver damage in rat. *Pharmacogn. Mag.* **13**, (2017).
97. Barman, S. *et al.* Identification of a human intestinal myeloid cell subset that regulates gut homeostasis. *Int. Immunol.* **28**, 533–545 (2016).
 98. Vogel, D. Y. S. *et al.* Macrophages migrate in an activation-dependent manner to chemokines involved in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* (2014).doi:10.1186/1742-2094-11-23
 99. Schiller, H. B. *et al.* β 1 - And α v -class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat. Cell Biol.* (2013).doi:10.1038/ncb2747
 100. Choi, C. *et al.* Integrin α 1, myosin light chain kinase and myosin IIA are required for activation of PI3K-AKT signaling following MEK inhibition in metastatic triple negative breast cancer. *Oncotarget* (2016).doi:10.18632/oncotarget.11525
 101. Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K. & Horwitz, A. R. Integrins in cell migration - the actin connection. *J. Cell Sci.* (2009).doi:10.1242/jcs.052894
 102. Lai, D. *et al.* Identification and characterization of epithelial cells derived from human ovarian follicular fluid. *Stem Cell Res. Ther.* (2015).doi:10.1186/s13287-015-0004-6
 103. Qin, H. *et al.* Correction: SOCS3 Deficiency Promotes M1 Macrophage Polarization and Inflammation. *J. Immunol.* (2016).doi:10.4049/jimmunol.1600710
 104. Zhou, J. *et al.* Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 16158–16163 (2007).
 105. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
 106. Zhang, J., Fu, S., Sun, S., Li, Z. & Guo, B. Inflammasome activation has an important role in the development of spontaneous colitis. *Mucosal Immunol.* **7**, 1139–1150 (2014).
 107. Sommer, J. *et al.* Interleukin-6, but not the interleukin-6 receptor plays a role in recovery from dextran sodium sulfate-induced colitis. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 651–660 (2014).
 108. Neurath, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 329–342 (2014).
 109. Kim, D. H. & Cheon, J. H. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune Netw.* **17**, 25 (2017).
 110. Nakanishi, Y., Sato, T., Takahashi, K. & Ohteki, T. IFN- γ -dependent epigenetic regulation instructs colitogenic monocyte/macrophage lineage differentiation in vivo. *Mucosal Immunol.* 1–10 (2018).doi:10.1038/mi.2017.104
 111. Pola, C., Formenti, S. C. & Schneider, R. J. Vitronectin- α v β 3 integrin engagement directs hypoxia-resistant mTOR activity and sustained protein synthesis linked to invasion by breast cancer cells. *Cancer Res.* (2013).doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-0218
 112. McDonald, P. C., Fielding, A. B. & Dedhar, S. Integrin-linked kinase--essential roles in physiology and cancer biology. *J. Cell Sci.* (2008).doi:10.1242/jcs.017996
 113. Kim, S. H., Turnbull, J. & Guimond, S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* (2011).doi:10.1530/JOE-10-0377
 114. Delcommenne, M. & Streuli, C. H. Control of integrin expression by extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* (1995).doi:10.1074/jbc.270.45.26794
 115. Wesley, R. B., Meng, X., Godin, D. & Galis, Z. S. Extracellular matrix modulates

- macrophage functions characteristic to atheroma: Collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1998).doi:10.1161/01.ATV.18.3.432
116. Takeuchi, O. & Akira, S. Epigenetic control of macrophage polarization. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2490–2493 (2011).
 117. Qiao, Y. *et al.* Synergistic activation of inflammatory cytokine genes by interferon- γ -induced chromatin remodeling and toll-like receptor signaling. *Immunity* **39**, 454–469 (2013).
 118. Yoon, S. *et al.* NF- κ B and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells. *Oncogene* **31**, 3467–3481 (2012).
 119. Cogswell, J. P. *et al.* NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J. Immunol.* **153**, 712–23 (1994).
 120. Bourke, L. T., Knight, R. A., Latchman, D. S., Stephanou, A. & McCormick, J. Signal transducer and activator of transcription-1 localizes to the mitochondria and modulates mitophagy. *Jak-Stat* **2**, e25666 (2013).
 121. Hu, X. *et al.* Sensitization of IFN- γ Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat. Immunol.* **3**, 859–866 (2002).
 122. Hart, J. R., Liao, L., Yates, J. R. & Vogt, P. K. Essential role of Stat3 in PI3K-induced oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 13247–13252 (2011).
 123. Barnholt, K. E., Kota, R. S., Aung, H. H. & Rutledge, J. C. Adenosine Blocks IFN- γ -Induced Phosphorylation of STAT1 on Serine 727 to Reduce Macrophage Activation. *J. Immunol.* **183**, 6767–6777 (2009).
 124. Bai, D., Ueno, L. & Vogt, P. K. Akt-mediated regulation of NF κ B and the essentialness of NF κ B for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int. J. Cancer* **125**, 2863–2870 (2009).
 125. Tapia-Abellán, A. *et al.* Regulatory role of PI3K-protein kinase B on the release of interleukin-1 β in peritoneal macrophages from the ascites of cirrhotic patients. *Clin. Exp. Immunol.* **178**, 525–536 (2014).
 126. Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. & Sitia, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* **9**, 1503–10 (1990).
 127. Evavold, C. L. *et al.* The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity* (2017).doi:10.1016/j.immuni.2017.11.013
 128. Harris, J. *et al.* Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting Pro-IL-1 β for degradation. *J. Biol. Chem.* **286**, 9587–9597 (2011).