



TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VÍA NO CANÓNICA  
DE WNT5A EN EL FENOTIPO AGRESIVO DE LOS  
SINOVIOCITOS REUMATOIDES Y DE SU  
POTENCIALIDAD COMO DIANA TERAPÉUTICA  
PARA LA ARTRITIS REUMATOIDE**

Ángela Rodríguez Trillo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2021



D./Dña. **Ángela Rodríguez Trillo**

Título da  
tese: **Estudio del papel de la vía no canónica de WNT5A en el fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides y de su potencialidad como diana terapéutica para la artritis reumatoide**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirмо que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela, 26 de mayo de 2021.**

**Firma electrónica**



## **AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES Y TUTOR DE LA TESIS**

### **Estudio del papel de la vía no canónica de WNT5A en el fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides y de su potencialidad como diana terapéutica para la artritis reumatoide**

D<sup>a</sup>. Carmen Conde Muro  
D. Antonio González Martínez-Pedrayo  
D. Juan Bautista Zalvide Torrente

INFORMA/N:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D<sup>a</sup>. Ángela Rodríguez Trillo, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación de la doctoranda fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 26 de mayo de 2021

Fdo. Carmen Conde  
Muro (directora)

Fdo. Antonio González  
Martínez-Pedrayo (director)

Fdo. Juan Bautista  
Zalvide Torrente (tutor)





La autora declara que no tiene conflictos de interés



*Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han hecho posible la realización de este trabajo de tesis.*

*A mis directores de tesis, Carmen Conde y Antonio González, gracias por vuestro constante apoyo y asesoramiento en esta etapa. A mis compañeras de laboratorio, Nerea, Carmen, Ángeles, Lorena, Cristina y Sonia, y a Marta y Luís. Sin todos vosotros esta etapa habría sido mucho más difícil.*

*A mi familia y amigos, por el cariño y apoyo incondicional a lo largo de estos años.*

*Gracias a todos*



## RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica con una prevalencia mundial del 0,5 – 1% caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas. Cursa con dolor, edema y, en ausencia del tratamiento adecuado, destrucción progresiva de las articulaciones afectas. La aparición de terapias biológicas ha supuesto un gran avance en el tratamiento de la AR. Sin embargo, entre un 20 – 30 % de pacientes no responden a estos tratamientos, y un 40% lo hace parcialmente, por lo que se ha especulado con la posibilidad de un efecto techo de los tratamientos que se dirigen contra dianas inflamatorias. Por ello, existe un gran interés en explorar otras áreas en busca de nuevas dianas terapéuticas, entre las que destacan los mecanismos responsables de la adquisición del fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides. Durante el proceso inflamatorio de la AR, los sinoviocitos tipo fibroblasto (FLS) sufren graves alteraciones y adquieren un fenotipo activado que se caracteriza por un crecimiento descontrolado, la resistencia a la apoptosis, capacidad de migración e invasión y producción de mediadores inflamatorios y metaloproteasas que degradan el cartílago. Sin embargo, a pesar de su papel clave en la patogenia de la enfermedad todavía no se han desarrollado terapias frente a estas células.

WNT5A es un ligando representativo de la vía de señalización no canónica de WNT implicado en la regulación de la migración y polaridad celular durante la morfogénesis embrionaria. De hecho, su expresión es más abundante durante las primeras etapas del desarrollo. Sin embargo, en tejidos adultos se ha encontrado una expresión mantenida o aumentada en diversas patologías, que incluyen cáncer y varios trastornos inflamatorios como aterosclerosis, psoriasis y AR. De hecho, varios estudios sugieren la contribución de WNT5A en diferentes aspectos de la patogenia de la AR.

Nuestros resultados indican que WNT5A contribuye al fenotipo agresivo de los FLS reumatoides promoviendo su capacidad de migración e invasión. Este efecto fue demostrado no solo con la adición de rWnt5a, sino también con el silenciamiento de la expresión endógena de WNT5A. Además, hemos encontrado que este efecto modulador es específico de FLS de pacientes con AR, ya que el tratamiento con rWnt5a en FLS de pacientes con OA no incrementó su capacidad de migración e invasión. La nueva contribución de WNT5A a la migración e invasión de sinoviocitos reumatoides completa la ya conocida participación de este ligando en la inducción de mediadores inflamatorios por estas células. En este sentido, nuestro estudio

confirma la inducción de IL6 y CXCL8/IL8, y muestra también que quimioquinas, como CCL2 y CXCL5, y metaloproteasas de matriz, como MMP1, MMP3, MMP9 y MMP13, son inducidas por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides. Nuestros resultados han mostrado que, en los sinoviocitos reumatoides, la señalización de WNT5A requiere al receptor RYK. Esta interacción activó las vías de señalización no canónica WNT/Ca<sup>2+</sup> y la rama de la vía PCP que involucra a ROCK. Además, la señalización de la vía WNT5A/RYK conduce, a través de ROCK, a la activación de las MAP quinasas p38 y ERK y de la vía PI3K/AKT.

Por otro lado, en este trabajo de tesis se ha mostrado que en el modelo murino de artritis por transferencia de suero K/BxN la inhibición de ROCK, mediante el inhibidor específico Y-27632, redujo la severidad de la artritis junto con disminución de la inflamación sinovial, daño del cartílago y erosión ósea, así como reducción de la producción de mediadores inflamatorios en el tejido articular. Así, un hallazgo de gran relevancia en nuestro trabajo es la marcada reducción de la erosión ósea en los ratones artríticos tratados con Y-27632. Esto se debe a la disminución de la diferenciación hacia osteoclastos, así como a la reducción de su capacidad funcional, como se observó en experimentos *in vitro*. Además, nuestros resultados muestran que este efecto no es característico del modelo de artritis murina, sino que es extensible a la AR, puesto que la inhibición de ROCK redujo la diferenciación y función de los osteoclastos de pacientes con AR.

El conjunto de los datos obtenidos en este trabajo de tesis muestra, por primera vez, la contribución de la señalización de WNT5A/RYK/ROCK en el fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides y en la erosión ósea, en el contexto de la artritis reumatoide.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. ARTRITIS REUMATOIDE</b> .....	<b>3</b>
1.1. ASPECTOS GENERALES.....	3
1.2. ETIOLOGÍA.....	3
1.2.1.Factores genéticos.....	3
1.2.2.Factores epigenéticos.....	5
1.2.3.Factores ambientales.....	6
1.3. PATOGENIA.....	7
1.3.1.Fases de la artritis reumatoide.....	7
1.3.2.Mediadores inflamatorios y metaloproteasas.....	11
1.3.3.Células implicadas en la patogenia de la artritis reumatoide.....	13
1.3.4.Características de los sinoviocitos reumatoides.....	16
1.3.5.Vías de señalización intracelular y factores de transcripción en los sinoviocitos reumatoides.....	18
1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN.....	21
1.5. TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	23
<b>2. WNT5A</b> .....	<b>27</b>
2.1. ESTRUCTURA.....	27
2.2. RECEPTORES DE WNT5A.....	30
2.2.1.Receptores frizzled.....	30
2.2.2.Correceptores no canónicos: receptores tirosina quinasa.....	31
2.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE WNT5A.....	33
2.3.1.Vía canónica de WNT.....	33
2.3.2.Vía no canónica de WNT.....	35
2.4. ASPECTOS FUNCIONALES DE LA SEÑALIZACIÓN DE WNT5A.....	39
2.5. IMPLICACIÓN DE WNT5A EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.....	42
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>47</b>
<b>1.SINOVIOCITOS TIPO FIBROBLASTO</b> .....	<b>49</b>
1.1. Aislamiento y cultivo celular de sinoviocitos tipo fibroblasto.....	49
1.2. Tratamientos.....	49

1.3. Silenciamiento deL GEN <i>WNT5A</i> y de los receptores de la vía no canónica de <i>WNT5A</i> .....	50
1.4. Ensayo de migración.....	50
1.5. Ensayo de invasión .....	51
1.6. Ensayo de proliferación .....	52
2.RATONES .....	52
2.1. Genotipado de ratones KRN .....	53
2.2. Modelo de artritis pasiva por transferencia de suero K/BxN.....	55
2.3. Tratamientos y evolución de la artritis en el modelo murino .....	55
2.4. Obtención y procesamiento de las articulaciones .....	57
2.5. Análisis histológico.....	57
2.6. Osteoclastogénesis <i>in vitro</i> y ensayo de resorción ósea en ratones artríticos .....	58
2.7. Obtención de osteoblastos y ensayo de mineralización.....	59
3. MONOCITOS.....	60
3.1. Aislamiento de monocitos humanos .....	60
3.2. Tratamientos .....	61
3.3. Osteoclastogénesis <i>in vitro</i> y ensayo de resorción ósea .....	61
4.TÉCNICAS GENERALES.....	62
4.1. Extracción de ARN.....	62
4.2. Síntesis de ADNc.....	62
4.3. PCR en tiempo real (RT-PCR) o PCR cuantitativa (qPCR) .....	62
4.4. Extracción de proteínas.....	63
4.5. Western blot.....	63
4.6. Análisis estadístico .....	64
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>67</b>
1.1. Expresión de <i>WNT5A</i> en sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide y pacientes con artrosis .....	69
1.2. <i>WNT5A</i> promueve la migración e invasión de los sinoviocitos reumatoides.....	69
1.3. La supresión de <i>WNT5A</i> disminuye la capacidad de migración e invasión de los sinoviocitos reumatoides.....	71
1.4. <i>WNT5A</i> no modula la capacidad de proliferación de los sinoviocitos reumatoides. .	73
1.5. <i>WNT5A</i> induce la expresión de mediadores inflamatorios y metaloproteasas en los sinoviocitos de pacientes con AR .....	74

1.6. La señalización de WNT5A en los sinoviocitos reumatoides depende del receptor RYK.....	78
1.7. WNT5A estimula la migración de los sinoviocitos reumatoides a través de las vías WNT/Ca <sup>2+</sup> y RhoA/ROCK.....	81
1.8. WNT5A activa las vías p38 y ERK MAPK y PI3K/AKT en sinoviocitos reumatoides .....	84
1.9. WNT5A activa las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT a través del receptor RYK y la vía de señalización ROCK .....	86
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>91</b>
2.1. La inhibición de ROCK disminuye la severidad de la artritis en el modelo murino por transferencia de suero K/BxN .....	93
2.2. La inhibición de ROCK disminuye la respuesta inflamatoria en el tejido articular de ratones artríticos .....	96
2.3. La diferenciación y función de osteoclastos de ratones artríticos disminuye tras la inhibición de ROCK.....	98
2.4. La inhibición de ROCK no modula a los osteoblastos en ratones artríticos .....	101
2.5. La inhibición de ROCK reduce la diferenciación y función de los osteoclastos en pacientes con AR.....	101
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>105</b>
1. 1.WNT5A contribuye al fenotipo agresivo de los FLS de pacientes con AR promoviendo su capacidad de migración e invasión y la expresión de mediadores inflamatorios.....	107
2. 2.El inhibidor específico de ROCK, Y-27632, disminuye la severidad de la artritis en el modelo murino de artritis pasiva por transferencia de suero K/BxN .....	115
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>149</b>



## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>MEM</b>	<i>Minimum Essential Eagle – alpha modification</i>	<b>CEIC</b>	Comité de Ética en Investigación Clínica
<b><math>\alpha</math>-ROR2</b>	Anticuerpo anti-ROR2	<b>CIA</b>	Artritis inducida por colágeno
<b><math>\alpha</math>-RYK</b>	Anticuerpo anti-RYK	<b>CK1</b>	Caseína quinasa 1
<b>ACPA</b>	Autoanticuerpo anti-proteínas citrulinadas	<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>ACR</b>	Colegio Americano de Reumatología	<b>CRD</b>	Dominio rico en cisteínas
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>Daam1</b>	Activador de morfogénesis 1 asociado a Dishevelled
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario	<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>AKT</b>	Proteína quinasa B	<b>DAS28</b>	<i>Disease activity score 28</i>
<b>APC</b>	Proteína poliposis coli adenomatosa	<b>DKK/1</b>	Dickkopf 1
<b>APC</b>	Células presentadoras de antígenos	<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1	<b>DNAsa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>AR</b>	Artritis reumatoide	<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>ARF6</b>	Factor de ribosilación de ADP 6	<b>DVL</b>	Proteína Dishevelled
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>EC</b>	Epítipo compartido
<b>ARNm</b>	ARN mensajero	<b>EDTA</b>	Ácidoetilaminotetra- acético
<b>BAPTA-AM</b>	1,2-bis (2 aminofenoxi) etano- N, N, N, N- ácido tetraacético	<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-liked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
<b>bFGF</b>	Factor básico de crecimiento de fibroblastos	<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señal extracelular
<b>BPC</b>	Buena Práctica Clínica	<b>EULAR</b>	Liga Europea contra las enfermedades reumáticas
<b>CAMKII</b>	Proteína quinasa II dependiente de calmodulina	<b>EVI</b>	<i>Evenness Interrupted</i>
<b>CDAI</b>	Índice clínico de actividad de la enfermedad	<b>FAK</b>	Quinasa de adhesión focal
<b>CEBEGA</b>	Centro de Biomedicina Experimental de la USC	<b>FAME</b>	Fármaco modificador de la enfermedad
<b>CEEA</b>	Comité de Ética de experimentación animal	<b>FAMEb</b>	Fármaco modificador de la enfermedad biológico
		<b>FAMEs</b>	Fármaco modificador de la enfermedad sintético

<b>FAMEsc</b>	Fármaco modificador de la enfermedad sintético convencional	<b>LOPD</b>	Ley de Protección de Datos de Carácter Personal
<b>FAMEsd</b>	Fármaco modificador de la enfermedad sintético dirigido	<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino	<b>LRP5/6</b>	Correceptor de lipoproteínas de baja densidad de tipo 5 y 6
<b>FLS</b>	Sinoviocitos tipo fibroblasto	<b>LY 294002</b>	Inhibidor PI3K
<b>FR</b>	Factor reumatoide	<b>LYP</b>	Fosfatasa de tirosina linfoide
<b>FZD</b>	Receptor Frizzled	<b>MAPK</b>	Proteína quinasas activadas por mitógeno
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicanos	<b>MAPKK</b>	MAPK quinasa
<b>GC</b>	Glucocorticoide	<b>MAPKKK</b>	MAPK quinasa quinasa
<b>GCSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos	<b>MCSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos	<b>MHC-II</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado a proteínas G	<b>miARN</b>	microARN
<b>GPI</b>	Glucos-6-fosfato isomerasa	<b>MLC</b>	Cadena ligera de miosina
<b>GSK3β</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3β	<b>MMP</b>	Metaloproteasa de matriz
<b>H&amp;E</b>	Tinción hematoxilina y eosina	<b>MO</b>	Médula ósea
<b>HLA</b>	Sistema de antígeno leucocitario humano	<b>MSC</b>	Células madre mesenquimales
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular-1	<b>MTX</b>	Metrotrexato
<b>IFN</b>	Interferón	<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas
<b>IL</b>	Interleuquina	<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa inducible	<b>NK</b>	Células asesinas naturales "natural killer"
<b>IP3</b>	Inositoltrifosfato	<b>NOD</b>	<i>Non-obese diabetic</i> (ratón diabético no obeso)
<b>iROCK</b>	Inhibidor de ROCK	<b>NT</b>	No transfectado
<b>JAK</b>	Janus quinasa	<b>OA</b>	Artrosis
<b>JNK</b>	Quinasa N-terminal del homólogo celular del protooncogen Jun	<b>PAD</b>	Enzima peptidil arginina deiminasa
<b>KR</b>	Dominio Kringle	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>LEF</b>	Leflunomida	<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>LEF</b>	Factor estimulador linfoide		

<b>PCP</b>	Vía de polaridad celular planar	<b>siARN</b>	ARN de interferencia
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa	<b>SSZ</b>	Sulfasalacina
<b>PD 98059</b>	Inhibidor MAPK-ERK	<b>TCF</b>	Factor de células T
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>PG</b>	Prostaglandina	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3 quinasa	<b>Th1</b>	Linfocitos T cooperadores de tipo 1
<b>PIK2</b>	Cóctel de inhibidores de proteasas	<b>Th17</b>	Linfocitos T cooperados de tipo 17
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato	<b>TIMP</b>	Inhibidor de MMP
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C	<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>PLC<math>\beta</math></b>	Enzima fosfolipasa C $\beta$	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral
<b>PORCN</b>	Enzima o-acetiltransferasa porcupina	<b>TNFR</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral
<b>PTK</b>	Dominio intracelular tirosina quinasa	<b>TRAP</b>	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
<b>PTPN22</b>	Proteína intracelular de la tirosina fosfatasa N22	<b>UDPGD</b>	Enzima uridina difosfoglucosa deshidrogenasa
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno	<b>USC</b>	Universidad de Santiago de Compostela
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa	<b>VCAM-1</b>	Proteína 1 de adhesión de células vasculares
<b>RANKL</b>	Ligando de receptor activador para el factor nuclear k B	<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>RBD</b>	Dominio de unión a Rho	<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo
<b>ROCK</b>	Quinasa asociada a Rho	<b>WB</b>	Western Blot
<b>ROS</b>	Especies oxidativas reactivas	<b>WLS</b>	<i>Wntless</i>
<b>RT-PCR</b>	PCR en tiempo real	<b>WNT</b>	Wingless/Integrasa
<b>RTK</b>	Receptor tirosina quinasa	<b>Y-27632</b>	Inhibidor de ROCK
<b>rWNT5A</b>	Proteína Wnt5a recombinante		
<b>SAPK</b>	Quinasa activada por estrés		
<b>SB 203580</b>	Inhibidor MAPK-p38		
<b>SDAI</b>	Índice simplificado de actividad de la enfermedad		
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico		
<b>SF</b>	Suero fisiológico		





# **INTRODUCCIÓN**



## **1. ARTRITIS REUMATOIDE**

### **1.1. ASPECTOS GENERALES**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas que cursa con dolor, edema y, en ausencia de tratamiento adecuado, incapacidad funcional, como consecuencia de la destrucción progresiva de las articulaciones afectas.<sup>1,2</sup> Es una de las enfermedades inflamatorias más común, con una prevalencia a nivel mundial del 0,5 – 1%.<sup>3</sup> Las mujeres son tres veces más propensas que los hombres a la enfermedad, y aunque su comienzo puede ocurrir a cualquier edad, es más frecuente entre los 40 - 60 años.<sup>4</sup> Aunque la distribución de la AR es mundial, se ha observado una alta prevalencia en poblaciones nativas americanas (entre el 5-6%).<sup>1</sup> Concretamente en España, la prevalencia de la AR se sitúa en el 0,8% para las mujeres y en el 0,2% para los varones.<sup>5</sup> Además, se observa menor prevalencia en áreas rurales (0,2%) que urbanas (0,6%).

Un porcentaje importante de los pacientes con AR presenta autoanticuerpos específicos. Los autoanticuerpos más importantes son el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos que reconocen proteínas modificadas postraduccionalmente.<sup>6</sup>

### **1.2. ETIOLOGÍA**

La AR es una enfermedad de etiología desconocida, aunque la susceptibilidad a padecerla viene determinada por factores genéticos, epigenéticos y ambientales.<sup>1</sup>

#### **1.2.1. FACTORES GENÉTICOS**

La AR tiene un fuerte componente genético. Así, se ha estimado que este componente genético supone aproximadamente un 60%,<sup>7,8</sup> dejando la parte restante a factores epigenéticos y ambientales. Se han identificado más de 100 loci que contribuyen al desarrollo de la AR, la mayoría relacionados con mecanismos inmunológicos.<sup>9</sup>

Los factores genéticos más importantes asociados con la enfermedad pertenecen al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), también conocidos como sistema de antígeno leucocitario humano (HLA).<sup>8</sup> Esta asociación del HLA con la AR fue reconocida por primera vez en 1976.<sup>10</sup> Concretamente, el grupo de Stastny observó una asociación significativa entre distintos alelos del locus HLA-DRB1\*04 con la AR. Una década después, Gregersen y

col.<sup>11</sup> identificaron una secuencia conservada de 5 aminoácidos que se extiende desde la posición 70 a la 74 rodeando al bolsillo de unión a péptidos de la región hipervariable de la cadena beta de la molécula DRB1, región que participa en el reconocimiento antigénico. A esta secuencia se le denominó epítipo compartido (EC) por ser común en diferentes alelos fuertemente asociados con la AR como son: HLA-DRB1\*04 (\*0401, \*0404, \*0405, \*0408), HLA-DRB1\*01(\*0101, \*0102), HLA-DRB1\*1001 y HLA-DRB1\*1402.<sup>12</sup> El EC, al situarse en el bolsillo de unión a antígenos, resulta esencial para el reconocimiento de antígenos por las células T. Las moléculas HLA-DRB1 que contienen el EC inducen una respuesta inmunitaria adaptativa más amplia (facilitando el desarrollo de células T autorreactivas) debido su afinidad hacia ciertos péptidos y la selección de células T.<sup>8</sup> La presencia del EC además de incrementar el riesgo de padecer AR, se ha asociado con un mayor grado de destrucción articular así como la presencia de manifestaciones extraarticulares y, por tanto, una mayor gravedad de la enfermedad.<sup>13-15</sup>

A pesar del gran peso de la molécula HLA-DRB1 en la susceptibilidad a la AR, esta molécula solo representa del 30 al 50% de su componente genético<sup>16,17</sup> por ello deben existir otros genes que contribuyan en la AR fuera de esta región.<sup>18</sup> Entre ellos destaca el gen de la proteína intracelular de la tirosina fosfatasa N22 (*PTPN22*). El polimorfismo de un solo nucleótido en este gen, lleva a la sustitución de una arginina por un triptófano generando una variante funcional, denominada *R620W*, que constituye el segundo factor genético de susceptibilidad para el desarrollo de la AR.<sup>19</sup> Este gen codifica para una fosfatasa de tirosina linfocítica (LYP). La variante funcional *R620W* produce una ganancia de función de LYP que altera el umbral de activación de las células T.<sup>19,20</sup> Otros genes de susceptibilidad son: el gen *STAT4*,<sup>21,22</sup> factor de transcripción de genes específicos, incluido el interferón (IFN)  $\gamma$ , un indicador clave en la diferenciación a linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1) y de tipo 17 (Th17); el gen *TRAF1*,<sup>22</sup> regulador de la señalización de la superfamilia de receptores de TNF $\alpha$ ; el gen *CLTA4*,<sup>23</sup> que codifica un regulador negativo de las interacciones entre las células T y las células presentadoras de antígenos y el gen *PADI4*,<sup>24</sup> que codifica para la enzima peptidil arginina deiminasa tipo IV (PAD4) implicada en la generación de autoanticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA), entre otros.

## 1.2.2. FACTORES EPIGENÉTICOS

Entre los factores epigenéticos implicados en la patogenia de la AR destacan la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), la modificación de histonas y la expresión de microARNs.<sup>25</sup>

El mecanismo epigenético de metilación del ADN se basa en la adición de grupos metilo al nucleótido citosina cuando se encuentra dentro del dinucleótido CpG (citosina - fosfato - guanina), resultando en la formación de 5-metilcitosina.<sup>26,27</sup> Estas secuencias CpG se agrupan principalmente en regiones del promotor o sitios reguladores de genes por lo que la metilación del ADN provoca un silenciamiento transcripcional génico. Varios estudios demostraron una metilación anormal en células mononucleares (PMBCs), células T, sinoviocitos tipo fibroblastos (FLS) y membrana sinovial de pacientes con AR.<sup>27-30</sup> Otros estudios en FLS reumatoides revelaron la hipometilación de genes de múltiples vías relacionadas con la enfermedad: la cascada del complemento, la adhesión y migración celular, la resistencia a la apoptosis y expresión de citoquinas proinflamatorias, entre otras.<sup>31-33</sup>

Las histonas son pequeñas proteínas globulares con colas N-terminales flexibles que se proyectan desde el nucleosoma y, por tanto, están disponibles para interacciones moleculares.<sup>34</sup> Estas colas pueden estar altamente modificadas. La modificación de histonas comprende acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitilación, sumoilación, ribosilación de ADP, deiminación e isomerización de prolina. Estas modificaciones de las colas de las histonas determinan la fuerza de la interacción entre el ADN y las histonas, modulando el grado de condensación o empaquetamiento de la cromatina y permitiendo así la unión con los factores de transcripción.<sup>35</sup> Entre las modificaciones importantes de las histonas, la metilación es una modificación poco estudiada. El potenciador del homólogo zeste 2, una enzima histona-lisina N-metiltransferasa cuya función es la metilación de histonas, ha sido relacionada con la modulación de la expresión de genes relacionados con la vía de WNT, importante en la activación de los FLS.<sup>33</sup> Otra modificación de histonas relacionada con el fenotipo agresivo de los FLS en pacientes con AR es la deacetilación. Así, estudios en modelos animales de artritis con inhibidores de deacetilasa sugieren su importante papel en la patogenia de la AR atenuando la inflamación y el daño articular.<sup>36</sup>

Los microARN (miARN) son ácidos ribonucleicos (ARNs) no codificantes con aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que desempeñan un papel crítico en el control de

la expresión génica.<sup>33</sup> Los miARN producen la degradación del ARN mensajero (ARNm), modulando de esta manera las respuestas celulares.<sup>37</sup> Se han observado patrones de expresión aberrantes para varios miARN en pacientes con AR en comparación con controles sanos. En concreto, se ha descrito un aumento de expresión del miARN – 221 en FLS y membrana sinovial de pacientes con AR que induce un aumento de citoquinas inflamatorias, disminución de la tasa de apoptosis y aumento de la capacidad de migración e invasión de los FLS.<sup>33</sup> Otros miARNs con expresión aumentada en FLS de AR son el miARN-155 y el 203. Su sobreexpresión conduce a un aumento de producción de metaloproteasas e interleuquinas proinflamatorias en pacientes con AR.

### 1.2.3. FACTORES AMBIENTALES

Dentro de los factores ambientales relacionados con la AR, el tabaquismo es el factor de riesgo más estudiado y sólido asociado con la AR. Desde que en 1987 Vessey y col.<sup>38</sup> sugirieron por primera vez su implicación, múltiples trabajos han relacionado el efecto del tabaco con el desarrollo de la AR y con la presencia de autoanticuerpos y factores genéticos, como la presencia del EC.<sup>39-42</sup> El tabaco se asocia principalmente con el riesgo de AR seropositiva. La duración e intensidad del hábito tabáquico incrementan este riesgo junto con la presencia del EC.<sup>39</sup> Esto sugiere una fuerte interacción gen-ambiente entre los alelos del EC y el tabaco. La principal hipótesis patogénica de esta interacción se basa en el aumento de la expresión de la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD) en pulmones de fumadores debido a la inflamación local de la mucosa.<sup>43</sup> Esto favorece la citrulinación de proteínas, la ruptura de la tolerancia y la consecuente producción de autoanticuerpos ACPAs preferentemente en individuos portadores de genes con EC, que tienen mayor afinidad por péptidos citrulinados.<sup>44</sup> Sin embargo, también existen evidencias en contra de esta hipótesis. Varios estudios muestran una ausencia de correlación entre el tabaquismo y la citrulinación de proteínas a nivel pulmonar.<sup>45,46</sup>

En un trabajo posterior se relacionó la autoinmunidad de la AR con alteraciones en el microbioma de varios tejidos, como la mucosa oral e intestinal.<sup>47</sup> En esta línea, otros estudios mostraron que la presencia de la bacteria *Porphyromonas gingivalis* en la mucosa oral, causante de la periodontitis, se ha asociado con el riesgo de padecer AR.<sup>48,49</sup> Esta bacteria contiene proteínas citrulinadas endógenas y expresa PAD similar a la humana, por lo que puede participar en la citrulinación de péptidos y generación de ACPAs.<sup>50</sup> Así, la generación de autoanticuerpos por parte de *P. gingivalis* puede llevarse a cabo mediante un mecanismo similar

al propuesto en el pulmón con la generación de neo-autoantígenos (como péptidos citrulinados). Otro mecanismo propuesto es la activación repetida de la inmunidad innata a través de los receptores tipo Toll (TLRs) o la pérdida de tolerancia del sistema inmunológico contra autoantígenos a través del mimetismo molecular.<sup>49</sup> En este sentido, a nivel intestinal se ha descrito un aumento de bacterias del género *Prebotella* en pacientes con AR, aunque son necesarios más estudios para entender su papel.<sup>51</sup>

La exposición a cristales de sílice es el segundo factor ambiental más asociado con el riesgo de AR.<sup>52</sup> Al igual que el tabaquismo, la exposición a la sílice se ha asociado principalmente con la AR seropositiva. Otros factores de riesgo ambiental son la dieta, el consumo de alcohol, café y té, los niveles de hormonas femeninas y la administración de anticonceptivos orales, aunque las evidencias que los apoyan son limitadas.<sup>53</sup>

### **1.3. PATOGENIA**

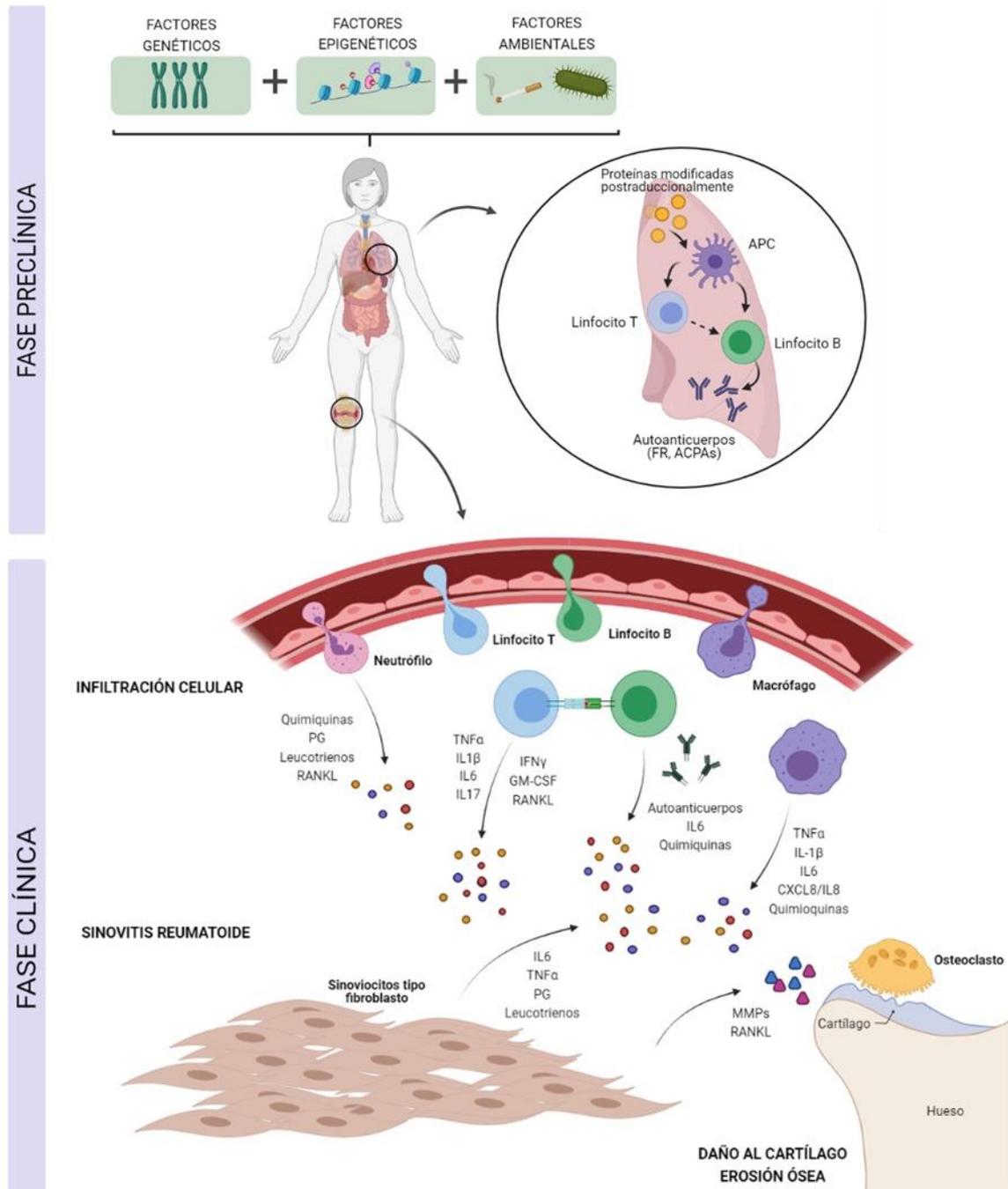
En la mayoría de los pacientes, la AR comienza varios años antes de que la enfermedad clínica sea evidente.<sup>1</sup> Así, en la patogenia de esta enfermedad se distingue una fase preclínica, en la que se inicia la respuesta autoinmune y no hay signos ni síntomas de la enfermedad y una fase clínica, caracterizada por la inflamación de la membrana sinovial que se acompaña de síntomas y, como se ha mencionado antes, puede llevar a la destrucción del cartílago y hueso articular si no se trata (Figura 1).<sup>1,54</sup>

#### **1.3.1. FASES DE LA ARTRITIS REUMATOIDE**

En la fase preclínica se detectan determinadas anomalías serológicas, como la presencia de autoanticuerpos, elevación de la proteína C reactiva y aumento de citoquinas proinflamatorias.<sup>55</sup> La AR se considera una enfermedad autoinmune por lo que la presencia de autoanticuerpos es una característica distintiva de la misma. Como vimos en el apartado anterior, varios estudios han planteado el inicio inmunológico en tejidos extraarticulares, como las mucosas, antes de localizarse en la membrana sinovial. Las modificaciones postraduccionales de proteínas que tiene lugar en estos tejidos extraarticulares pueden ser reconocidas por el sistema inmune como extrañas, debido a una pérdida de tolerancia inmunológica, desencadenando la producción de autoanticuerpos.<sup>56</sup> Las proteínas modificadas postraduccionales son reconocidas por células presentadoras de antígenos (APC), como los macrófagos, células dendríticas y células B activadas. Estos autoantígenos son reconocidos por linfocitos T circulantes que responden de

manera autorreactiva y activan a los linfocitos B, provocando la liberación de autoanticuerpos (Figura 1).

En la práctica clínica destacan el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPAs).<sup>57,58</sup> El FR, que reconoce la fracción constante de la IgG, fue el primer autoanticuerpo detectado en pacientes con AR. Sin embargo, pese a estar presente en el 60-80% de los pacientes con AR, es poco específico dado que está presente en otras enfermedades autoinmunes. El FR es producido por linfocitos B presentes en folículos linfoides y en estructuras similares a centros germinales que se desarrollan en la membrana sinovial inflamada. El FR en la AR induce la formación de inmunocomplejos en la membrana sinovial, lo que provoca la activación del complemento, la infiltración de leucocitos y el incremento de la inflamación. Los ACPAs, presentes en el 80-90% de los pacientes, aparecen tras la modificación postraduccional de proteínas conocida como deiminación o citrulinación que consiste en la transformación enzimática de los residuos de arginina en citrulina. Estos autoanticuerpos son altamente específicos de la AR y su presencia está asociada con una destrucción articular más severa, con mayor actividad de la enfermedad y peores tasas de remisión. El FR y los ACPAs son detectados en el suero de pacientes entre 10 y 14 años, respectivamente, antes de que aparezcan los síntomas.<sup>58</sup> Sin embargo, entre un 20-30% de pacientes con AR son seronegativos para estos anticuerpos.<sup>59</sup> En los últimos años se ha analizado la presencia de autoanticuerpos frente a otras modificaciones postraduccionales, entre los que destacan los anticuerpos anti-proteínas carbamiladas presentes en el 30-40% de los pacientes, los anticuerpos anti-proteínas arginina-deiminasa tipo IV en el 22-45% de pacientes con AR y anticuerpos anti-malondialdehído y malondialdehído acetaldehído, entre otros.<sup>55,57</sup>



**Figura 1. Patogénesis de la artritis reumatoide.** En el desarrollo de la AR se diferencia una fase preclínica, en la que se inicia la respuesta autoinmune, y una fase clínica. En la fase preclínica, en individuos genéticamente susceptibles sometidos a diversos factores epigenéticos y ambientales se inicia una respuesta autoinmune, con la formación de autoanticuerpos. En la fase clínica, el proceso de enfermedad migra de los órganos linfoides secundarios a los tejidos periféricos, en particular al compartimento sinovial. Esta fase se caracteriza por la infiltración de células inmunes en la membrana sinovial, las cuales liberan mediadores inflamatorios lo que estimula a los FLS de la capa íntima de la membrana sinovial. Todo ello desencadena la inflamación sinovial, también llamada sinovitis reumatoide, y posterior destrucción articular. ACPAs: autoanticuerpos anti-proteínas citrulinadas; APC: células presentadora de antígenos; FR: factor reumatoide; GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; IL: interleuquina; MMPs: metaloproteasas de matriz; PG: prostaglandinas; RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ ; TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

En la fase clínica, el proceso de enfermedad migra de los órganos linfoides secundarios a los tejidos periféricos, en particular al compartimento sinovial (Figura 1). La inflamación de la membrana sinovial en múltiples articulaciones, también llamada sinovitis reumatoide, es la característica principal de la AR. La membrana sinovial está constituida por una fina capa de tejido conectivo que recubre las superficies óseas. Esta membrana proporciona soporte estructural y nutrientes al cartílago y lubrica las superficies mediante la producción de líquido sinovial.<sup>60</sup> Está constituida por dos compartimentos anatómicos y funcionales: la capa íntima, que está en contacto con la cavidad intraarticular y la capa subíntima que se une a la cápsula fibrosa de la articulación. En condiciones fisiológicas, la capa íntima, con un grosor entre 20-40 µm, está formada por una monocapa o bicapa avascular de sinoviocitos y la subíntima, que puede tener un espesor de hasta 5 mm, consiste en un tejido conectivo constituido por algunas células, como adipocitos y fibroblastos, y capilares aislados. Esporádicamente se pueden encontrar algún macrófago o linfocito. Los sinoviocitos de la capa íntima se pueden clasificar en dos tipos diferentes, tanto inmunohistoquímica como funcionalmente: los de tipo A, con características parecidas a los macrófagos, y los de tipo B, con características parecidas a los fibroblastos.<sup>61</sup> Los sinoviocitos tipo macrófago son células con marcadores de superficie del linaje macrófago que presentan un prominente aparato de Golgi así como numerosas vacuolas, mitocondrias y filopodios. Estas células tienen la función de fagocitar sustancias exógenas presentes en la cavidad articular y pueden actuar como células presentadoras de antígenos. Los sinoviocitos tipo fibroblasto (FLS) son células mesenquimales con un extenso retículo endoplasmático granular. Los FLS son responsables del mantenimiento de la matriz sinovial con la síntesis de varios de sus componentes como laminina, colágeno, fibronectina y proteoglicanos entre otras proteínas y son los principales productores del líquido sinovial.

La sinovitis reumatoide se caracteriza por la infiltración celular leucocitaria y el crecimiento de la íntima sinovial. Así, células características de la respuesta inmune se infiltran en el compartimento sinovial, donde crean estructuras linfoides organizadas e interactúan con células residentes de la articulación.<sup>62</sup> También se observa un aumento de la producción de ACPA amplificando la inflamación mediante la activación del complemento, macrófagos y NETosis.<sup>2,8,63</sup> Además de la infiltración, se produce una gran expansión de la íntima sinovial por incremento y activación de los dos tipos de sinoviocitos, tipo fibroblasto y tipo macrófago, un aumento del líquido sinovial y una mayor vascularización en la zona afectada.

La formación de nuevos capilares o neoangiogénesis es uno de procesos histológicos que primero se observa en la sinovia inflamada, lo cual es imprescindible para la migración celular y el mantenimiento de la sinovia hipertrófica.<sup>64</sup> El aumento de la vascularización es necesario para la nutrición y crecimiento del tejido sinovial, dos pilares necesarios para la persistencia de la sinovitis crónica.

### 1.3.2. MEDIADORES INFLAMATORIOS Y METALOPROTEASAS

Como se ha comentado anteriormente, distintos tipos celulares del sistema inmunológico como neutrófilos, macrófagos, linfocitos B, células asesinas naturales (NK) y los linfocitos T migran a la membrana sinovial.<sup>65</sup> Esto conduce a la liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, metaloproteasas de matriz (MMPs) y especies oxidativas reactivas (ROS) que provocan la perpetuación de la inflamación y posterior destrucción articular.

Las citoquinas participan en múltiples procesos biológicos como el crecimiento, proliferación, diferenciación, inflamación y regulación de la respuesta inmune. Por ello, juegan un importante papel en la patogenia de la AR promoviendo la migración de leucocitos al compartimento articular, activación del sistema inmune adaptativo, proliferación de células sinoviales e inducen la secreción de quimioquinas y MMPs por parte de los sinoviocitos tipo fibroblasto que degradan el cartílago.<sup>66,67</sup> En la inflamación sinovial destaca el papel determinante de TNF $\alpha$ , interleuquina (IL) 1 $\beta$  e IL6.

El TNF $\alpha$  desempeña un importante papel en la patogenia de la AR. Se produce principalmente por macrófagos activados, pero también puede ser producido por monocitos, fibroblastos, mastocitos y células NK.<sup>67</sup> Estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B, linfocitos T y células NK así como la producción de otras citoquinas proinflamatorias como IL1, IL6, CXCL8/IL8 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Además, promueve el daño articular al inducir en los FLS la expresión de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), y la secreción de enzimas degradativas, como las MMPs, que degradan la matriz extracelular del cartílago. También se ha implicado a esta citoquina en la formación de osteoclastos independientemente del ligando de receptor activador para el factor nuclear k B (RANKL).<sup>68,69</sup>

La IL1 $\beta$  es producida principalmente por monocitos y macrófagos.<sup>70,71</sup> Esta citoquina promueve la activación de leucocitos, células endoteliales, condrocitos y osteoclastos.<sup>71</sup> Además estimula la secreción de MMPs por fibroblastos y neutrófilos, con la consiguiente degradación del cartílago.

La IL6 participa en numerosas funciones biológicas como la inmunorregulación, inflamación y hematopoyesis.<sup>72</sup> Es producida por linfocitos B, linfocitos T, monocitos, macrófagos, queratinocitos, células endoteliales, FLS y células tumorales.<sup>67,72</sup> Diversos estímulos como otras citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL1 $\beta$ ), infecciones virales o traumatismos desencadenan la producción de IL6.<sup>72</sup> Esta citoquina es la responsable de la transición de la inflamación aguda a la inflamación crónica, activando la expresión de moléculas de adhesión y la migración celular a las articulaciones afectadas. Así, la IL6 se ha relacionado con el proliferación y diferenciación de linfocitos B y T, reclutamiento de neutrófilos, producción de anticuerpos FR y ACPA, neoangiogénesis, activación de osteoclastos y desregulación de RANKL/osteoprotegerina.<sup>67,68,72</sup> Además, induce la expresión de diversas quimioquinas, principalmente atrayentes de monocitos, como: CCL2, CCL8, CXCL5 y CXCL6.<sup>70</sup>

Otras moléculas que participan en la perpetuación de la inflamación son las quimioquinas. Se trata de citoquinas quimiotácticas que regulan la migración de células inmunes en diversos procesos fisiológicos y patológicos.<sup>65</sup> Niveles elevados de quimioquinas en suero y líquido sinovial de pacientes con AR se han asociado con la gravedad y/o actividad de la enfermedad.<sup>73</sup> Son producidas principalmente por macrófagos y FLS. Se extravasan a los tejidos afectados a través de su unión a las células endoteliales y a los receptores de quimioquinas en los leucocitos del torrente sanguíneo.<sup>65,74</sup> Además de la migración leucocitaria, las quimioquinas inducen proliferación y diferenciación celular, producción de citoquinas, participan en la organización linfoide, en la regulación de la respuesta inmune adaptativa y, el consecuente, desarrollo de la memoria inmunológica.

Las quimioquinas se clasifican en cuatro grupos en función de la ubicación de los residuos de cisteína en el extremo N de su secuencia primaria de aminoácidos: XC, CC, CXC y CX3C.<sup>65,73</sup> En la patogenia de la AR, las quimioquinas CXC promueven el reclutamiento de neutrófilos (CXCL1, CXCL2, CXCL5 y CXCL8/IL8), linfocitos T (CXCL10) y linfocitos B (CXCL13) en la articulación. Las quimioquinas CC inducen el reclutamiento de monocitos (CCL2, CCL3,

CCL4, CCL5 y CCL7), linfocitos T, (CCL18, CCL19, CCL20, CCL21 y CCL25) y la entrada de linfocitos B en la zona inflamada de la articulación (CCL20).<sup>73</sup>

La degradación del cartílago articular es otra de las características de la AR. En este proceso son especialmente importantes las MMPs, enzimas secretadas por los FLS capaces de degradar moléculas de la matriz extracelular.<sup>75</sup> Las MMPs, endopeptidasas dependientes de zinc, son las principales proteasas involucradas en la invasión y degradación de barreras anatómicas. Entre ellas, las colagenasas (MMP1 y MMP13), las estromielisinas (MMP3) y las gelatinasas (MMP9) son especialmente importantes en la AR, correlacionándose la severidad de la AR con sus niveles de expresión.<sup>60</sup> Sin embargo, no parece que todas las colagenasas contribuyan al daño en la AR puesto que varios estudios han descrito el papel protector de MMP2.<sup>76,77</sup>

### **1.3.3. CÉLULAS IMPLICADAS EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE**

#### **LINFOCITOS T**

En la AR, los linfocitos T juegan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune, como se ha mencionado anteriormente, así como en la propagación de la inflamación y el daño tisular.<sup>67</sup> Los linfocitos T activan células inmunes innatas, apoyan la activación de linfocitos B, secretan varias citoquinas y estimulan la activación destructiva de condrocitos y osteoclastos.<sup>62,67</sup> En la sinovia reumatoide, el 30-50% de las células son linfocitos T, las células mononucleares más abundantes, y los linfocitos T CD4+ el principal subtipo. Este subtipo se diferencia principalmente en células efectoras Th1 y Th17 que son responsables de la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Destaca la deficiencia en la diferenciación a células efectoras del tipo Th2 responsables de producir citoquinas antiinflamatorias como IL4, IL5 e IL13.<sup>78,79</sup> Aunque se han detectado células T reguladoras que podrían suprimir la inflamación mediante la secreción de IL10 y factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), estas células parecen funcionalmente deficientes en la sinovia reumatoide.<sup>67</sup>

#### **LINFOCITOS B**

Los linfocitos B sinoviales en la AR se localizan en infiltrados difusos o formando agregados junto a los linfocitos T. De hecho, en algunos pacientes forman agregados linfoides ectópicos

similares a los centros germinales de los órganos linfoides secundarios.<sup>62</sup> Su papel patogénico en la AR ha quedado demostrado por las terapias de depleción de linfocitos B como el rituximab, un anticuerpo anti-CD20, que ha permitido el control de la enfermedad en algunos pacientes.<sup>67</sup> Los linfocitos B contribuyen a la patogenia de la AR mediante la producción de autoanticuerpos, como el FR y los ACPAs, la presentación de autoantígenos a los linfocitos T y activación de las mismas y la estimulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias, como TNF $\alpha$  e IL6, y quimioquinas que promueven la infiltración de leucocitos en las articulaciones.<sup>67</sup>

## NEUTRÓFILOS

Los neutrófilos son los primeros respondedores celulares a las agresiones patógenas agudas.<sup>80</sup> Varias moléculas presentes en la articulación inflamada como el leucotrieno B4, GM-CSF, IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL15 y TNF $\alpha$  promueven la infiltración de neutrófilos a la articulación.<sup>81</sup> Así, estas células han sido reconocidos como importantes participantes en el inicio y progresión de la AR. De hecho, se ha demostrado que la depleción de neutrófilos o la inhibición funcional de los mismos reduce la inflamación y el daño óseo en modelos experimentales de artritis.<sup>81</sup> Varias proteasas presentes en los gránulos de los neutrófilos, como la elastasa, catepsina G y proteasa 3, juegan un importante papel en el daño y la inflamación de las articulaciones activando la secreción de citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y quimioquinas.<sup>80,81</sup> Así mismo, en la AR los neutrófilos liberan diversas citoquinas, quimioquinas, prostaglandinas (PG) y leucotrienos que conducen a un aumento del perfil inflamatorio así como de RANKL, responsable de la diferenciación de los osteoclastos.

## MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células fundamentales en la fisiopatogenia de la AR. Actúan como células APC que estimulan a los linfocitos T y contribuyen considerablemente a la destrucción articular.<sup>82</sup> Constituyen la principal fuente de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, como el TNF $\alpha$  y la IL1 $\beta$ , y activan una amplia gama de células no inmunes. Sin embargo, también pueden producir citoquinas antiinflamatorias como IL10 sugiriendo la existencia de macrófagos con distintas y diversas actividades funcionales. Así, los macrófagos se caracterizan por su plasticidad fenotípica y funcional pudiendo adquirir un continuo estado de polarización dependiendo de las señales ambientales. Se distinguen dos fenotipos principales de macrófagos, llamados macrófagos M1 y M2.<sup>82,83</sup> Los macrófagos activados M1 se caracterizan por una

elevada expresión del MHC de clase II, liberación de citoquinas proinflamatorias, generación de ROS y actividad tumoricida. Por otro lado, los macrófagos activados M2 expresan altos niveles de citoquinas antiinflamatoria IL10, arginasa-1, factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF) y TGF- $\beta$ . En general, los macrófagos M1 predominan en las etapas iniciales de la inflamación mientras que los macrófagos M2 impulsan la resolución de la inflamación, angiogénesis, remodelación y reparación de tejidos. Estudios en pacientes con AR han revelado una relación M1/M2 aumentada en pacientes con enfermedad activa que promueve la osteoclastogénesis mientras que pacientes con baja actividad de la enfermedad o en remisión clínica muestran una mayor proporción de macrófagos del tipo M2.<sup>82</sup>

## OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas derivadas del linaje monocito/macrófago, capaces de resorber hueso.<sup>84</sup> Estas células tienen la función de resorber hueso en procesos normales de remodelación ósea sin embargo en ciertas patologías como la osteoporosis, artritis reumatoide o cáncer muestran un exceso de actividad dando lugar una pérdida de masa ósea.<sup>85</sup> El desarrollo de los osteoclastos está bajo el estricto control de los osteoblastos, que son las células formadoras de hueso.<sup>86</sup> Las células del linaje de osteoblastos expresan dos citoquinas esenciales para la diferenciación de osteoclastos, MCSF y RANKL, así como osteoprotegerina, un receptor señuelo para RANKL.

Durante la patogenia de la AR, los precursores de osteoclastos migran a la interfaz entre el tejido sinovial inflamado y la superficie del hueso periarticular donde sufren procesos de fusión, dando lugar a los osteoclastos multinucleados maduros.<sup>84,85,87</sup> Tras la señal de activación, los osteoclastos multinucleados se polarizan y se enfrenta a la superficie ósea a través de estructuras especializadas que se denominan podosomas y forman un ribete en cepillo, en cuyos extremos se encuentran las integrinas que se van a unir a la matriz.<sup>85</sup> De este modo, los osteoclastos se adhieren firmemente a la superficie ósea a través de interacciones con integrinas y proteínas de la matriz extracelular, así como ensamblando uniones que sellan la superficie ósea y el osteoclasto y, por tanto, separan el hueso del espacio extracelular circundante.<sup>84</sup> Las bombas de protones a lo largo del ribete en cepillo de los osteoclastos crean un medio ácido que permite la solubilización del calcio del hueso. Las enzimas de matriz sintetizadas por el osteoclasto, incluidas la catepsina k, la MMP9 y la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), son las encargadas de la degradación de la matriz ósea. Sus efectos se manifiestan tanto como erosiones

óseas localizadas en la región periarticular como por una disminución de la densidad ósea más difusa.<sup>88</sup>

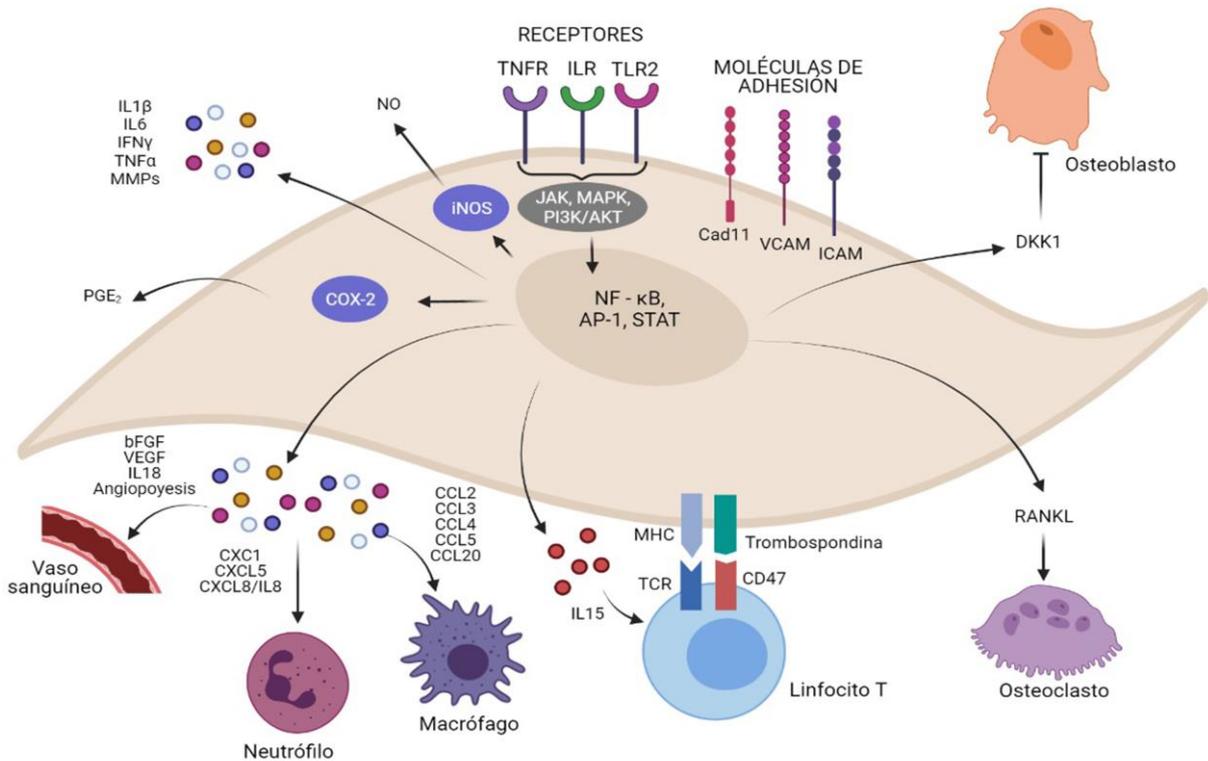
### **SINOVIOCITOS TIPO FIBROBLASTO (FLS)**

Los sinoviocitos tipo fibroblasto también llamados sinoviocitos reumatoides son células mesenquimales residentes en la membrana sinovial que expresan proteínas características del linaje de fibroblastos, como vimentina, colágeno tipo IV y V, y el marcador de superficie CD90, también conocido como glicoproteína de membrana THy-1.<sup>60,75</sup> Estas células tienen características únicas que los distinguen de otros fibroblastos. De este modo, los FLS muestran un alto contenido de proteínas de adhesión, como proteína 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1) y cadherina-11. La cadherina-11 es esencial en el mantenimiento de la integridad de la sinovia en condiciones fisiológicas por su papel clave en la agregación homotípica de los FLS. También expresan el factor de aceleración de desintegración del complemento (CD55), no presente en otros fibroblastos, y la enzima uridina difosfoglucosa deshidrogenasa (UDPGD) que les confiere la capacidad de sintetizar ácido hialurónico, componente fundamental del líquido sinovial y matriz extracelular. También secretan lubricina, otra proteína fundamental para la lubricación de las articulaciones. Además, los FLS participan en el remodelado de la membrana sinovial, con la secreción de enzimas que destruyen la matriz extracelular como las MMPs y sus inhibidores específicos (TIMPs) (Figura 2).<sup>75,89</sup>

#### **1.3.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES**

Durante el proceso inflamatorio de la AR, los FLS sufren graves alteraciones adquiriendo un fenotipo activado. Este fenotipo se mantiene en ausencia del estímulo inflamatorio y constituye la base de su comportamiento agresivo.<sup>75,89,90</sup> Este nuevo fenotipo se caracteriza el crecimiento descontrolado y la resistencia de estas células a la apoptosis.<sup>75,91</sup> Así se forma un tejido sinovial hiperplásico denominado *pannus* que actúa como un tumor localmente invasivo.<sup>60,89</sup> El *pannus* está compuesto por macrófagos, osteoclastos y FLS invasivos con relativamente pocos linfocitos. Varios estudios han sugerido que los FLS durante la AR son hiperproliferativos, dividiéndose más rápidamente que los FLS normales.<sup>92</sup> En esta línea, se ha observado sobreexpresión de varios factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), en FLS. También se han descrito mutaciones y/o sobreexpresión de proteínas que regulan la proliferación. Así, la

expresión y actividad de ERK, una proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), y de varios oncogenes, están aumentadas en la sinovia inflamada. Sin embargo, el alto grado de hiperplasia observado en la membrana sinovial no se debe únicamente a un aumento en la capacidad de proliferación de los sinoviocitos reumatoides. La resistencia de estas células a la apoptosis genera un desequilibrio entre los procesos de proliferación y apoptosis que contribuye finalmente a la hiperplasia sinovial.<sup>75,92</sup>



**Figura 2. Características de los sinoviocitos reumatoides.** Los FLS responden a diversos mediadores inflamatorios mediante la activación de múltiples vías de señalización intracelular: la vía JAK, MAPK y PI3K/AKT. Estas vías activan diversos factores de transcripción, como NF-κB, AP-1 y STAT, que inducen la expresión de múltiples citoquinas, quimioquinas y MMPs. La secreción de IL15 activa a los linfocitos T. El aumento de expresión de COX-2 e iNOS lleva al aumento de producción de PGE<sub>2</sub> y NO, respectivamente. El aumento de producción de bFGF, VEGF, IL18 y angiopoyetinas estimula la neovascularización y un aumento del flujo de sangre. La secreción de RANKL y DKK1 da como resultado un aumento de la degradación de la articulación por la activación de los osteoclastos e inhibición de los osteoblastos, respectivamente. AP-1: proteína activadora 1; bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos; Cad11: cadherina 11; COX-2: ciclooxygenasa-2; DKK1: dickkopf 1; ICAM: molécula de adhesión intracelular-1; ILR: receptor interleuquina; iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible; JAK: janus quinasa; MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; MMPs: metaloproteasas de matriz; NF-κB: factor nuclear κB; NO: óxido nítrico; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; PI3K/AKT: fosfoinositol 3 quinasa/proteína quinasa B; RANKL: ligando de receptor activado para el factor nuclear κB; TCR: receptor de células T; TLR2: receptor tipo Toll 2; TNFα: factor de necrosis tumoral; TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral; VCAM: proteína de adhesión de células vasculares; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

Además, los FLS contribuyen a perpetuar el proceso inflamatorio de la sinovia mediante diferentes mecanismos. Responden y producen mediadores inflamatorios como IL1 $\beta$ , 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 21, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ , distintas quimioquinas, péptido intestinal vasoactivo (VIP), la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y participan en la regulación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>).<sup>75,89,92</sup> Así, contribuyen a la activación de linfocitos T, neutrófilos y macrófagos. De hecho, varios factores importantes para la maduración de las células B, como el factor activador de células B (BAFF) y el ligando inductor de proliferación (APRIL), son producidos por sinoviocitos reumatoides.<sup>89</sup> Además, los FLS secretan factores proangiogénicos, incluidos el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), bFGF, IL6, IL18, VCAM-1, ICAM-1 y CXCL12 que contribuyen al crecimiento de la red de vasos sanguíneos necesaria para sostener la formación del *pannus* (Figura 2).<sup>89</sup>

Por otro lado, los sinoviocitos reumatoides adquieren la capacidad de migración e invasión, permitiéndoles adherirse al cartílago. Una característica de la activación de los FLS es la expresión de moléculas de adhesión que median su unión al cartílago.<sup>93</sup> Entre las moléculas de adhesión que contribuyen a este proceso destacan las integrinas b1, como VLA-3, VLA y VLA-5. Los FLS una vez adheridos, crean estructuras de invasión y liberan enzimas de degradación de la matriz, las MMPs.<sup>75,89</sup> Además, los FLS son importantes promotores de la erosión ósea por su capacidad para secretar RANKL. Este ligando junto con MCSF produce la diferenciación de los osteoclastos.<sup>75</sup> En este sentido, el estudio de Hardy y col.<sup>94</sup> ha mostrado que los FLS reumatoides producen Dickkopf 1 (DKK1), un antagonista de la señalización de WNT, que bloquea la función de los osteoblastos, impidiendo así la regeneración del tejido óseo.

Por lo tanto, en la artritis reumatoide los sinoviocitos tipo fibroblasto no son meros espectadores, sino agresores activos que contribuyen de forma crítica a la cronicidad y al daño de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de su papel clave en la patogenia de la enfermedad todavía no se han desarrollado terapias frente a estas células.

### **1.3.5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES**

A nivel celular, en los sinoviocitos reumatoides se activan varias vías de señalización intracelulares que conducen a la activación de diversos factores de transcripción (Figura 2).

Las principales vías de transducción de señales involucradas en la patogénesis de la AR son: la vía de janus quinasa (JAK), la vía de las MAPKs y la vía fosfoinositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/AKT).<sup>62</sup>

La vía de JAK comprende una vía de señalización entre los receptores extracelulares de citoquinas y el núcleo celular.<sup>95</sup> La familia JAK se compone de varios subtipos diferentes, en particular JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2.<sup>96</sup> Las principales citoquinas que operan a través de esta vía incluyen IL4, 6, 10, 12, 23, GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina, trombopoyetina, leptina y hormona del crecimiento. Su activación provoca un cambio conformacional y la autofosforilación de la proteína JAK que lleva a la regulación transcripcional de genes que coordinan la proliferación, diferenciación, activación y homeostasis metabólica celular.<sup>95,96</sup>

Las MAPKs comprenden una familia de quinasas serina/treonina que se dividen en tres grandes grupos: p38, quinasa N-terminal del homólogo celular del protooncogen Jun (JNK) y quinasa regulada por señal extracelular (ERK).<sup>92</sup> Las MAPKs se activan mediante una cascada de señalización que implica tres niveles: un primer nivel que incluye MAPK quinasa quinasas (MAPKKK) y responde a estímulos inflamatorios, tales como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , lipopolisacáridos (LPS) y estrés osmótico, un nivel medio de MAPK quinasa (MAPKK) activadas por MAPKKK y el tercer nivel que incluye a las MAPKs p38, JNK y ERK.<sup>75</sup> Todas ellas migran al núcleo donde fosforilan y activan importantes factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B y la proteína activadora 1 (AP-1).

La vía de las MAPKs se ha implicado en la regulación de procesos celulares como supervivencia, apoptosis, proliferación, diferenciación y estrés celular y en respuestas inflamatorias.<sup>97</sup> Concretamente en la AR, la MAPK p38 regula varios procesos, como la migración de leucocitos a la articulación, la producción de mediadores proinflamatorios (IL6, CXCL8/IL8, MMP1, MMP2, COX-2) y la angiogénesis.<sup>97</sup> Además, p38 regula la diferenciación de los osteoclastos mediante la síntesis y activación de RANKL.<sup>98</sup> La importancia de esta MAPK se ha demostrado en una amplia variedad de modelos de animales. Así, la inhibición de p38 redujo la evolución clínica de la artritis, la inflamación articular, la degradación del cartílago y la erosión ósea en el modelo de artritis inducida por pared celular estreptocócica, en el modelo de artritis inducida por colágeno tipo II (CIA) y en la artritis inducida por adyuvante.<sup>97</sup> La MAPK JNK interviene en la producción de MMP colagenasas.

De hecho, ratones deficientes para esta MAPK mostraron niveles reducidos de MMP1, MMP3 y MMP13.<sup>97</sup> Además, JNK tiene un papel en la osteoclastogénesis puesto que precursores de osteoclastos deficientes para JNK no maduran ni son capaces de resorber hueso.<sup>99</sup> Así la inhibición de Jnk en el modelo de artritis inducida por adyuvantes no solo mejoró la inflamación sino que también redujo la destrucción articular.<sup>100</sup> La MAPK ERK destaca en la AR por su papel en la fase de mantenimiento de la enfermedad al promover la formación del *pannus*, debido a la inducción de la fosfolipasa A2, la síntesis de prostaglandinas y el aumento de infiltrado celular a la articulación.<sup>97</sup>

La vía PI3K está implicada en la regulación del crecimiento celular, proliferación, supervivencia así como migración celular.<sup>101</sup> Las PI3K son una familia de enzimas que fosforilan la posición 3'-OH del anillo de inositol de los fosfoinositoides. Estas enzimas se activan gracias a una amplia variedad de estímulos como factores de crecimiento, mediadores inflamatorios, hormonas, neurotransmisores, inmunoglobulinas y antígenos. La estimulación de PI3K lleva a la activación de la proteína AKT, la cual fosforila distintas proteínas, regulando su actividad positiva o negativamente. Estas moléculas diana están involucradas en diferentes procesos celulares, que van desde la progresión del ciclo celular a la supervivencia celular, desgranulación, metabolismo, biogénesis ribosomal, traducción, transcripción y motilidad celular.<sup>101</sup> Experimentos realizados en ratones deficientes de Pi3k desarrollaron menos artritis debido a una disminución de la migración de neutrófilos.<sup>102</sup>

Los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y STAT activados por estas vías inducen la transcripción de genes implicados en inflamación, supervivencia celular, proliferación y diferenciación.

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción clave en la AR, puesto que regula la expresión de más de 70 genes relacionados con la inflamación, como citoquinas, factores de crecimiento, COX-2, RANKL y proteínas antiapoptóticas, entre otros.<sup>92</sup> Distintos estudios en tejido sinovial y FLS de pacientes con AR han mostrado la activación de NF- $\kappa$ B. También se ha descrito incremento de la actividad de NF- $\kappa$ B en fases muy precoces de la artritis inducida por colágeno en ratones y en la artritis por adyuvante en ratas.<sup>103</sup>

El factor de transcripción heterodimérico AP-1 está compuesto por proteínas pertenecientes a las familias *fos* y *jun*.<sup>92</sup> La actividad del factor de transcripción AP-1 se relaciona directamente con la gravedad de la AR al regular la proliferación de FLS y la expresión de MMPs.

El factor de transcripción STAT es activado principalmente por la vía de JAK.<sup>96</sup> A través del proceso de autofosforilación de JAK, se crea un sitio de acoplamiento para la proteína STAT que, a su vez, sufre fosforilación. Las proteínas JAK facilitan el transporte o la translocación del factor de transcripción STAT al núcleo celular donde se inicia la expresión génica seguida de la síntesis de proteínas. Actualmente se conocen 7 moléculas distintas para STAT, de las cuales STAT3 se relaciona directamente con la AR por su capacidad para promover la angiogénesis, inhibir la apoptosis de los fibroblastos y promover la expresión de MMPs.<sup>104</sup>

#### **1.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN**

Los síntomas característicos de la artritis reumatoide son rigidez matutina, dolor e inflamación articular.<sup>18</sup> Estos síntomas aparecen principalmente en las articulaciones de los dedos de manos y pies (articulaciones interfalángica proximal, metacarpofalángica y metatarsofalángica) aunque puede afectar a cualquier articulación sinovial del organismo (rodillas, pies, manos, codos y columna cervical), exceptuando las articulaciones interfalángicas distales y las articulaciones axiales. Esta afectación suele ser simétrica y poliarticular. Sin el tratamiento adecuado, la enfermedad evoluciona hacia la destrucción articular que ocasiona deformación de las articulaciones y deterioro funcional irreversible.

La AR es una enfermedad sistémica que se asocia con manifestaciones clínicas extraarticulares.<sup>18</sup> Los pacientes presentan con frecuencia síntomas generales como malestar, fatiga y fiebre. Otras manifestaciones extraarticulares comunes son: ojos secos asociado con queratoconjuntivitis seca (en aproximadamente el 45% de los pacientes), xerostomía por sialoadenitis (40%), nódulos reumatoides subcutáneos en la superficie extensora del antebrazo (35%), entumecimiento de manos y pies asociado con neuropatía compresiva (25%) y acortamiento de la respiración de esfuerzo o tos seca debido a neumonía intersticial (15%). La aparición de comorbilidades es frecuente en pacientes con AR. La enfermedad cardiovascular es común en la AR y en los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia de enfermedad pulmonar intersticial en pacientes con artritis reumatoide.<sup>1</sup> Como consecuencia, la esperanza de vida de los pacientes con AR es aproximadamente 10 años menor que la de la población general.<sup>18</sup> Por lo tanto, el diagnóstico y tratamiento adecuados en las fases precoces de la enfermedad son claves para controlar el proceso inflamatorio y evitar el daño articular y la pérdida funcional.

La Asociación Americana de Reumatología (ACR) estableció en 1987 unos criterios diagnósticos para la AR que permitían discriminar pacientes con AR establecida de aquellos que padecían otra enfermedad reumática (Tabla 1).<sup>105</sup> Según estos criterios un paciente puede ser clasificado como AR si cumple como mínimo 4 de los 7 criterios y, si además, los criterios clínicos (los cuatro primeros) están presentes al menos durante 6 semanas.

**Tabla 1. Criterios de clasificación de la artritis reumatoide según la ACR (1987).** Tabla adaptada de Arnett et al.<sup>105</sup>, con permiso de *John Wiley and Sons*.

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
<b>1 Rigidez matutina</b>	Rigidez matutina en las articulaciones que dura al menos 1 hora antes de la máxima mejoría
<b>2 Artritis de 3 o más articulaciones</b>	Al menos 3 áreas articulares inflamadas simultáneamente objetivadas por un médico. Las 14 posibles áreas articulares son: interfalángica proximal, metacarpofalángica, muñeca, codo, rodilla, tobillo y metatarsofalángica.
<b>3 Artritis de manos</b>	Al menos un área inflamada (de las ya descritas en el criterio 2) en la articulación de la muñeca, metatarsofalángica o interfalángica proximal
<b>4 Artritis simétrica</b>	Afectación simultánea de las mismas áreas articulares (descritas en el criterio 2) en ambos lados del cuerpo (participación bilateral de articulación interfalángica proximal, metacarpo- y metatarsofalángica es aceptable sin simetría absoluta)
<b>5 Nódulos reumatoides</b>	Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas, superficies extensoras o en zonas yuxtaarticulares observados por un médico
<b>6 Positividad para el FR</b>	Valores anormales de factor reumatoide sérico por cualquier método para el cual el resultado ha sido positivo en el 4% de los sujetos control normales
<b>7 Cambios radiográficos</b>	Cambios radiográficos típicos de la artritis reumatoide en radiografías postero-anteriores de la muñeca y mano, en las cuales deben incluir erosiones o descalcificaciones óseas localizadas en las articulaciones afectas.

Sin embargo, estos criterios presentan baja sensibilidad para el diagnóstico en estadios tempranos, precisamente el momento en el que los pacientes se pueden beneficiar más del tratamiento.<sup>106</sup> Por este motivo, en el año 2010 la ACR junto a la Liga Europea contra las enfermedades reumáticas (EULAR) desarrollaron nuevos criterios de clasificación para la AR

(Tabla 2).<sup>107</sup> Estos criterios evalúan el número y tipo de las articulaciones implicadas, la presencia de autoanticuerpos (ACPA y FR), los reactantes de fase aguda y la duración de los síntomas. Se aplican sobre una población diana que presente al menos 1 articulación con sinovitis clínica (hinchazón) y que ésta no pueda explicarse por la presencia de otra enfermedad. Para que un paciente sea clasificado como AR debe alcanzar una puntuación igual o superior a 6 en el siguiente sistema de puntuación (Tabla 2).

**Tabla 2. Criterios de clasificación de la artritis reumatoide según la ACR/EULAR (2010).** Tabla adaptada de Aletaha y col.<sup>107</sup>, con permiso de *John Wiley and Sons*.

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN	PUNTUACIÓN
<b>1 AFECTACIÓN ARTICULAR</b>	
1 articulación grande	0
2-10 articulaciones grandes	1
1-3 articulaciones pequeñas (con o sin afectación de articulaciones grandes)	2
4-10 articulaciones pequeñas (con o sin afectación de articulaciones grandes)	3
>10 articulaciones (al menos una pequeña)	5
<b>2 SEROLOGÍA</b>	
FR y/o ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivos (títulos bajos)	2
FR y/o ACPA positivos (títulos altos)	3
<b>3 REACTANTES DE FASE AGUDA</b>	
PCR o VSG normales	0
PCR o VSG elevadas	1
<b>4 DURACIÓN DE LOS SÍNTOMAS</b>	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

El desarrollo de estos nuevos criterios posibilita clasificar a los pacientes con la enfermedad menos evolucionada, lo que permite el inicio precoz del tratamiento mejorando así el pronóstico a largo plazo.

### 1.5. TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

El EULAR recomienda iniciar el tratamiento inmediatamente después de que se haga el diagnóstico de AR.<sup>108</sup> Además, varios estudios han demostrado que el tratamiento de pacientes con AR temprana puede aumentar la tasa de éxito a largo plazo.<sup>109,110</sup> Esto sugiere que existe un período concreto de tiempo, denominado “ventana de oportunidad”, durante el cual la AR es más susceptible al tratamiento y donde el proceso inflamatorio puede ser modificado o incluso invertido.<sup>111,112</sup> Este tiempo crítico se estima que dura entre 15- y 20 semanas desde el inicio de los síntomas.<sup>112</sup>

Los tratamientos farmacológicos utilizados en la AR incluyen a los glucocorticoides (GC) y a fármacos modificadores de la enfermedad (FAME).<sup>113</sup> Estos últimos a su vez pueden ser sintéticos (FAMEs; pequeñas moléculas químicas administradas por vía oral) o biológicos (FAMEb; proteínas administradas por vía parenteral). Dentro de los sintéticos se diferencian dos grupos: los convencionales (FAMEsc), entre los que destaca el metotrexato (MTX), y los dirigidos contra una molécula específica, llamados fármacos sintéticos dirigidos (FAMEsd). Estos se distinguen de los convencionales en que son moléculas químicas sintetizadas contra una molécula diana específica. El tofacitinib, baricitinib y upadacitinib, inhibidores de la transducción intracelular de JAK, conforman los FAMEsd.<sup>96,114</sup> Los FAMEb se clasifican en 4 grupos según sus dianas terapéuticas: inhibición de TNF $\alpha$  (etanercept, infliximab, adalimumab, golimumab y certolizumab), inhibición del receptor de IL6 (tocilizumab y sarilumab), depleción de linfocitos B (rituximab) y bloqueo de la coestimulación de linfocitos T (abatacept).<sup>113</sup> Para algunos de estos FAMEb (infliximab, etanercept, adalimumab y rituximab) existen biosimilares menos costosos y con algunas diferencias físico-químicas respecto de sus correspondientes biológicos originales.

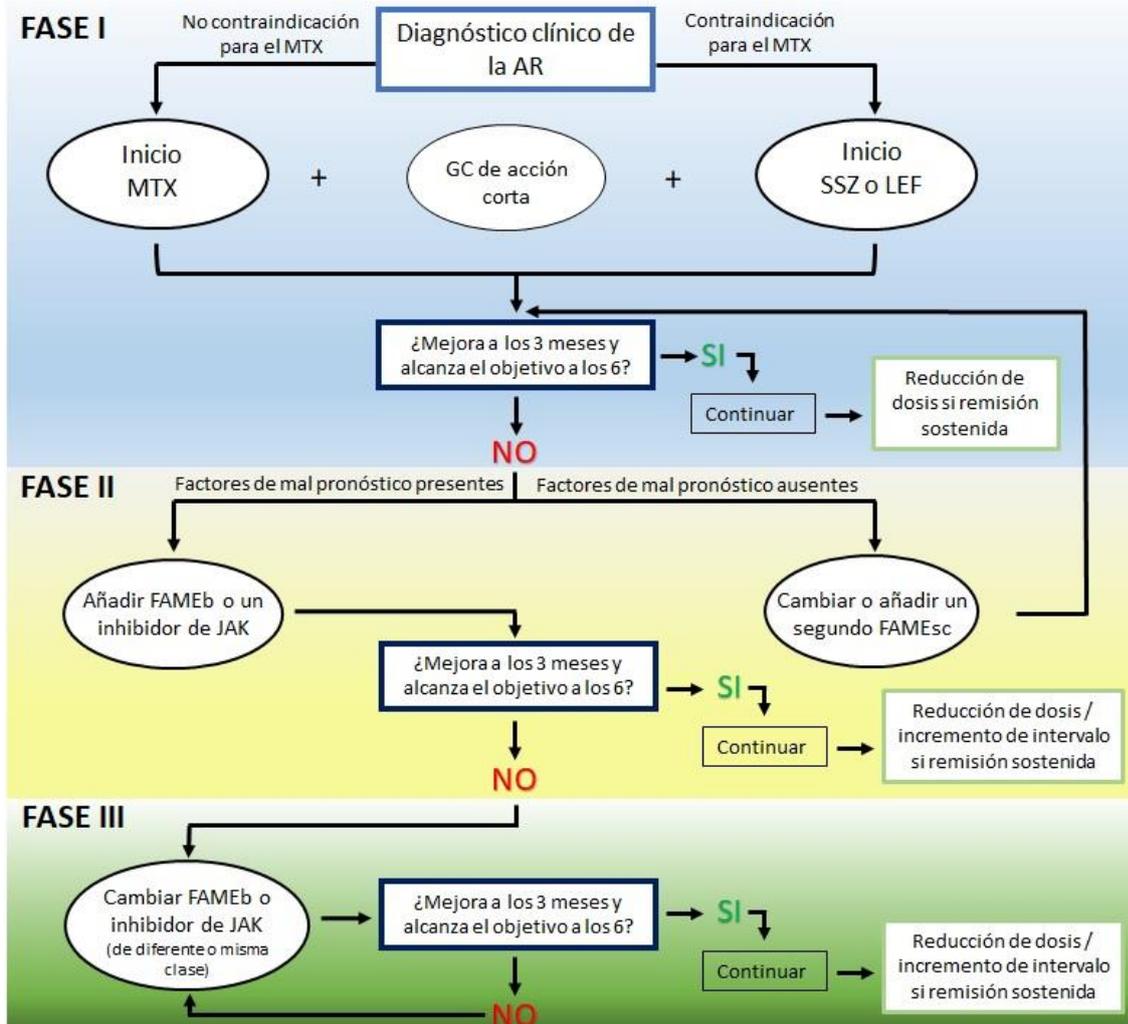
El objetivo principal del tratamiento consiste en la supresión de la inflamación, lo que previene la progresión del daño articular, la aparición de manifestaciones extraarticulares y comorbilidades asociadas. Puesto que la AR es una enfermedad crónica y, por lo tanto, incurable, el objetivo de la estrategia terapéutica ideal consiste en alcanzar la remisión del paciente o al menos una baja actividad de la enfermedad.<sup>108,115</sup> Para medir la actividad y la respuesta al tratamiento se deben utilizar índices compuestos validados, en los que siempre deben incluirse, al menos, los recuentos articulares, los reactantes de fase aguda y las valoraciones del paciente, del médico o ambas. Los índices “*disease activity score 28*” (DAS28), índice simplificado de actividad de la enfermedad (SDAI) y el índice clínico de actividad de la enfermedad (CDAI) se utilizan ampliamente para evaluar la actividad de la enfermedad.<sup>18</sup> La consecución del objetivo terapéutico implica la modificación del tratamiento cuando no se consigue, lo que se conoce como “tratamiento hasta conseguir el objetivo” o “*treat to target*”.<sup>116</sup> La modificación puede ser un cambio del tratamiento, una intensificación del mismo o una infiltración.

El EULAR<sup>108</sup> y la ACR<sup>115</sup> han publicado varias guías de tratamiento desde el año 2010, que se centran principalmente en la terapia farmacológica y en las estrategias terapéuticas. En la Figura

3 se esquematiza la estrategia terapéutica publicada recientemente por el EULAR. En resumen, una vez diagnosticado al paciente de AR el tratamiento debe iniciarse con MTX combinado con GC excepto en pacientes que presenten contraindicaciones o intolerancia al MTX, en los que se puede utilizar otros FAMEs, como la sulfasalacina (SSZ) o la leflunomida (LEF). El objetivo debe ser alcanzado, al menos, parcialmente, a los 3 meses y como máximo a los 6. Durante este período deben hacerse valoraciones con regularidad (entre 1 y 3 meses) para ajustar el tratamiento, si es preciso. Si la respuesta no es suficiente, se recomienda utilizar una combinación de varios FAMEsc en el caso de que el paciente no presente factores de riesgo o de mal pronóstico. Estos factores incluyen la alta actividad de la enfermedad a pesar del tratamiento previo con FAMEsc, los títulos altos de ACPAs o FR y el daño articular temprano. Si existen estos factores de mal pronóstico, se valora el tratamiento con un FAME biológico o con un sintético dirigido, en monoterapia o en combinación con un FAMEsc. Debe iniciarse el tratamiento con un segundo biológico en el caso de que con el primero no se consiga una respuesta adecuada o por aparición de efectos adversos. Una vez alcanzada la baja actividad o la remisión durante al menos 6 meses, se contempla la reducción del tratamiento, sobre todo de los tratamientos biológicos por sus posibles efectos adversos o toxicidades. Esta reducción del tratamiento se puede llevar a cabo disminuyendo la dosis o aumentando los intervalos de intervención.

La aparición de terapias biológicas ha supuesto un gran avance en el tratamiento de la AR permitiendo controlar mejor los síntomas de la enfermedad y reducir el deterioro radiológico, proporcionando a los pacientes una mejor calidad de vida. Sin embargo, el uso de FAMEb requiere prevención y tratamiento para reacciones adversas graves como neumonía, tuberculosis y otras infecciones oportunistas.<sup>18</sup> En este sentido se ha encontrado una mayor incidencia de infecciones en el tracto respiratorio superior e inferior así como en el tracto urinario en pacientes con AR tratados con FAMEb y FAMEsd, inhibidores de JAK, en comparación con la población general.<sup>96</sup> Por este motivo se recomienda la administración profiláctica de isoniazida en pacientes con factores de riesgo para tuberculosis y la vacunación neumocócica en pacientes con riesgo de neumonía.<sup>18</sup> Por otro lado, se ha observado que un 20-30 % de pacientes no responden a los tratamientos, y un 40% lo hace parcialmente, por lo que se ha especulado con la posibilidad de un efecto techo de los tratamientos que se dirigen contra dianas inflamatorias o inmunes.<sup>108</sup> Por ello, existe un gran interés en explorar otras áreas en

busca de nuevas dianas terapéuticas, como los mecanismos responsables de la adquisición del fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides como los mejores candidatos.



**Figura 3. Algoritmo de las recomendaciones EULAR de la estrategia terapéutica publicada en 2019.** Imagen modificada de Smolen y col.<sup>108</sup>, con permiso de BJM.

La señalización de WNT es una de las principales vías conocidas para regular el desarrollo embrionario, la renovación de tejidos y la regeneración en organismos multicelulares. Alteraciones en esta vía se han implicado en la patogenia de varios tipos de cánceres y otras enfermedades, como la osteoporosis, artrosis y la artritis reumatoide. Por lo tanto, mejorar el conocimiento de esta vía en los distintos aspectos de la patogenia de la AR podría proporcionar nuevas dianas terapéuticas.

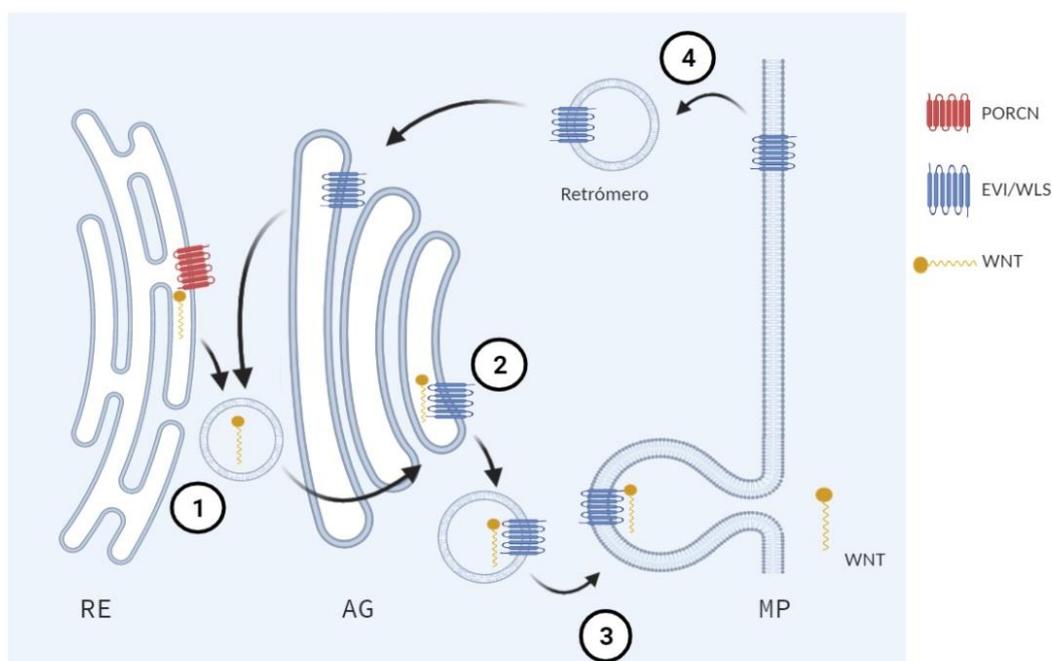
## 2. WNT5A

WNT5A forma parte de la familia de glicoproteínas secretadas Wingless/Integrasa 1 (WNT). El término WNT resulta de la fusión del nombre del gen “*wingless*” de polaridad de segmento en *Drosophila* y el nombre del gen murino “*integrated* o *int-1*” que estimula la aparición de tumores de mama cuando se activa por la integración de un virus.<sup>117,118</sup> Con el tiempo se determinó que ambos genes eran homólogos, por los que se les renombró WNT (de Wingless-related integration site). Los ligandos WNT se producen en una amplia variedad de tejidos del organismo que van desde neuronas hasta fibroblastos, y utilizan generalmente un mecanismo de señalización de tipo autocrino.<sup>119</sup> Regulan una asombrosa variedad de procesos celulares del desarrollo embrionario, como la determinación del destino celular, motilidad, polaridad, formación del eje primario y organogénesis y, más recientemente, esta vía se ha implicado en la renovación de células madre.<sup>117</sup> Actualmente en mamíferos se han descrito 19 proteínas WNT que básicamente se dividen en dos grupos: los que realizan su señalización mediante la vía  $\beta$ -catenina, también conocida como vía canónica, y los que utilizan la vía independiente de la  $\beta$ -catenina o vía no canónica.<sup>120</sup>

### 2.1. ESTRUCTURA

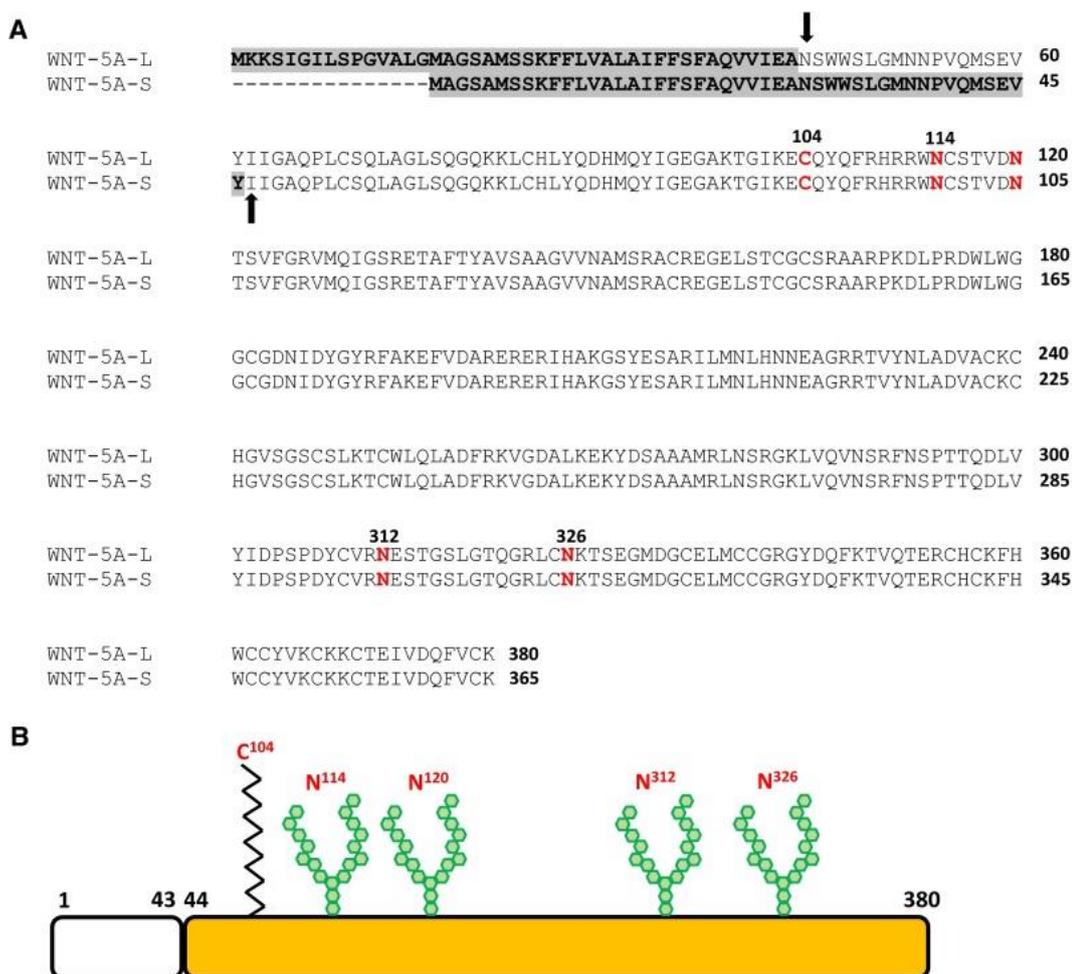
Los ligandos WNT son proteínas con un tamaño entre 39 y 46 KDa que sufren múltiples modificaciones antes de su transporte y liberación al medio extracelular (Figura 4).<sup>120,121</sup> Varios estudios han revelado que las proteínas WNT son glicosiladas y palmitoiladas en el retículo endoplasmático (RE).<sup>122-124</sup> La palmitoilación consiste en la unión del ácido graso monoinsaturado (ácido palmitoico) a residuos conservados de cisteína gracias a la enzima o-acetiltransferasa porcupina (PORCN).<sup>123,125</sup> Esta modificación postraduccional por lípidos les confiere a las proteínas WNT su carácter hidrofóbico, lo que las hace muy poco solubles en medio acuoso.<sup>124</sup> La palmitoilación de las proteínas WNT es necesaria para su posterior unión a los receptores y señalización intracelular, pero no se requiere para su secreción. Por el contrario, la glicosilación es necesaria para su secreción, pero prescindible para su capacidad de señalización.<sup>126</sup> Tras estas modificaciones, las proteínas WNT son transportadas por las proteínas transmembranas *Wntless* (WLS), también llamadas *Evenness Interrupted* (EVI), desde el aparato de Golgi (AG) a la membrana plasmática donde son liberadas a la matriz extracelular (Figura 4).<sup>123,125</sup>

En la matriz extracelular, las proteínas hidrofóbicas WNT se unen y estabilizan gracias a su unión con glicosaminoglicanos (GAG), como el proteoglicano heparán sulfato. El papel de estos GAG es concentrar a las proteínas WNT en la superficie celular y evitar que se agreguen e inactiven en el medio extracelular.<sup>120</sup> Las proteínas WNT también pueden secretarse y propagarse en la matriz extracelular unidas a vesículas de secreción.<sup>124</sup>



**Figura 4. Regulación del tráfico intracelular de los ligandos WNT.** En el retículo endoplasmático se produce la glicosilación y palmitoilación mediada por la enzima PORCN. WNT es transportado al aparato de Golgi, donde interactúan con la proteína transmembrana EVI/WLS que ayuda al transporte de los ligandos WNT desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática. La proteína EVI/WLS es internalizada mediante endocitosis mediada por clatrina y transportada de nuevo al aparato de Golgi gracias al complejo retrómero. AG: aparato de Golgi; EVI/WLS: *Evenness Interrupted/Wntless*; MP: membrana plasmática; PORCN: enzima o-acetiltransferasa porcupina; RE: retículo endoplasmático; WNT: Wingless/Integrina 1. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

El gen humano *WNT5A* genera dos transcritos denominados *WNT5A-L* y *WNT5A-S* (Figura 5A).<sup>118</sup> *WNT5A-L* y *WNT5A-S*, formadas por 380 y 365 aminoácidos, respectivamente, son proteínas fuertemente glicosiladas y palmitoiladas. Cada isoforma consta de una secuencia señal hidrofóbica N-terminal, una secuencia consenso conservada de oligosacáridos unidos a asparagina y unos 22 residuos de cisteína altamente conservados. Los sitios de glicosilación se han identificado en la asparagina 114, 120, 311 y 325 mientras que la palmitoilación se produce en la cisteína 104, tal y como se puede observar en la figura 5B.<sup>118,124</sup>



**Figura 5. Proteína WNT5A. A) Análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de las isoformas humanas WNT5A-L y WNT5A-S.** El área gris representa la secuencia señal N-terminal de la secuencia proteica. Las fechas indican los sitios de escisión de la secuencia señal y N-terminal de la proteína madura. Los aminoácidos marcados en rojo representan los sitios de modificación postraduccional. El número representa la posición respecto al primer aminoácido N-terminal. **B) Representación esquemática de la proteína WNT5A-L.** La secuencia de la señal N-terminal está representada por un cuadro en blanco. La palmitoilación y glicosilación se representan en la espina dorsal proteica. Imagen tomada de Kumawat y col.<sup>118</sup>, licencia [Creative Commons CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Ambas isoformas tienen propiedades bioquímicas similares como la estabilidad, hidrofobicidad y capacidad de señalización. Si bien la importancia de las isoformas de WNT5A no está entendida completamente, y no está claro del todo si son funcionalmente redundantes, un estudio reciente mostró que podrían tener diferentes funciones.<sup>118,127</sup> Cuando se expresa ectópicamente, WNT5A-L inhibe la proliferación de varias líneas de células cancerosas, mientras que WNT5A-S conduce a la estimulación de la proliferación celular.

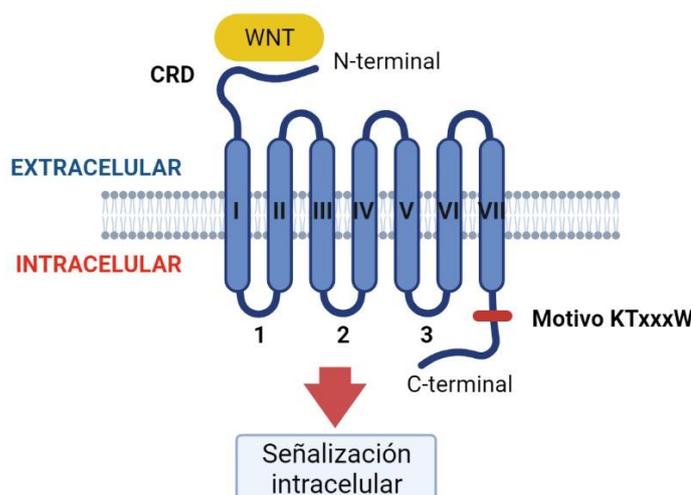
## **2.2. RECEPTORES DE WNT5A**

Las proteínas WNT actúan como ligandos uniéndose a receptores específicos, denominados Frizzled (FZD), presentes en la superficie de las células sensibles a WNT donde llevan a cabo la señalización intracelular. Además de los receptores FZD, otras proteínas pueden actuar como correceptores. En la señalización canónica, el correceptor de lipoproteínas de baja densidad de tipo 5 y 6 (LRP5/6) forma un complejo con el ligando WNT y el receptor FZD. En la señalización no canónica son esenciales los correceptores tirosina quinasa, ROR1/2 y RYK.

### **2.2.1. RECEPTORES FRIZZLED**

Los receptores FZD son proteínas de 7 pasos transmembrana que se han relacionado con la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR).<sup>128</sup> La longitud de los receptores FZD oscila entre los 500 a 700 aminoácidos con tres regiones básicas: el extremo N-terminal extracelular que contiene un dominio rico en cisteínas (CRD), una región hidrofóbica que forma 7 hélices alfa que atraviesan la membrana plasmática y un dominio carboxi-terminal poco conservado entre los miembros de la familia que se comunica con elementos de señalización que se encuentran en el citoplasma celular (Figura 6).<sup>129</sup> El dominio extracelular CRD, de 120 a 125 aminoácidos, interacciona con los ligando WNT o con sus antagonistas con gran afinidad.<sup>130</sup> En el dominio citoplasmático se encuentra un motivo altamente conservado (KTxxxW) ubicado a dos aminoácidos después del séptimo dominio hidrofóbico, así como tres bucles procedentes de las 7 hélices transmembrana que son esenciales para la activación de la vía  $\beta$ -catenina y para la relocalización de la membrana y fosforilación de la proteína Dishevelled (DVL).<sup>131,132</sup>

En humanos se han descrito 10 receptores FZD,<sup>124</sup> de los cuales FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6 y FZD7 pueden funcionar como receptores de WNT5A.<sup>133</sup>



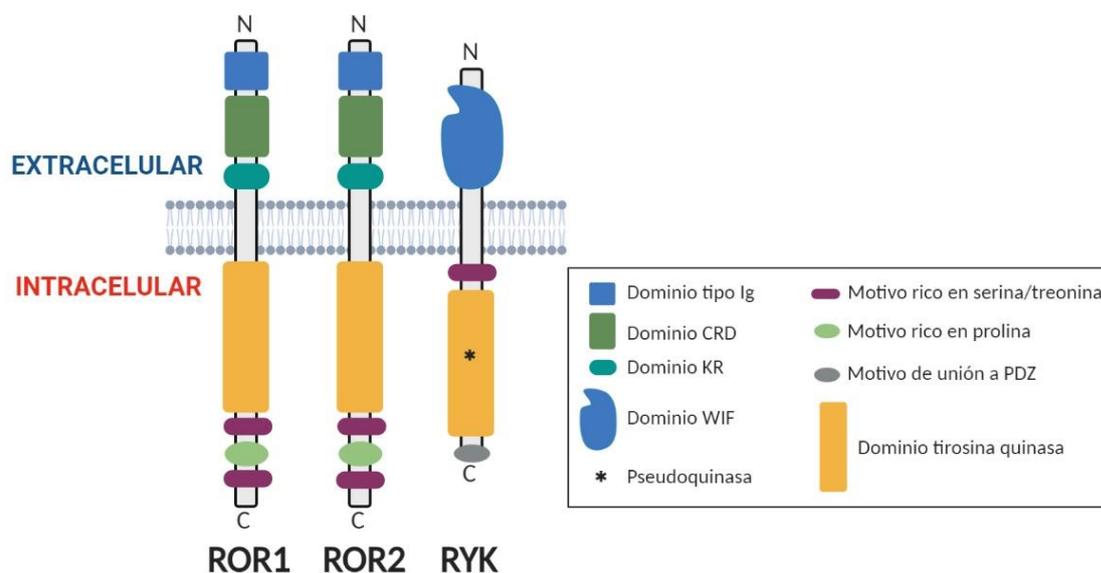
**Figura 6. Esquema del receptor Frizzled.** En la figura se muestran los diferentes dominios estructurales del receptor Frizzled. CRD: dominio rico en cisteínas; WNT: Wingless/Integrasa 1. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

### 2.2.2. CORRECEPTORES NO CANÓNICOS: RECEPTORES TIROSINA QUINASA

Los receptores tirosina quinasa (RTK) constituyen una superfamilia bien caracterizada de 58 miembros clasificados en 20 subfamilias.<sup>134</sup> Estos receptores transmembrana se caracterizan por la presencia de un dominio intracelular tirosina quinasa (PTK) que opera mediante autofosforilación y fosforilación de otras proteínas en la cascada de señalización intracelular.<sup>135</sup> Cinco miembros de la familia RTK (MUSK, RYK, ROR1, ROR2 y PTK7) participan en la señalización de ligandos WNT. De estos, ROR1, ROR2 y RYK se han relacionado directamente con la señalización no canónica de WNT5A.

Los receptores ROR son proteínas transmembrana de un solo paso con varios dominios estructurales muy conservados.<sup>136</sup> En la región extracelular contiene un dominio tipo inmunoglobulina (Ig-like domain), un dominio rico en cisteína (CRD) y un dominio Kringle (KR). En la región intracelular se encuentra el dominio PTK y dos regiones ricas en serina y treonina separadas por una región rica en prolina (Figura 7). La familia de receptores ROR está formada en vertebrados por dos miembros, ROR1 y ROR2. Ambos receptores son homólogos entre sí compartiendo el 58% de aminoácidos totales.<sup>136</sup> El dominio extracelular CRD interacciona con WNT5A y con el receptor FZD promoviendo la señalización no canónica. La unión del ligando WNT al receptor promueve la dimerización de este último aumentando su fosforilación y, por tanto, su actividad catalítica.<sup>137</sup> La función de los dominios

Ig y KR es desconocida pero se cree que estabilizan la interacción del receptor ROR con algún factor extracelular.



**Figura 7. Esquema de correceptores no canónicos.** Esquema de los distintos dominios de los receptores ROR1, ROR2 y RYK. CRD: dominio rico en cisteína; Ig: inmunoglobulina; KR: dominio Kringle; WNT: Wingless/Integrasa 1. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

Los receptores RYK son miembros de la familia de RTK altamente conservados en su estructura. Al igual que el resto de miembros de la familia son proteínas transmembrana de un solo paso con varios dominios estructurales: un dominio extracelular similar al factor inhibidor de proteína WNT (WIF, antagonista de WNT), un dominio intracelular PTK y un dominio de unión al dominio PDZ de la proteína DVL en el extremo carboxiterminal, que permite la señalización intracelular.<sup>138</sup> Después del paso transmembrana, y antes del dominio PTK, se encuentra una región intracelular rica en serina y treonina de función desconocida.<sup>135</sup> El dominio WIF interactúa directamente con la modificación lipídica de los ligandos WNT.<sup>139</sup> Esta interacción provoca una división en el receptor provocando la translocación del fragmento carboxiterminal al núcleo. Ensayos funcionales han demostrado que el dominio citoplasmático PTK está inactivo por alteraciones en los residuos. Así, los receptores RYK se consideran proteínas catalíticamente inactivas pudiendo actuar únicamente como correceptores en lugar de como receptores primarios en la transducción de señales. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que RYK puede requerir condiciones particulares para la actividad quinasa que aún no se han identificado.<sup>135</sup>

### 2.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE WNT5A

La cascada de señalización de WNT es una de las vías más importantes en los primeros eventos del desarrollo embrionario, donde se controla la proliferación y diferenciación celular.<sup>140,141</sup> Además, desempeña funciones importantes en la edad adulta, las cuales deben estar bien reguladas para evitar complicaciones patológicas. Estas funciones principales de la vía de WNT son: mantenimiento de la proliferación celular, autorrenovación de las células madre, regeneración tisular y neuritogénesis y sinaptogénesis en el sistema nervioso.<sup>141,142</sup>

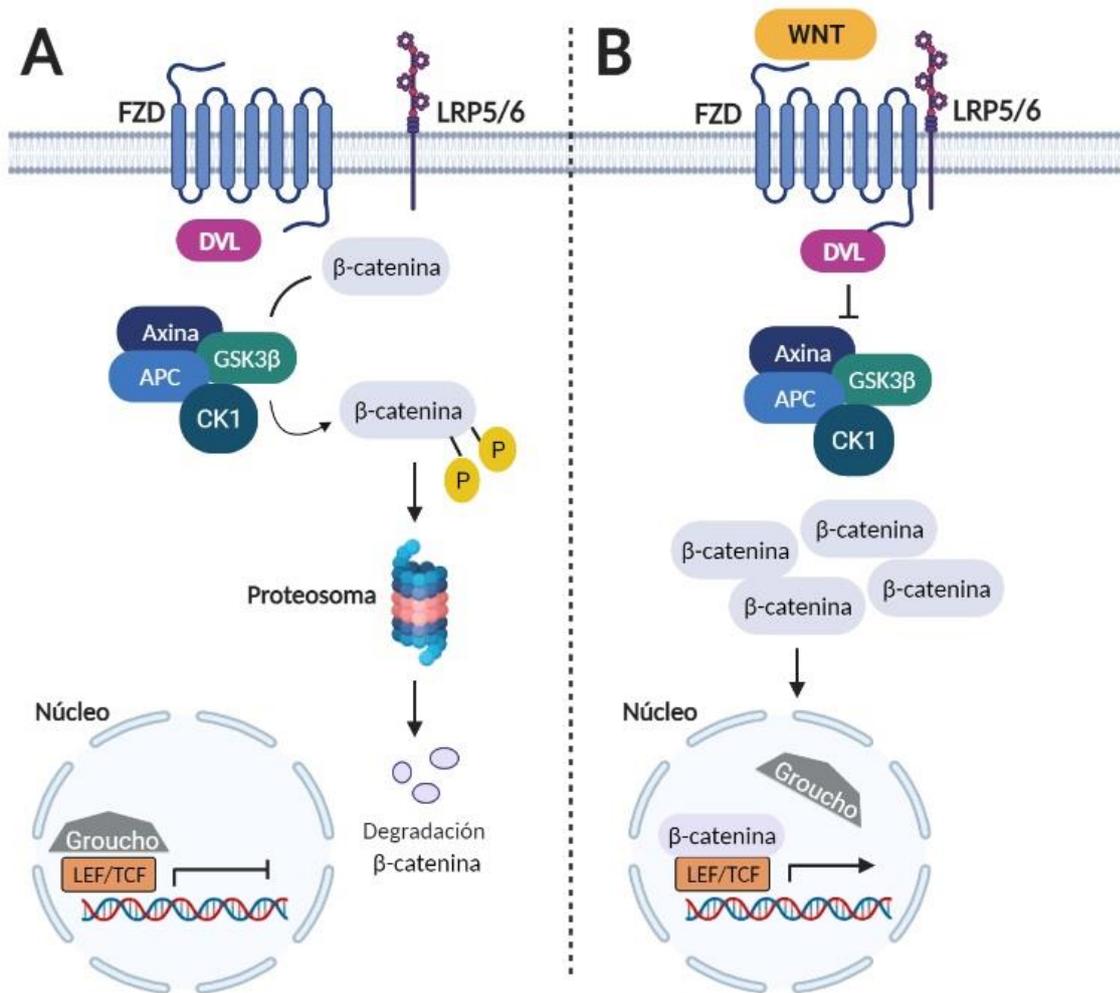
La señal extracelular de WNT estimula varias cascadas de transducción de señales intracelulares, incluyendo la vía canónica o dependiente de  $\beta$ -catenina y la vía no canónica o independiente de  $\beta$ -catenina. Esta última a su vez puede dividirse en la vía de polaridad celular planar (PCP) y la vía WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>117</sup> Pese a que WNT5A es una proteína típicamente de señalización no canónica, existen evidencias de que puede actuar como activador o inhibidor de la vía canónica de WNT.<sup>143</sup> Que actúe de un modo u otro depende del contexto celular y del tipo de receptores disponibles.

#### 2.3.1. VIA CANÓNICA DE WNT

La vía canónica de WNT se conoce también como vía dependiente de la proteína  $\beta$ -catenina puesto que la unión del ligando WNT a sus receptores promueve la translocación de esta proteína al núcleo donde lleva a cabo la actividad transcripcional sobre genes responsables principalmente de proliferación celular (Figura 8).<sup>125</sup>

En ausencia del ligando WNT, los niveles de  $\beta$ -catenina se mantienen bajos por su continua degradación por el complejo de destrucción de la  $\beta$ -catenina.<sup>144</sup> Este complejo multiproteico, situado en el compartimento citoplasmático, consta de proteínas quinasas, la caseína quinasa 1 (CK1) y la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), encargadas de fosforilar a la  $\beta$ -catenina, la proteína supresora de tumores poliposis coli adenomatosa (APC) que incrementa la afinidad del complejo de degradación hacia la  $\beta$ -catenina y la proteína de andamiaje Axina que es la encargada de mantener unido al complejo de degradación.<sup>145</sup> Así el complejo atrapa y fosforila la proteína  $\beta$ -catenina, dirigiéndola a la ubiquitinación y degradación por proteosomas (Figura 8A). La ausencia de  $\beta$ -catenina en el núcleo provoca la inhibición de los genes diana de la vía de señalización WNT. La inhibición la lleva a cabo un complejo proteico que incluye al factor

estimulador linfóide (LEF) y al factor de células T (TCF) unidos a la proteína correpresora Groucho.



**Figura 8. Representación esquemática de la vía de señalización dependiente de  $\beta$ -catenina.** A) En ausencia del ligando WNT, el complejo formado por Axina, APC, GSK3 $\beta$  y CK1 se encuentra en el citoplasma donde fosforila doblemente a la  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina fosforilada es degradada por el proteosoma impidiendo su translocación al núcleo. B) En presencia de WNT, el receptor FZD y el correceptor LRP5/6 forman un complejo que fosforila a la proteína DVL, la cual bloquea al complejo proteico encargado de la degradación de la  $\beta$ -catenina. De este modo, la  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y se trasloca al núcleo donde regula la expresión de genes diana. APC: proteína poliposis coli adenomatosa; CK1: caseína quinasa 1; DVL: dishevelled; GSK3 $\beta$ : glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ; LEF: factor estimulador linfóide; TCF: factor de células T; WNT: Wingless/Integrasa 1. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

Cuando el ligando canónico (WNT1, WNT2, WNT3, WNT3A y WNT8A) está presente interacciona con los receptores de superficie FZD y correceptor LRP5/6 (Figura 8B). La activación del receptor FZD recluta a la proteína DVL que, posteriormente, es fosforilada.<sup>146</sup> La activación de esta proteína bloquea al complejo proteico encargado de la degradación de la

$\beta$ -catenina. En consecuencia, la  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y se traslada al núcleo donde regula la expresión génica a través de la activación del factor de transcripción LEF/TCF, activando la transcripción de genes cuyos productos proteicos participan en procesos de división celular, desarrollo embrionario y morfogénesis.

La insuficiencia en la señalización de WNT compromete la renovación del tejido y se ha implicado en procesos como la osteoporosis, el vitíligo o la neurodegeneración. Recíprocamente, cuando es demasiado activo, es la causa desencadenante de varios tipos de cáncer, sobre todo cáncer de colon, estómago, hígado, mama y ovarios.<sup>142</sup>

La vía de señalización canónica de WNT se ha implicado en la patogenia de la AR mediante la activación de los FLS y la inhibición de los osteoblastos provocando un aumento de la osteoclastogénesis.<sup>86,147</sup>

### **2.3.2. VIA NO CANÓNICA DE WNT**

La vía no canónica de WNT o vía independiente de la  $\beta$ -catenina reúne un gran número de cascadas bioquímicas iniciadas por ligandos WNT que no conlleva la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina.<sup>148</sup> Se inicia por la unión de ligandos no canónicos (WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A y WNT11) con sus receptores. En esta vía destacan la vía de polaridad celular planar (PCP) y la vía WNT/Ca<sup>2+</sup>.

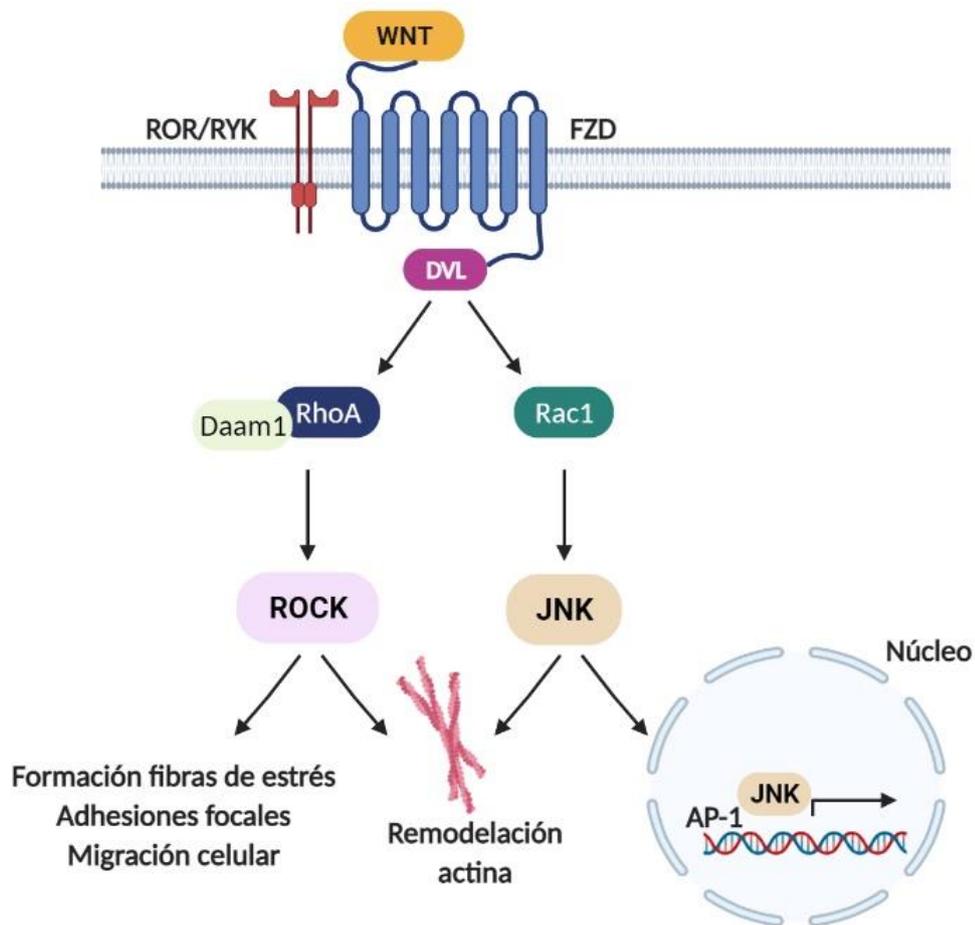
#### **- VÍA DE POLARIDAD CELULAR PLANAR (PCP)**

La vía PCP está mediada por los receptores FZD y/o correceptores ROR/RYK e implica la activación de las GTPasas RhoA y Rac1 y la quinasa JNK (Figura 9).<sup>149</sup> Esta vía controla la polaridad celular, remodelación citoesquelética y migración celular. La unión ligando – receptor conlleva a la activación de la proteína DVL. DVL es una proteína de andamiaje en la que se diferencian tres dominios estructurales: DIX, PDZ y DEP. Los dominios PDZ y DEP activan dos vías paralelas en las que intervienen pequeñas GTPasas, RhoA y Rac, respectivamente.<sup>150</sup> El dominio DIX es esencial en la vía canónica pero no tiene función en la no canónica.

Para la activación de la rama RhoA, la señalización de WNT induce un complejo entre DVL y el activador de morfogénesis 1 asociado a Dishevelled (Daam1) que conduce a la activación de este último y, en consecuencia, la activación de la GTPasa RhoA.<sup>151</sup> La activación de RhoA

produce la activación de la quinasa asociada a RhoA (ROCK), que conlleva a la modificación de la actina y reordenamiento del citoesquelético.<sup>152</sup> ROCK es una serina/treonina quinasa que presenta dos isoformas, ROCK1 y ROCK2.<sup>153</sup> Ambas isoformas presentan un 65% de grado de homología total, con un 92% de homología en sus dominios quinasas por lo que las dianas de ROCK pueden ser potencialmente fosforiladas por cualquier isoforma.<sup>154</sup> Su estructura consta de un dominio quinasa próximo a la región N-terminal seguido por una región de 600 aminoácidos enrollada en espiral que contiene un dominio de unión a RhoA (RBD) y un dominio PH que contiene un dominio CRD en el extremo C-terminal.<sup>153,154</sup> En estado inactivo, el extremo C-terminal actúa como una región autoinhibidora. La unión de RhoA al dominio RBD interrumpe su regulación negativa, activando así la quinasa. Las proteínas ROCK también pueden activarse de manera independiente a RhoA mediante la eliminación del terminal inhibidor carboxilo mediada por caspasa 3 o granzima B de ROCK1 y ROCK2, respectivamente. ROCK activado fosforila la cadena ligera de miosina (MLC) provocando la contracción de la actomiosina a la vez que puede desactivar la fosfatasa MLC, regulando indirectamente la fosforilación de MLC, lo que resulta en cambios conformacionales de la miosina necesarios para la contracción de los filamentos de actina.<sup>155</sup> De este modo, ROCK está implicado en la migración celular regulando varios de sus procesos importantes como la polaridad y contractilidad celular.<sup>154</sup> Además, ROCK está involucrado en la formación de fibras de estrés de los fibroblastos y el aumento del número de filamentos de actina dentro de las células por inactivación de la proteína cofilina encargada de cortar los filamentos y separar las unidades de actina.<sup>153</sup>

La segunda rama de señalización de esta vía requiere el dominio DEP de la proteína DVL y activa la GTPasa Rac, independientemente de Daam1. El complejo DVL-Rac1 activa la quinasa JNK. JNK activado provoca la reorientación del centro organizador de microtúbulos y remodelación de actina mediante la fosforilación y activación de la proteína de interacción con CapZ. JNK también puede activar a la proteína activadora del factor de transcripción AP-1, implicada en la regulación transcripcional de una gran variedad de genes implicados en procesos inflamatorios.<sup>156</sup>

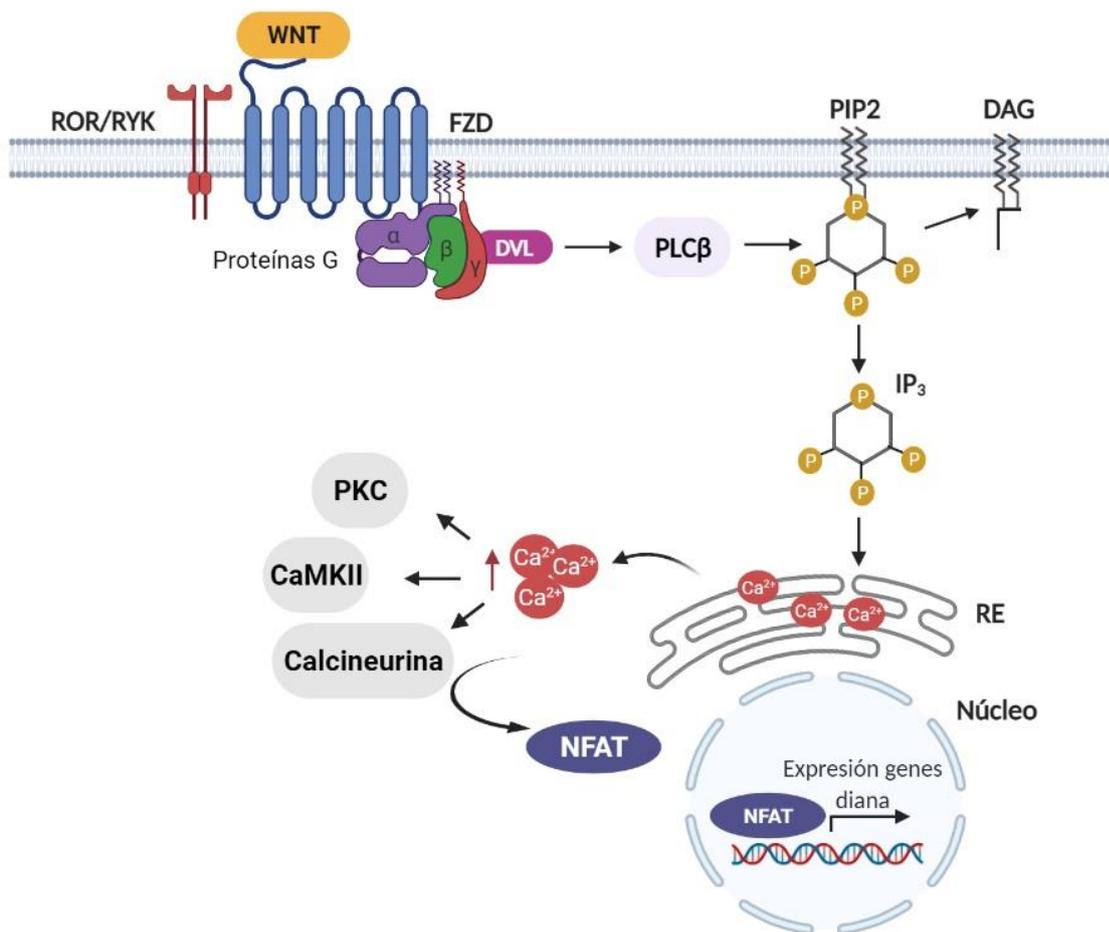


**Figura 9. Representación esquemática de la vía no canónica PCP de WNT.** La unión de WNT al receptor FZD y correceptor ROR/RYK lleva a la activación de DVL. DVL a través de Daam1 media la activación de RhoA, que a su vez activa la quinasa ROCK. DVL también media la activación de Rac1, que activa a JNK. La activación de ROCK y JNK dan lugar a cambios citoesqueléticos mediante la remodelación de la actina. Además, JNK puede trasladarse al núcleo activando genes como AP-1, implicado en la regulación de una gran variedad de genes inflamatorios. Daam1: activador de morfogénesis 1 asociado a Dishevelled; DVL: Dishevelled; FZD: receptor Frizzled; JNK: quinasa N-terminal del homólogo celular del protooncogen Jun; ROCK: quinasa asociada a RhoA; WNT: *Wingless/Integrasa 1*. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

#### - VÍA WNT/Ca<sup>2+</sup>

La activación de esta vía conduce a un incremento del calcio intracelular. La unión de WNT con receptores FZD y/o correceptores no canónicos promueve la activación de la proteína DVL la cual activa la enzima fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ) regulada por proteínas G heterotriméricas. La enzima PLC $\beta$  se une al fosfolípido fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) y da lugar a inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG) (Figura 10).<sup>157</sup> Esto provoca un aumento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Los niveles aumentados de calcio activan varias proteínas sensibles

al  $\text{Ca}^{2+}$ , incluyendo la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII) y la calcineurina.<sup>158</sup> Esto provoca la desfosforilación del factor nuclear de células T activadas (NFAT) y su translocación al núcleo conduce a la modulación transcripcional de genes diana.<sup>159</sup> Tanto PKC como CaMKII pueden bloquear la vía canónica  $\beta$ -catenina mediante la fosforilación de DVL. Esta vía regula el movimiento celular, proliferación y migración celular, junto con la modulación del comportamiento celular y el cambio estructural en varios organismos.



**Figura 10. Representación esquemática de la vía de señalización no canónica WNT/Ca<sup>2+</sup>.** En esta vía la señalización de WNT a través de FZD y ROR/RYK media la activación de DVL mediante la activación de proteínas G. DVL activado provoca que PLCβ se une al PIP2 y da lugar a IP3 y DAG aumentando los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular. El incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular activa a PKC, CaMKII y calcineurina dando lugar a la desfosforilación de NFAT. Su translocación al núcleo conduce a la modulación transcripcional de genes diana. Ca<sup>2+</sup>: calcio; CaMKII: proteína quinasa II dependiente de calmodulina; DAG: diacilglicerol; DVL: Dishevelled; FZD: receptor Frizzled; IP3: inositoltrifosfato; NFAT: factor nuclear de células T activadas; PIP2: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato; PKC: proteína quinasa C; PLCβ: enzima fosfolipasa Cβ; RE: retículo endoplasmático. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

## 2.4. ASPECTOS FUNCIONALES DE LA SEÑALIZACIÓN DE WNT5A

WNT5A es un ligando representativo de la vía de señalización no canónica de WNT regulando la migración y polaridad celular durante la morfogénesis embrionaria.<sup>160</sup> De hecho, su expresión es más abundante durante las primeras etapas del desarrollo.<sup>118</sup> En general, WNT5A regula procesos embrionarios como el alargamiento del eje del cuerpo, el crecimiento del largo de los huesos, dedos, costillas y esternón, morfogénesis craneofacial, desarrollo de párpado y extensión convergente neuronal y orientación axonal.<sup>118,161,162</sup>

Además, WNT5A se ha relacionado con varias funciones celulares como migración, adhesión e invasión celular.<sup>118,149,160</sup> El proceso de migración requiere la adquisición de nueva asimetría y polaridad junto con la reorganización del citoesqueleto.<sup>118</sup> Este complejo proceso celular implica protrusión y adhesión en el frente de la célula y contracción y desprendimiento en la parte posterior.<sup>149</sup> En el proceso migratorio, las células ensamblan y separan continuamente sus adherencias en el borde de ataque. Matsumoto y col.<sup>163</sup> mostraron que WNT5A está implicado en este proceso de adhesión induciendo la formación del complejo DVL/APC, el cual se asocia con la quinasa de adhesión focal (FAK) y la paxilina. FAK y paxilina son dos proteínas importantes en la renovación de las adherencias focales puesto que están involucradas en la estabilización de microtúbulos en la periferia celular, importante para la separación de la adhesión focal. Otro estudio identificó la activación de la cascada PI3K/AKT tras la unión de WNT5A al receptor FZD3 promoviendo la adhesión mediada por integrinas en fibroblastos dérmicos.<sup>164</sup>

Varios estudios han examinado posibles mecanismos moleculares de la migración celular inducida por WNT5A. Así, Nishita y col.<sup>165</sup> observaron que WNT5A induce la migración celular a través de ROR2. En este escenario, ROR2 media la formación de filopodios al asociarse con la proteína de unión a actina, filamina A. Los filopodios son estructuras basadas en filamentos de actina que se proyectan en las células migratorias y son importantes en la formación de adherencias focales para adherirse al sustrato facilitando el movimiento celular direccional.<sup>118</sup> La asociación ROR2 – filamina A activa a JNK que a su vez fosforila la paxilina, molécula de adhesión focal, estimula la formación de lamelipodios y la reorientación del centro organizador de microtúbulos, modulando así la motilidad celular en respuesta a WNT5A. Otro mecanismo propuesto es que WNT5A controla la polaridad y migración celular a través de la activación de Rac mediada por Daple.<sup>166</sup> Daple interacciona con DVL en respuesta a WNT5A

y facilita su interacción con PKC induciendo la activación de Rac. Esto conduce a la reorganización citoesquelética que promueve la formación de lamelipodios, estructuras importantes en el proceso de migración celular. Otro estudio destaca la interacción WNT5A-RhoA con la remodelación citoesquelética y motilidad celular, a través de DVL y Daam1<sup>167</sup> o mediante la señalización PI3K/AKT<sup>168</sup>.

Además de la señalización no canónica de WNT, WNT5A también puede activar la señalización dependiente de  $\beta$ -catenina para promover la migración celular.<sup>118</sup> En células de melanoma, WNT5A activa pequeñas GTPasas, como al factor de ribosilación de ADP 6 (ARF6) a través de su unión a FZD4-LRP6. ARF6 libera  $\beta$ -catenina incrementando su abundancia en el citoplasma e induciendo invasión y metástasis.<sup>169</sup> Así, WNT5A ejerce efectos migratorios en contextos tanto fisiológicos como patológicos.

Por otro lado, debido a sus propiedades para regular la polaridad, migración y proliferación celular junto con el efecto antagonista sobre la señalización canónica de WNT, WNT5A puede desempeñar un papel fundamental en la modulación de la determinación del destino celular y diferenciación de células madre.<sup>118</sup> Así, WNT5A regula negativamente la diferenciación de células madre hematopoyéticas mediante la inhibición de la señalización canónica de WNT y NFAT manteniéndolas en una etapa inactiva y promoviendo su repoblación. De manera similar, WNT5A también es crítico en la biología de células madre mesenquimales (MSC) funcionando como un regulador maestro que determina la diferenciación de las MSC en linajes osteogénicos y adipogénicos. También se ha demostrado recientemente que WNT5A está involucrado en la reparación y regeneración de tejidos tras una lesión, así como en la espermatogénesis.<sup>118</sup>

Aunque la expresión de WNT5A, por lo general, está disminuida en los tejidos adultos, se ha encontrado una expresión mantenida o aumentada de WNT5A asociada a un incremento de las propiedades de invasión y metástasis en varias células cancerosas, indicando el papel crítico de WNT5A en la progresión del tumor.<sup>160</sup> Así, la señalización aberrante de WNT5A conduce al desarrollo de varias patologías, que incluyen cáncer e inflamación.

WNT5A se ha vinculado con la patobiología del cáncer por sus propiedades para activar e inhibir la señalización dependiente de  $\beta$ -catenina y regular los movimientos celulares.<sup>118</sup> Numerosos estudios han analizado el papel de la vía no canónica de WNT5A en la migración e invasión tumoral. Así, en el cáncer nasofaríngeo, el silenciamiento de WNT5A disminuyó notablemente la migración e invasión de las células tumorales<sup>170</sup> y un efecto similar se obtuvo

con un anticuerpo anti-WNT5A en un modelo experimental de cáncer gástrico en el que se observó una gran reducción de las metástasis hepáticas.<sup>171</sup> Además, la vía de señalización WNT5A/ROR2 se ha implicado también en la invasión del osteosarcoma<sup>172</sup> y del carcinoma seroso de ovario.<sup>173</sup> Así, WNT5A a través de ROR2 conduce a la expresión de MMP13, que es requerido para la formación de invadopodia, protuberancias de la membrana plasmática ricas en actina propias de células altamente invasivas.<sup>174</sup> En células cancerosas de próstata WNT5A induce la expresión de MMP1 mediante la activación de la proteína quinasa D y JNK. En otro trabajo, el bloqueo de RYK disminuyó la capacidad de invasión dependiente de WNT5A y la expresión de MMP2 en células de glioma.<sup>175</sup> Por lo tanto, la señalización de WNT5A podría estar vinculada con la expresión de MMP en estas células cancerosas.

Sin embargo, también se han propuesto funciones antitumorales para WNT5A debido al antagonismo observado entre este ligando y la vía dependiente de  $\beta$ -catenina. Así, WNT5A suprime la proliferación, migración e invasividad en una línea celular tumoral de tiroides<sup>176</sup> e inhibe la actividad migratoria de una línea celular de cáncer colorrectal.<sup>177</sup>

Por otro lado, WNT5A se asocia con el mantenimiento de respuestas inmunes innatas tanto en homeostasis como en patología.<sup>118,178</sup> Factores proinflamatorios como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6 así como patógenos microbianos inducen la expresión de WNT5A en varios tipos de células destacando el papel fundamental para WNT5A en la respuesta inmune.<sup>118</sup> Halleskog y col.<sup>179</sup> mostraron que WNT5A a través de ERK1/2 inducía la expresión de citoquinas, quimioquinas y metaloproteasas en microglia. En la misma línea, el trabajo de Kim J y col.<sup>180</sup> mostró un papel clave de WNT5A en la regulación de la inflamación endotelial. Además, también se ha descrito recientemente que el aumento de la expresión de WNT5A promueve el estado proinflamatorio en tejido adiposo visceral.<sup>181</sup> Otro estudio muestra que WNT5A está sobreexpresado en la periodontitis, donde su presencia potencia la inflamación, la producción de CXCL8/IL-8 y la erosión ósea.<sup>182</sup> Además, WNT5A contribuye a la respuesta inmune al regular la diferenciación de células T e inducir la liberación de CXCL8/IL8 y CCL2 promoviendo la migración de neutrófilos al sitio de lesión.<sup>118</sup> Así, se ha descrito que los neutrófilos expresan varios receptores de WNT5A, como son FZD2, FZD5 y FZD8.<sup>183</sup>

Durante las últimas décadas, WNT5A se ha asociado con varios trastornos inflamatorios como aterosclerosis, psoriasis y AR.<sup>184</sup> En la aterosclerosis y psoriasis se ha observado un aumento de expresión de WNT5A en regiones ricas en macrófagos y placas ateroscleróticas y

psoriásicas, respectivamente. Además, WNT5A estimula la proliferación y calcificación de células endoteliales, asociado con la patogénia de la aterosclerosis. En la psoriasis WNT5A potencia la señalización proinflamatoria del IFN $\gamma$ .

## **2.5. IMPLICACIÓN DE WNT5A EN LA PATOGENIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE**

Varios estudios han sugerido la contribución de WNT5A en la patogénia de la AR. Sen y col.<sup>185</sup> describieron un aumento de expresión de WNT5A y su receptor FZD5 en tejido sinovial de pacientes con AR, en comparación con controles. Además, en este trabajo también se demostró que FLS de controles sanos transfectados con un vector de expresión para WNT5A expresaban niveles más altos de IL6, IL15 y CXCL8/IL8, sugiriendo que la vía no canónica de WNT podría regular la respuesta inflamatoria de los sinoviocitos reumatoides. Apoyando esta hipótesis, otro trabajo de Sen y col.<sup>186</sup> mostró que la supresión de la señalización de WNT5A/FZD5 en sinoviocitos reumatoides transfectados con un dominante negativo frente a WNT5A inhibió su activación y redujo la producción de IL6, IL15 y RANKL.

Otro aspecto a destacar es la implicación de la vía no canónica de WNT en la regulación de la masa ósea. Desde hace años es conocido que la vía canónica regula la activación de osteoblastos y osteoclastos para reprimir la formación de hueso y promover la resorción ósea. Sin embargo, no se conocía si la vía no canónica podía estar implicada en este proceso hasta que el trabajo de Maeda y col.<sup>187</sup> mostró que la vía de señalización Wnt5a/Ror2/Jnk en osteoblastos y precursores de osteoclastos incrementa la diferenciación de los osteoclastos y la resorción ósea en el modelo murino CIA.

Más recientemente, MacLauchlan y col.<sup>188</sup> investigaron el papel endógeno de WNT5A en la AR. Así, ratones con deficiencia inducible de Wnt5a mostraron una reducción de la gravedad de la artritis inducida por transferencia de suero K/BxN, con una disminución de la inflamación, infiltrado celular, daño del cartílago y una reducción de la actividad de los osteoclastos.

Estos trabajos indican que la señalización de WNT5A puede tener un papel importante en distintos aspectos de la patogénia de la AR. Sin embargo, todavía se desconoce su papel en el fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides. Por lo tanto, mejorar el conocimiento del papel de esta vía en la AR puede ayudar a identificar nuevas dianas terapéuticas para conseguir mejor control de la enfermedad en los pacientes resistentes a los tratamientos actuales.



## **OBJETIVOS**



---

Numerosos estudios han resaltado el importante papel que adquieren los sinoviocitos tipo fibroblastos en la patogenia de la AR, contribuyendo tanto a la inflamación articular como del daño del cartílago y la erosión ósea. Sin embargo, todavía no se han desarrollado terapias dirigidas frente a estas células. Por ello, conocer en profundidad las vías de señalización implicadas en la regulación de la migración e invasión de los FLS es esencial para encontrar nuevas estrategias terapéuticas eficaces.

Como se ha comentado previamente, trabajos recientes han destacado el papel de la vía no canónica de WNT5A en los procesos de migración e invasión celular, así como su contribución a la inflamación y la osteoclastogénesis. Nuestra hipótesis es que el incremento de señalización de la vía no canónica de WNT5A puede contribuir al comportamiento agresivo de los sinoviocitos y a la pérdida ósea que se observa en la artritis reumatoide. Por lo tanto, el estudio de esta vía podría proporcionar nuevas dianas terapéuticas potenciales para la AR.

De este modo, el objetivo general de esta tesis es analizar la implicación de la vía de señalización no canónica de WNT5A en la patogenia de la artritis reumatoide.

Para ello se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la expresión de WNT5A en FLS de AR vs OA.
2. Analizar el efecto del tratamiento con Wnt5a recombinante (rWnt5a) o del silenciamiento de WNT5A sobre la capacidad de migración, invasión y proliferación de sinoviocitos reumatoides.
3. Estudiar el papel de WNT5A en la respuesta inflamatoria de los sinoviocitos reumatoides.
4. Analizar los mecanismos moleculares responsables de los efectos observados.
5. Evaluar el potencial de la inhibición de la vía de señalización de WNT5A como tratamiento de la artritis con la ayuda del modelo preclínico de artritis murina por transferencia de suero K/BxN.
6. Estudiar el papel de la vía no canónica de WNT5A en la osteoclastogénesis *in vitro*, en ratones artríticos y pacientes con AR.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. SINOVIOCITOS TIPO FIBROBLASTO

### 1.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO CELULAR DE SINOVIOCITOS TIPO FIBROBLASTO

Se aislaron los FLS a partir de tejido sinovial de pacientes con AR sometidos a cirugía de reemplazamiento articular o sinovectomía. Todos los pacientes cumplían los criterios de la ACR de 2010 para el diagnóstico de AR<sup>107</sup> y dieron su consentimiento informado por escrito para participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica (CEIC) de Galicia (código 2017/521). En su realización se siguieron los principios éticos para las investigaciones en seres humanos recogidos en la Declaración de Helsinki (2013), las normas de Buena Práctica Clínica (BPC) y se cumplió la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (LOPD).

El tejido sinovial fue cortado, triturado y digerido con 100 µg/mL de colagenasa (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU) en medio “*Dulbecco's Modified Eagle*” (DMEM; Lonza, Suiza) sin suero fetal bovino (FBS) (HyClone; Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU) a 37°C durante 3 horas. Tras la digestión, los sinoviocitos se centrifugaron en medio de cultivo DMEM completo (DMEM suplementado con 10% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina (Lonza) y 1% L-glutamina (Gibco; Thermo Fisher Scientific)) a 1400 rpm durante 7 minutos. Después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante, el pellet de células se resuspendió en medio de cultivo completo y se sembró en placas de seis pocillos (placas P6), en una atmosfera húmeda a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando los sinoviocitos alcanzaron la confluencia, entorno al 90%, se levantaron con Tripsina-EDTA (Lonza) y se dividieron con una ratio 1:3.

Durante el mantenimiento de los FLS, cada 3 días el medio de cultivo fue renovado completamente. En todos los experimentos, las células se utilizaron entre los pases 3 y 8.

### 1.2. TRATAMIENTOS

Los FLS fueron tratados con TNF $\alpha$  (10 ng/mL; Sigma-Aldrich), Wnt5a recombinante (rWnt5a; 400 ng/mL; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EEUU), anticuerpo anti-RYK ( $\alpha$ -RYK; 1 µg/mL; Abgent, San Diego, California, EEUU), anticuerpo anti-ROR2 ( $\alpha$ -ROR2; 4 µg/mL; OriGene, Rockville, Maryland, EEUU) y los siguientes inhibidores: Y-27632 2HCl (inhibidor ROCK (iROCK)); 20 µM = 6,4 µg/mL; Selleckchem, Munich, Alemania), PD 98059 (inhibidor MAPK – ERK; 20 µM = 5,3 µg/mL; Sigma-Aldrich), SB 203580 (inhibidor MAPK – p38; 10

$\mu\text{M} = 3,8 \mu\text{g/mL}$ ; Sigma-Aldrich), LY 294002 (inhibidor PI3K;  $10 \mu\text{M} = 3,4 \mu\text{g/mL}$ ; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 1,2-bis (2 aminofenoxi) etano- N, N, N, N- ácido tetraacético (BAPTA-AM (quelante del calcio);  $10 \mu\text{M} = 7,6 \mu\text{g/mL}$ ; Enzo Life Science, Inc., Farmingdale, NY, EEUU). El inhibidor de ROCK fue reconstituido en DMSO, por lo que en los experimentos con este tratamiento se le añadió al grupo control el 0,04% de DMSO.

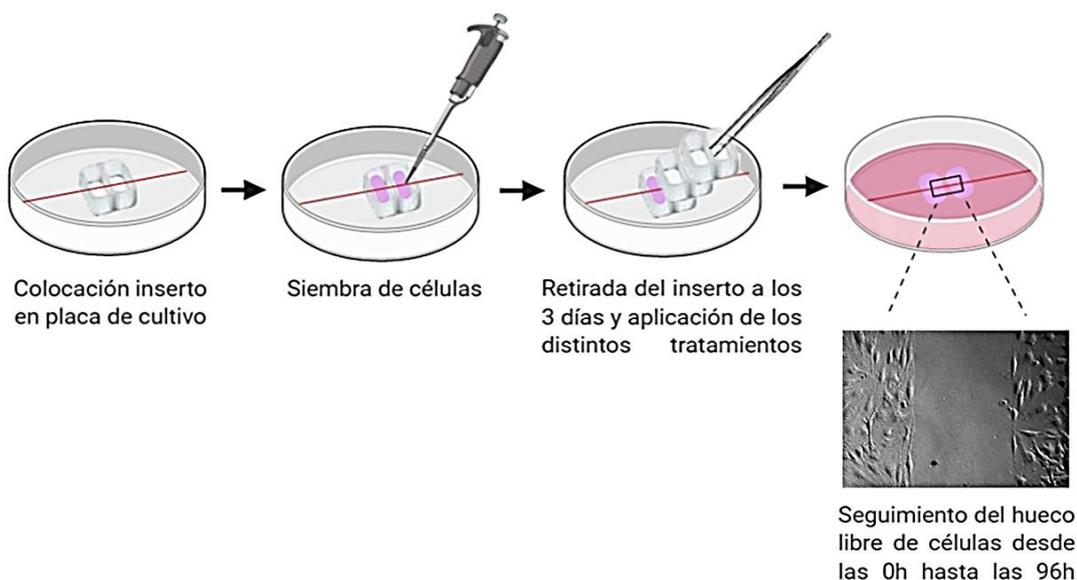
### **1.3. SILENCIAMIENTO DEL GEN *WNT5A* Y DE LOS RECEPTORES DE LA VÍA NO CANÓNICA DE *WNT5A***

Se suprimió la expresión de *WNT5A* y de los receptores de la vía no canónica mediante la técnica de transfección de ARN de interferencia (siARN). Así, se utilizaron siARN ON-TARGETplus SMARTpool para *WNT5A*, *FZD1*, *FZD2*, *FZD4*, *FZD7*, *ROR1*, *ROR2*, *RYK* y control (Dharmacon; Horizon Discovery Group, Cambridge, Reino Unido). Para realizar el silenciamiento, los FLS se sembraron en placas P6 a una densidad de  $15 \times 10^4$  células/pocillo, al 70% de confluencia, en medio DMEM con 10% FBS y 1% L-glutamina. Los FLS fueron transfectados con 50 nM de siARN en Opti-MEM I (Gibco; Thermo Fisher Scientific) utilizando DharmaFECT 1 (Dharmacon) durante 6 horas. El grado de supresión se determinó mediante Western blot (WB) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (qPCR) a las 24h y 96h de la transfección. Los experimentos se realizaron 24 horas después de la transfección.

### **1.4. ENSAYO DE MIGRACIÓN**

La migración de los FLS se analizó mediante un ensayo de motilidad de “cierre de herida” usando insertos de Ibidi (Ibidi GmbH, Martinsried, Alemania). Estos insertos, compuestos por dos cámaras separadas por una pared de 500  $\mu\text{m}$  de grosor, se colocaron en placas de 24 pocillos (placas P24). Se sembraron  $15 \times 10^3$  FLS/ pocillo en medio DMEM completo en las cámaras de los insertos. Al tercer día de cultivo, las células alcanzaron el 90-100% de confluencia y se retiraron los insertos para crear un espacio libre de células. A continuación, las células se trataron con diversos tratamientos en DMEM, 1% de FBS, 1% de L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina, como se indica en el apartado de resultados. Se realizaron fotos a 0 y 96 horas tras el tratamiento o transfección con un aumento de 10X con el microscopio Axio Vert.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y, utilizando el software Image J (National Institutes

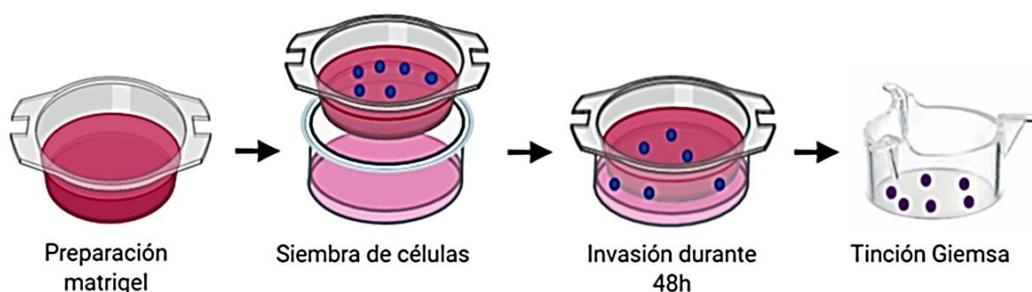
of Health, Bethesda, Maryland, EEUU), se cuantificó el área libre de células entre las dos cámaras.(Figura 11).



**Figura 11. Esquema representativo del ensayo de migración.** Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

### 1.5. ENSAYO DE INVASIÓN

Para estudiar la capacidad de invasión de los sinoviocitos reumatoides se utilizaron insertos o cámaras Millicell (Merck KGaA) selladas en un extremo con una membrana de tereftalato de polietileno de 8  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Figura 12). Estos insertos se suspendieron sobre los pocillos de placas de cultivo P24. La membrana se revistió con 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NH, EEUU) sobre el que se sembraron las células a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cámara en 200  $\mu\text{L}$  de medio DMEM suplementado con 1% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina y 1% L-glutamina y los distintos tratamientos. En la parte inferior de la cámara se puso DMEM con FBS al 10% que actuó como quimioatrayente. A continuación, las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C en 5% de  $\text{CO}_2$ . Las células que atravesaron la membrana se fijaron con paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) y se tiñeron con Giemsa (Merck KGaA). Se tomaron fotos de las células invasivas en 10 campos aleatorios en cada cámara, con un aumento de 20X, utilizando el microscopio Axio Vert.A1. Se determinó el número de células mediante el software Image J.



**Figura 12. Esquema representativo del ensayo de invasión.** Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

## 1.6. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Esta técnica se utilizó para analizar el efecto del silenciamiento de *WNT5A* y del tratamiento con la proteína recombinante Wnt5a (rWnt5a) sobre la proliferación espontánea de los sinoviocitos reumatoides. Se sembraron  $2 \times 10^3$  células/pocillo en placas de 96 pocillos (placas P96) con DMEM suplementado con 5% FBS, 1% penicilina/estreptomicina y 1% L-glutamina y se cultivaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente, los sinoviocitos se trataron con rWnt5a en DMEM con 5% FBS. La proliferación se determinó mediante el kit “*CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay*” (Promega Biotech Ibérica SL, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante, desde las 24h de tratamiento hasta las 96h. En este ensayo se determinó el número de células viables presentes en el cultivo celular, mediante la cuantificación de luminiscencia, que es proporcional a la cantidad de ATP presente. Para ello se usó un lector de microplacas FluoStar Optima (BMG Labtech; Thermo Fisher Scientific).

## 2. RATONES

En este trabajo de tesis se utilizaron ratones C57BL/6J, ratones transgénicos KRN, ratones “*non-obese diabetic*” (NOD) y ratones K/BxN, obtenidos del cruce de ratones KRN con ratones NOD.

- **Ratones C57BL/6J:** subcepa de ratones C57BL/6, también conocidos como ratones “*C57 black 6*” o “*black 6*”. Estos ratones son una cepa endogámica, por lo que, son considerados genéticamente idénticos entre sí. Tienen como ventajas la estabilidad de la cepa, su fácil crianza y que su genoma fue secuenciado por completo en el año 2005.<sup>189</sup> Estos ratones son utilizados en una amplia variedad de áreas de

investigación, incluyendo biología cardiovascular, biología del desarrollo, diabetes y obesidad, genética, inmunología, neurobiología e investigación neurosensorial.

- **Ratones KRN:** línea de ratones transgénicos para el receptor de células T (TCR) desarrollados por Kouskoff V y col.<sup>190</sup> Estos ratones fueron cedidos por C. Benoist y D. Mathis (Harvard Medical School (Boston, MA, EEUU)) y mantenidos en nuestro animalario mediante su cruce con ratones C57BL/6J.
- **Ratones NOD/LTJ:** de sus siglas en inglés “*non-obese diabetic*”, son ratones que se caracterizan por desarrollar espontáneamente diabetes mellitus autoinmune dependiente de insulina y expresar el MHC de clase II – A<sup>g7</sup>. Estos ratones fueron adquiridos en Charles River Laboratories (Lodi, Lombardía, Italia).

Los ratones se mantuvieron en el Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), número de registro REGA ES150780292901, en condiciones controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y humedad ( $48 \pm 10\%$ ), en salas libres de patógenos, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimentados ad libitum con agua y pienso compuesto comercial, esterilizado. Los procedimientos en ratones se realizaron en cumplimiento de la normativa vigente en España (Real Decreto 1386/2018) y fueron aprobados por el Comité de ética de experimentación animal (CEEAA) de los centros usuarios de animales de experimentación de la USC en el campus de Santiago, así como por la Consellería do Medio Rural e do Mar (número de autorización 15010/14/004 y 15012/2020/009).

## 2.1. GENOTIPADO DE RATONES KRN

Los ratones KRN fueron genotipados cuatro semanas después de su nacimiento mediante PCR utilizando ADN obtenido de la cola.

Los fragmentos de las colas se lisaron en tampón Tris HCl (100 mM pH 8,5), conteniendo ácido etilaminotetraacético (EDTA; 5 mM; Sigma-Aldrich), dodecilsulfato sódico (SDS; 0,2%; Sigma-Aldrich), cloruro sódico (NaCl, 200 mM; Thermo Fisher Scientific) y proteinasa K (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sigma-Aldrich) durante toda la noche a  $55^\circ\text{C}$  en agitación. Posteriormente, se centrifugaron los tubos con las colas digeridas y se recogió el sobrenadante donde se encuentra el ADN. El ADN se precipitó con isopropanol (Labbox Labware S.L., Barcelona, España) y se resuspendió en tampón TE (10 mM Tris HCl y 0,1 mM EDTA pH 7,5) hasta una concentración final de 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

En la siguiente tabla se recogen los cebadores utilizados para testar la presencia de los genes  $TCR\alpha$  y  $TCR\beta$  transgénicos KRN (Tabla 3).

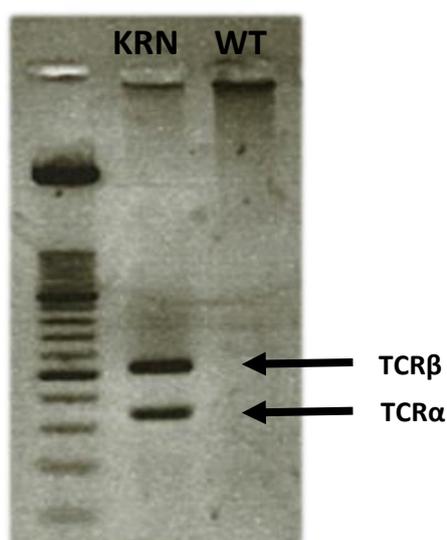
**Tabla 3. Cebadores para los genes transgénicos de KRN.**

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	REGIÓN
$TCR\alpha$	AGGTCCACAGCTCCTTCTGA	GTATTGGAAGGGGCCAGAG	146 pb
$TCR\beta$	GGGCAAAAACCTGACCTTGAA	GAGCCTGGTTGTTTGTGGAT	277 pb

Los cebadores del gen  $TCR\alpha$  amplifican el alelo de la cadena  $\alpha$  del TCR mientras que los cebadores del gen  $TCR\beta$  amplifican el alelo de la cadena  $\beta$ , por lo que la presencia de ambas bandas confirmó que se trata de un transgénico KRN, es decir, que porta este receptor en los linfocitos T.

El extracto de ADN (1  $\mu$ L) se amplificó utilizando los siguientes reactivos: tampón de PCR 1X, cloruro magnésico ( $MgCl_2$ ) 3 mM, betaína 0,5 M, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 200  $\mu$ M, cebadores 0,5  $\mu$ M de cada uno, Taq ADN polimerasa 0,5 U y  $H_2O_{mQ}$  hasta completar un volumen final de 25  $\mu$ L. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C y 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

El tamaño de los fragmentos del ADN amplificado se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Figura 13).



**Figura 13. Genotipado ratón KRN.** Gel de agarosa en el que se muestran los fragmentos de los genes  $TCR\alpha$  y  $TCR\beta$  de un ratón KRN vs ratón WT.

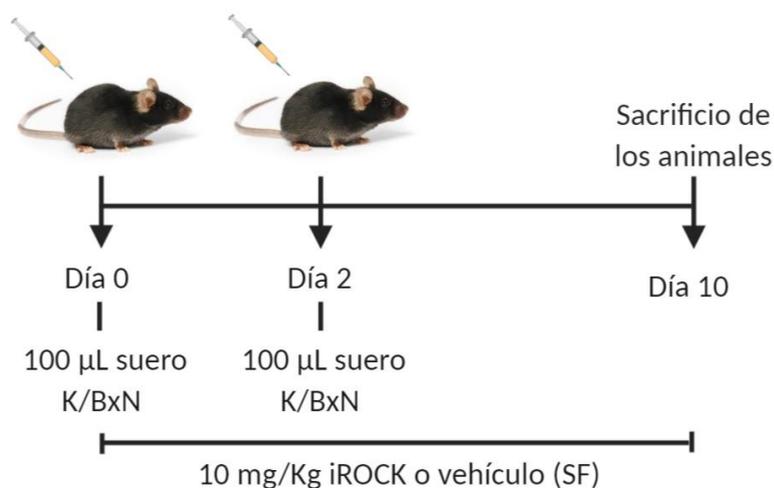
## **2.2. MODELO DE ARTRITIS PASIVA POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN**

En 1996, un nuevo modelo murino de artritis espontánea fue descrito por Kouskoff y col.<sup>190</sup> Al cruzar ratones de la línea transgénica KRN con ratones NOD se obtienen ratones K/BxN, los cuales desarrollan una artritis inflamatoria crónica, simétrica, muy severa y destructiva a partir de las 3-4 semanas de vida. En este modelo, el reconocimiento de la enzima glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI) por células T transgénicas en el contexto del MHC de clase II- Ag<sup>7</sup> da lugar a una respuesta inmune con producción de elevados niveles de anticuerpos artritogénicos anti-GPI. La artritis de estos ratones es muy similar a la artritis humana, con formación del *pannus* y degradación del cartílago y hueso.

En este trabajo de tesis se ha utilizado el modelo de artritis pasiva por transferencia de suero. De este modo, la transferencia de suero K/BxN que contiene anticuerpos anti-GPI a ratones sanos C57BL/6J induce, en éstos últimos, una artritis de características similares a la del modelo espontáneo, pero con una evolución más rápida y controlada, aunque autolimitada en el tiempo. Además, tiene la ventaja de que la incidencia de la artritis en este modelo alcanza el 100%.

## **2.3. TRATAMIENTOS Y EVOLUCIÓN DE LA ARTRITIS EN EL MODELO MURINO**

Se utilizaron dos grupos de ratones C57BL/6J de 7-8 semanas de edad; un grupo control en el que los ratones fueron tratados con suero fisiológico (SF; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemania) y un grupo experimental en el que los ratones se trataron con el inhibidor de ROCK (Y-27632 2HCl; iROCK). La asignación de los ratones a cada grupo fue aleatoria. La artritis se indujo en los ratones de ambos grupos mediante la inyección, por vía intraperitoneal, de 100 µL de suero K/BxN a día 0 y día 2. En el grupo experimental los ratones se trataron con inyecciones intraperitoneales diarias de 10 mg/Kg de Y-27632 desde el día 0 hasta su sacrificio, a día 10. Los ratones del grupo control se trataron con el mismo volumen de suero fisiológico, siguiendo el mismo esquema terapéutico (Figura 14).



**Figura 14. Esquema terapéutico de iROCK (Y-27632) en el modelo murino de artritis por transferencia de suero K/BxN.** Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

La evolución clínica de la artritis se determinó por dos observadores independientes siguiendo un sistema de puntuación semicuantitativo del grado de inflamación de cada articulación desde el día 0 hasta día 10. La puntuación se clasifica en 4 grados para cada miembro y dedos, con una puntuación máxima para cada ratón de 20 puntos (Tabla 4 y Tabla 5). Además, cada día se evaluó el estado de bienestar de los ratones durante todo el experimento.

**Tabla 4. Sistema de puntuación semicuantitativo del grado de inflamación de cada articulación.**

PUNTUACIÓN	DESCRIPCIÓN
0	Normal
1	Ligero edema y enrojecimiento del tobillo o muñeca
2	Moderado enrojecimiento e inflamación de tobillo o muñeca
3	Severo enrojecimiento e inflamación de tobillo o muñeca
4	Máxima inflamación y enrojecimiento con rigidez de la articulación que afecta a la movilidad

**Tabla 5. Sistema de puntuación de los dedos afectados.**

PUNTUACIÓN	DESCRIPCIÓN
1	1 o 2 dedos afectados
2	3 o 4 dedos afectados
3	5 o 6 dedos afectados
4	7 o más dedos afectados

#### 2.4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS ARTICULACIONES

Se extrajeron las articulaciones (tobillos y muñecas) a los 10 días de iniciar el tratamiento tras sacrificio de los animales mediante CO<sub>2</sub> y dislocación cervical.

Se decidió utilizar el tobillo y pie derecho para estudio histológico por lo que se fijaron en formol durante 6 horas y fueron descalcificados en tampón fosfato salino (PBS), EDTA 0,5M sin calcio/magnesio durante un periodo total de tres semanas (renovando el tampón descalcificante cada dos días). Las restantes articulaciones se congelaron a -80°C para su posterior homogeneización en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub> líquido). Una vez pulverizada la muestra en N<sub>2</sub> líquido se realizó la extracción de ARN y de proteínas totales. Para la extracción de ARN se utilizó Trizol y el kit de extracción “*Speedtools total RNA extraction kit*” (Biotools, Madrid, España). Para la obtención de extractos proteicos totales se utilizó un tampón de lisis no comercial. El protocolo utilizado se detalla en profundidad más adelante.

#### 2.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los tobillos y pies derechos previamente fijados y descalcificados con PBS-EDTA fueron incluidos en parafina. Los bloques se cortaron y tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para valorar la inflamación sinovial y erosión ósea, con tinción de azul de toluidina para evaluar el daño del cartílago y con la tinción de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) para determinar la presencia de osteoclastos (Tabla 6).

Tabla 6. Sistema de puntuación del análisis histológico de las articulaciones.

	PUNTUACIÓN	DESCRIPCIÓN
<b>INFLAMACIÓN SINOVIAL</b>	<b>0</b>	Ausencia de inflamación
	<b>1</b>	Engrosamiento sinovial e infiltrado en “ <i>sublining</i> ”
	<b>2</b>	Ligera formación del <i>pannus</i>
	<b>3</b>	Moderada formación del <i>pannus</i>
	<b>4</b>	Severa formación del <i>pannus</i>
<b>DAÑO AL CARTÍLAGO</b>	<b>0</b>	Ausencia de daño
	<b>1</b>	Pérdida de proteoglicanos
	<b>2</b>	Pérdida de proteoglicanos y ligera destrucción superficial
	<b>3</b>	Destrucción que se extiende a la zona central
	<b>4</b>	Destrucción del cartílago en todo su espesor
<b>EROSIÓN ÓSEA</b>	<b>0</b>	Ausencia de erosión ósea
	<b>1</b>	Pequeñas áreas de resorción
	<b>2</b>	Áreas de resorción más numerosas
	<b>3</b>	Gran destrucción sin alteración de la estructura
	<b>4</b>	Gran destrucción con alteración de la estructura
<b>PRESENCIA DE OSTEOCLASTOS</b>	<b>0</b>	Ausencia de osteoclastos
	<b>1</b>	Osteoclastos aislados y escasos
	<b>2</b>	Algún foco disperso de osteoclastos
	<b>3</b>	Múltiples focos de osteoclastos
	<b>4</b>	Presencia difusa de osteoclastos a lo largo del hueso

## 2.6. OSTEOCLASTOGÉNESIS *IN VITRO* Y ENSAYO DE RESORCIÓN ÓSEA EN RATONES ARTRÍTICOS

Se extrajo la médula ósea (MO) de tibias y fémures diseccionados de ratones C57BL/6J a los 10 días de la inducción de artritis por transferencia de suero K/BxN para la diferenciación a osteoclastos. Las células de la MO se incubaron a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> en “*Minimum Essential Eagle – alpha modification*” (αMEM; Lonza) completo, suplementado con 10% de FBS, 1% penicilina/estreptomicina y 1% L-glutamina. A las 24 horas, se recogieron las células no adherentes y se sembraron 2 x 10<sup>6</sup> células por pocillo en placas P24 para la diferenciación a osteoclastos y en placas con pocillos recubiertos de carbonato de apatita (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokio, Japón) para el ensayo de resorción ósea. En ambos casos se utilizó el medio de diferenciación: α-MEM completo con 30 ng/mL de MCSF (PeproTech EC, Ltd., Londres,

Reino Unido) durante 2 días. Después, los precursores de osteoclastos se cultivaron durante 8 días con  $\alpha$ -MEM completo conteniendo 40 ng/mL de MCSF, 100 ng/mL de RANKL (PeproTech EC, Ltd.) y con iROCK, Y-27632 2HCl, a concentraciones de 20, 40, 80 y 100  $\mu$ M. En la situación control se añadió 0,04% de DMSO, puesto que el inhibidor de ROCK fue reconstituido en este vehículo. El medio fue renovado cada dos días.

A los 8 días se analizó el porcentaje de diferenciación del cultivo mediante la tinción de TRAP utilizando el kit “TRAP/ALP Stain kit” (FUJIFILM Wako Chemicals Europe, Neuss, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron fotos a 20 campos aleatorios por pocillo con un aumento de 40X, con el microscopio Axio Vert.A1. Mediante el software Image J se determinó el número de osteoclastos. Para el ensayo de resorción, a los 10 días de cultivo, los pocillos se lavaron con hipoclorito sódico (Labbox Labware S.L.) al 5% durante 5 minutos. Se tomaron 10 fotos por pocillo con el objetivo de 20X, utilizando el microscopio Axio Vert.A1. Las áreas de resorción fueron cuantificadas utilizando el sistema de análisis Image J.

## **2.7. OBTENCIÓN DE OSTEÓBLASTOS Y ENSAYO DE MINERALIZACIÓN**

Se obtuvieron osteoblastos primarios de tibias y fémures de ratones artríticos C57BL/6J. Para ello, las epífisis se cortaron en pequeños trozos y se cultivaron en medio osteogénico,  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% de FBS, 1% penicilina/estreptomina, 1% glutamina y 0,28 mM de ácido ascórbico (Thermo Fisher Scientific), en pocillos P6 a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. El medio se renovó a las 24 horas de la siembra y posteriormente cada tres días. Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia se levantaron con Tripsina-EDTA y se sembraron en pocillos P24 (15 x 10<sup>4</sup> células/pocillo) en medio osteogénico con iROCK a distintas concentraciones, 40, 80 y 100  $\mu$ M, o vehículo DMSO. Tras 10 días de tratamiento se evaluó la formación de nódulos mineralizados mediante la tinción de von Kossa. Para realizar la tinción de von Kossa, las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4%. La tinción se realizó con solución de nitrato de plata al 5% bajo luz ultravioleta durante 1 hora, seguido de solución de pirogalol (Sigma Aldrich) al 1% durante 5 min. Se tomaron 10 fotos por pocillo con el objetivo de 10X, utilizando el microscopio Axio Vert.A1. Se cuantificó el grado de mineralización mediante el software Image J.

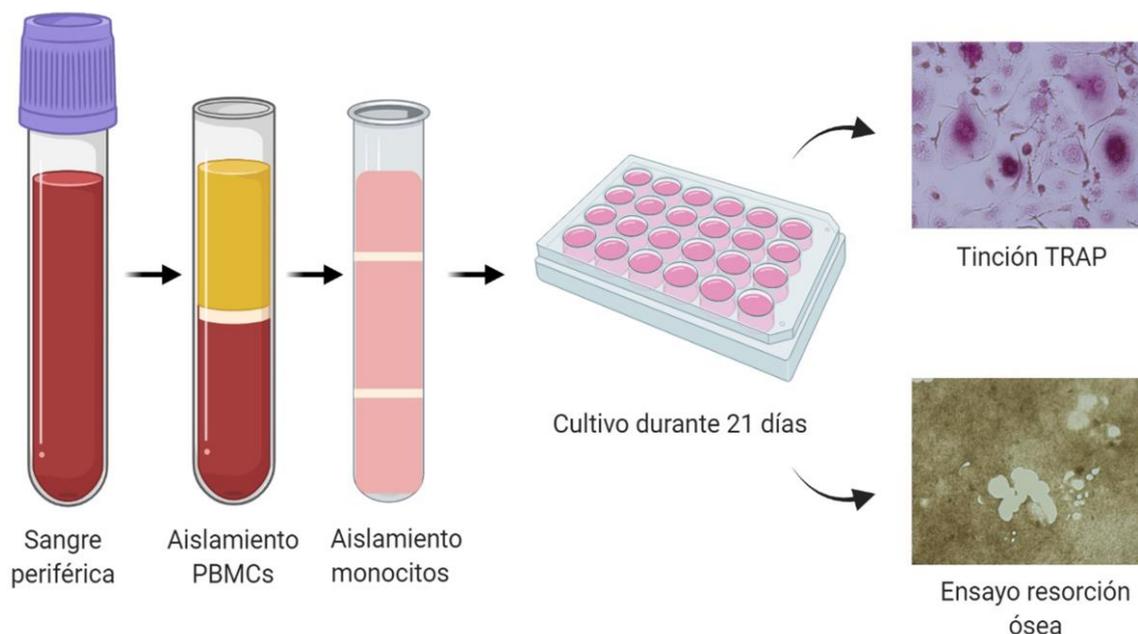
### 3. MONOCITOS

#### 3.1. AISLAMIENTO DE MONOCITOS HUMANOS

Los monocitos humanos fueron aislados a partir de pacientes con artritis inflamatoria que van a iniciar tratamiento con FAME. Los pacientes firmaron el consentimiento informado para participar en este estudio.

La sangre fue diluida en proporción 1:1 con PBS suplementado con 5% de FBS. Para obtener las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se añadió cuidadosamente 5 mL de sangre periférica diluida sobre 5 mL de Lymphoprep (ProGen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Alemania). A continuación, se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a 1000 g sin freno, a temperatura ambiente. Las PBMCs se recogieron de la interfaz y se lavaron dos veces con PBS suplementado con 5% FBS.

Los monocitos se aislaron a partir de las PBMCs mediante separación en un gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich) que consta de tres capas de densidad (1,076; 1,059 y 1,045 g/mL). La fracción presente en la capa media, que contenía predominantemente monocitos, se cultivó en placas P24 para los ensayos de osteoclastogénesis y resorción ósea (Figura 15).



**Figura 15. Esquema representativo del aislamiento de monocitos humanos a partir de sangre periférica.** Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.

### 3.2. TRATAMIENTOS

Los monocitos fueron tratados con MCSF (25 ng/mL; Gibco; Thermo Fisher Scientific), con RANKL (100 ng/mL; PeproTech EC, Ltd.) y con iROCK, Y-27632 2HCl, (20, 40, 80 y 100  $\mu$ M; Selleckchem). El inhibidor de ROCK fue reconstituido en DMSO, por lo que en situación control se añadió 0,04% de DMSO.

### 3.3. OSTEOCLASTOGÉNESIS *IN VITRO* Y ENSAYO DE RESORCIÓN ÓSEA

Los monocitos procedentes de pacientes con AR inflamatoria se sembraron en placas P24 para diferenciarlos hacia osteoclastos, y en placas con pocillos recubiertos de carbonato de apatita para valorar su actividad de resorción ósea. Las células se cultivaron a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células por pocillo durante 1 hora con medio  $\alpha$ MEM suplementado con 1% FBS. A continuación, los pocillos se lavaron con  $\alpha$ MEM 1% FBS para eliminar las células no adherentes. Los monocitos se cultivaron durante 4 días con  $\alpha$ MEM suplementado con 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina y 25 ng/mL de MCSF. A partir del cuarto día, las células se cultivaron en presencia de MCSF (25 ng/mL), 100 ng/mL de RANKL y con el iROCK a distintas concentraciones, concretamente a 20, 40, 80 y 100  $\mu$ M. La mitad del medio fue renovado tres veces por semana hasta el día 21 de cultivo.

El porcentaje de diferenciación del cultivo se analizó mediante la tinción de TRAP, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron fotos a 20 campos aleatorios por pocillo con un aumento de 20X, con el microscopio Axio Vert.A1. Células TRAP positivas multinucleadas con tres o más núcleos se consideraron osteoclastos. Mediante el software Image J se determinó el número de osteoclastos.

Para estudiar la actividad funcional de los osteoclastos diferenciados se utilizó el ensayo de resorción ósea. Para ello, en el día 21 de cultivo, los pocillos se lavaron durante 5 minutos con hipoclorito sódico al 5% para eliminar las células y se tomaron 20 fotos por pocillo con el objetivo de 10X, utilizando el microscopio Axio Vert.A1. Las áreas de resorción fueron cuantificadas utilizando el sistema de análisis Image J.

## 4. TÉCNICAS GENERALES

### 4.1. EXTRACCIÓN DE ARN

El ARN total, tanto de las células en cultivo como de las muñecas y tobillos de ratones C57BL/6J tratados, se obtuvo utilizando el kit de extracción “*Speedtools total RNA Extraction Kit*” (Biotools), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) y se conservó a -80°C hasta su uso.

### 4.2. SÍNTESIS DE ADNc

El ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) se obtuvo a partir del ARN total extraído mediante el kit “*Verso cDNA Synthesis Kit*” (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el siguiente programa de transcripción inversa: 1 ciclo de 30 minutos a 42°C para la síntesis de ADNc y 2 minutos a 95°C para la inactivación de desoxirribonucleasas (DNAsas).

### 4.3. PCR EN TIEMPO REAL (RT-PCR) O PCR CUANTITATIVA (qPCR)

Mediante PCR en tiempo real, también conocida como PCR cuantitativa, se determinaron los niveles de expresión de diversos genes. Para ello, se amplificaron 50 ng de ADNc por reacción, en duplicado, utilizando los reactivos SYBR Green qPCR Master Mix (Biomake, Munich, Alemania) en un termociclador RotorGen (Corbett; Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 10 minutos a 50°C, 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de 20 segundos a 95°C y 20 segundos a 60°C. Los niveles de expresión de los genes se normalizaron utilizando como control al gen de la  $\beta$ -actina. Estos niveles se cuantificaron mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = Ct_{gen} - Ct_{\beta-actina}$ . En situación basal o no transfectada (NT),  $\Delta Ct$  se consideró como 0 y, por tanto,  $2^0 = 1$ .

Para estudiar la expresión en situación basal o tras los ensayos de silenciamiento de *WNT5A* y de sus receptores en FLS se utilizaron los cebadores de QIAGEN (Hilden, Alemania) para los siguientes genes: *WNT5A*, *FZD1*, *FZD2*, *FZD4*, *FZD7*, *ROR1*, *ROR2*, *RYK* y  $\beta$ -ACTINA.

Para estudiar la producción de mediadores inflamatorios y metaloproteasas en FLS tras tratamiento con Wnt5a recombinante, TNF o tratamiento combinado se utilizaron cebadores

para los siguientes genes: *IL6*, *IL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CXCL5*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* y *MMP13* (QIAGEN).

Para comparar la expresión de mediadores proinflamatorios y metaloproteasas en ratones C57BL/6J tratados con iROCK o tratados con vehículo los cebadores fueron diseñados mediante Primer3 Input Web versión 4.1.0 y sintetizados por Thermo Fisher Scientific (Tabla 7).

**Tabla 7. Cebadores murinos utilizados para analizar la expresión de mediadores inflamatorios y metaloproteasas.**

GEN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO	REGIÓN (PB)
<i>mCcl2</i>	ATCCCAATGAGTAGGCTGGA	TCTGGACCCATTCCTTCTTG	127
<i>mCxcl1</i>	GCTGGGATTCACCTCAAGAA	GTGGCTATGACTTCGGTTTG	83
<i>mCxcl5</i>	AGTGCCCTACGGTGGAAGT	TGCATTCCGCTTAGCTTTCT	133
<i>mIl1β</i>	GACCTTCCAGGATGAGGACA	AGCTCATATGGGTCCGACAG	183
<i>mIl6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TTCTGCAAGTGCATCATCGT	84
<i>mMmp1</i>	CTTCCTGCCAGAACCTTTGA	TGCTAGGGAAGCCAAAGAAA	197
<i>mMmp3</i>	TTGTCCCGTTTCCATCTCTC	TGGTGATGTCTCAGGTTCCA	129
<i>mMmp9</i>	CATTCGCGTGGATAAGGAGT	TCACACGCCAGAAGAATTTG	107
<i>mMmp13</i>	TGATGAAACCTGGACAAGCA	TCATGGGCAGCAACAATAAA	60
<i>mNos2</i>	CACCTTGGAAGAGGAGCAAC	AAGGCCAAACACAGCATACC	145
<i>mTnfa</i>	ACGTGGAAGTGGCAGAAGAG	CTGATGAGAGGGAGGCCATT	190
<i>mActina</i>	GCTACAGCTTACCACCACA	ATGCCACAGGATTCCATACC	232

#### 4.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para la obtención de extractos proteicos totales se utilizó un tampón de lisis no comercial que contiene 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl, 30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 5 mM EDTA, 100 mM NaF, 1% Triton X-100 y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. En el momento de realizar la extracción de proteínas se añadió 10 µL del cóctel comercial de inhibidores de proteasas (PIK2; Sigma-Aldrich) por cada mililitro de tampón de lisis. Mediante un raspador celular se lisaron las células. El lisado se dejó en reposo durante 30 minutos en hielo. A continuación, se centrifugó a 13 000 g durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método colorimétrico Bradford utilizando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (California, EEUU). El extracto de proteínas se conservó a -20°C hasta su uso.

#### 4.5. WESTERN BLOT

Las proteínas (entre 10 y 20 µg) se separaron en función de su peso molecular mediante una electroforesis en un gel SDS-PAGE del 8% de acrilamida (NZYTech, Lisboa, Portugal). A

continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Roche, Basilea, Suiza) tratada previamente con metanol y agua destilada. Después, la membrana se bloqueó con 5% leche desnatada en polvo en PBS-T (150 mM NaCl, 20 mM Tris Base (pH 7,6) y 0,1 % de Tween-20) durante 1 hora en agitación para evitar uniones inespecíficas.

Los anticuerpos primarios, recogidos en la tabla 8, se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación. La detección de las bandas se realizó mediante anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano al añadir el sustrato quimioluminiscente “*Inmobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate*” (Millipore, Massachusetts, EEUU) en el sistema ChemiDoc™ MD Imaging System (Bio-Rad).

**Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot.**

PROTEÍNA	ANTICUERPO
WNT5A	anti-human/mouse Wnt5a (Cod: MAB645; R&D Systems)
ERK	Kit anti-MAPK family (Cod: 9926; Cell Signaling Technology, Massachusetts, EEUU)
JNK	
P38	
pERK	Kit anti-fosfoMAPK family (Cod: 9910; Cell Signaling Technology)
pJNK	
pP38	
AKT	anti-human AKT (Cod: 9272; Cell Signaling Technology)
pAKT	anti- human pAKT (Ser473) (Cod: 9271; Cell Signaling Technology)
GSK3B	anti- human GSK3β (Cod: 9315; Cell Signaling Technology)
pGSK3β	anti- human pGSK3β (Cod: 9322; Cell Signaling Technology)
ROR2	anti-human ROR2 (Cod: sc-374174; Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, EEUU)
RYK	anti-human RYK (Cod: AP7677a; Abgent)
GAPDH	anti-human GAPDH (Cod: G9545; Sigma-Aldrich)

#### 4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Mediante el test de Wilcoxon para datos pareados y el test de Mann-Whitney para medidas independientes se analizaron las diferencias entre los grupos experimentales utilizando el programa GraphPAD Prism 5.0 (GraphPAD Software, San Diego, CA, EEUU).

El test ANOVA de medidas repetidas se utilizó para el análisis del tratamiento con iROCK en el modelo murino de artritis pasiva por transferencia de suero mediante el programa estadístico IBM SPSS (IBM SPSS Statistics, Hampshire, Reino Unido).



# **RESULTADOS**



# CAPÍTULO 1

## La señalización no canónica de WNT5A a través de RYK contribuye al fenotipo agresivo de los sinoviocitos tipo fibroblasto

Este capítulo ha sido publicado en *Frontiers in Immunology*. 2020;11: 555245. doi: 10.3389/fimmu.2020.555245. Editorial: Frontiers. ISSN: 1664-3224, licencia Creative Commons Attribution License (CC BY).

### **Non-canonical WNT5A signaling through RYK contributes to aggressive phenotype of the rheumatoid fibroblast-like synoviocytes.**

Ángela Rodríguez-Trillo<sup>1</sup>, Nerea Mosquera<sup>1</sup>, Carmen Pena<sup>1</sup>, Fátima Rivas-Tobío<sup>2</sup>, Antonio Mera-Varela<sup>3</sup>, Antonio González<sup>1</sup>, Carmen Conde<sup>1</sup>.

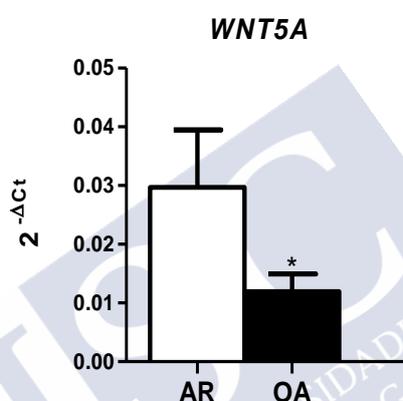
<sup>1</sup> Laboratorio de Reumatología Experimental y Observacional y Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), Servicio Galego de Saúde (SERGAS), Santiago de Compostela, España. <sup>2</sup> Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Hospital Virxe da Xunqueira, A Coruña, España. <sup>3</sup> Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS), Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), Servicio Galego de Saúde (SERGAS), Santiago de Compostela, España

Contribución doctoranda: realización de experimentos, análisis de datos y redacción del manuscrito



### 1.1. EXPRESIÓN DE WNT5A EN SINOVIOCITOS DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE Y PACIENTES CON ARTROSIS

En estudios previos se ha observado un aumento de la expresión de WNT5A en tejido sinovial y en sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide.<sup>180,185</sup> Para confirmar estos datos en nuestro estudio, analizamos la expresión de ARNm de *WNT5A* en FLS de 7 pacientes con AR y 5 pacientes con artrosis (OA) mediante PCR en tiempo real. Como se muestra en la figura 16, la expresión de *WNT5A* fue 2,6 veces mayor en FLS de artritis reumatoide que en FLS de artrosis ( $p < 0,05$ ).



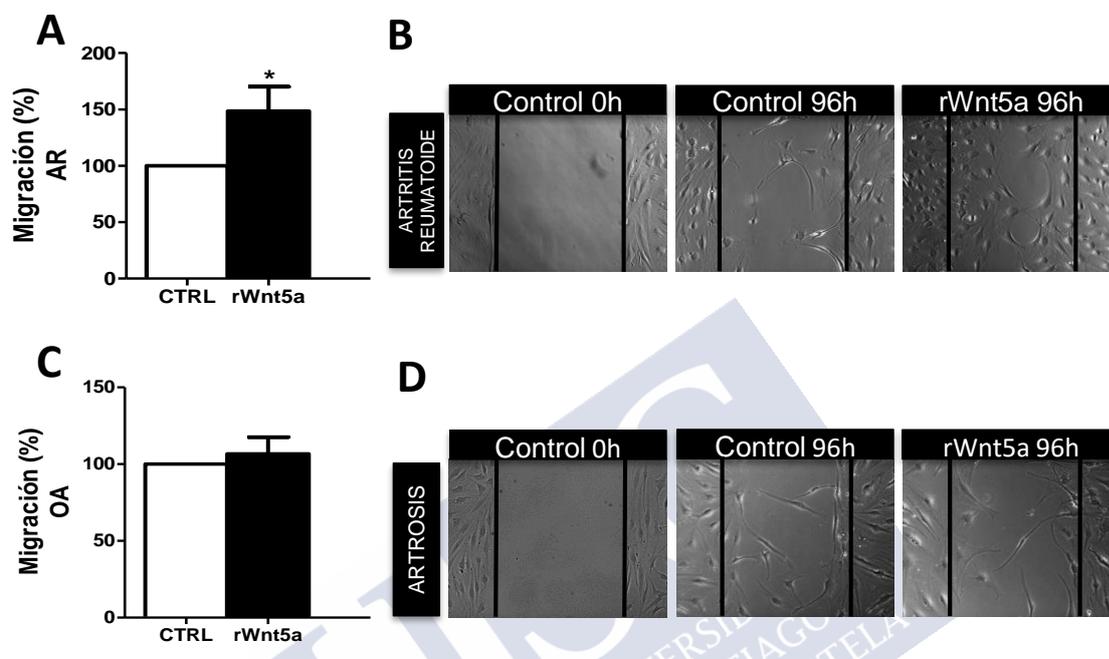
**Figura 16. Expresión de WNT5A en FLS de AR vs OA.** Niveles de ARNm de *WNT5A* corregidos por la expresión de  $\beta$ -ACTINA analizados mediante PCR en tiempo real en 7 pacientes con AR y 5 pacientes con OA. Los valores corresponden a la media  $\pm$  ESM. \* indica  $p < 0,05$  (test Mann-Whitney).

### 1.2. WNT5A PROMUEVE LA MIGRACION E INVASION DE LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES

Teniendo en cuenta la reciente implicación de la vía no canónica de WNT5A en la migración e invasión de células tumorales, así como las características pseudotumorales que adquieren los sinoviocitos reumatoides en el curso de la enfermedad, se estudió el papel de WNT5A en el fenotipo agresivo de estas células.

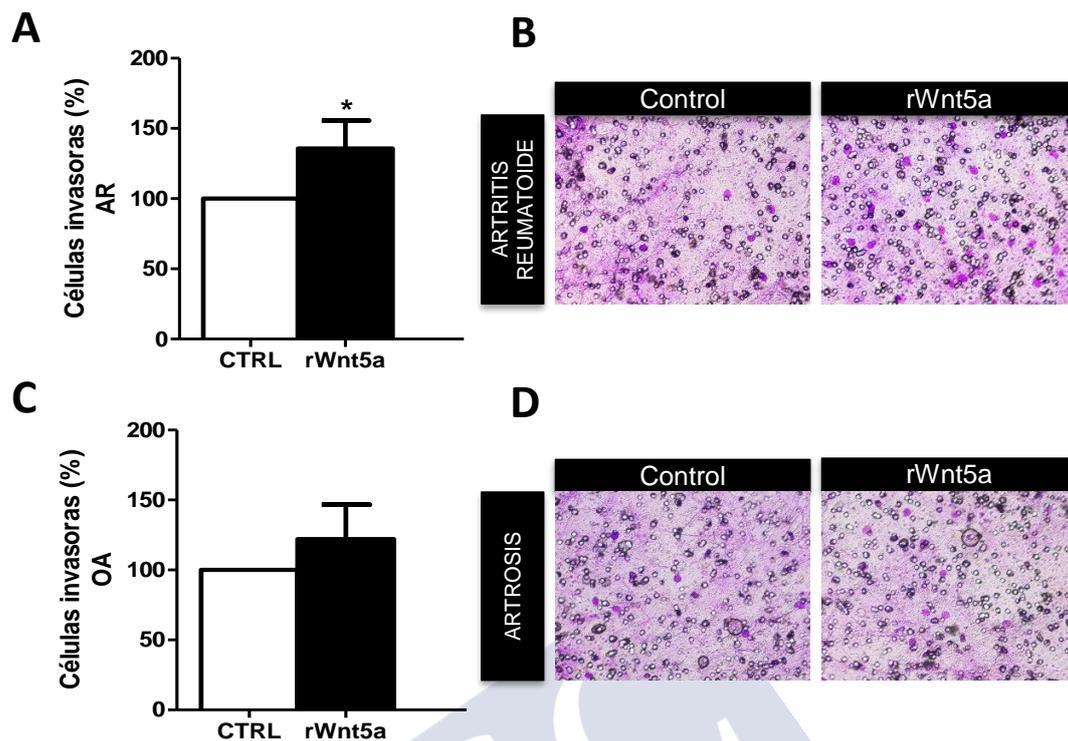
En primer lugar, se analizó el efecto de Wnt5a recombinante (rWnt5a) en la migración de los sinoviocitos utilizando un ensayo de “cierre de herida”, explicado anteriormente en el apartado de material y métodos. Así, FLS de 8 pacientes con AR y 5 pacientes con OA se cultivaron en insertos de Ibidi donde fueron estimulados o no con 400 ng/mL de rWnt5a durante 96 horas. Después se evaluó su capacidad de migración cuantificando el área central ocupada por las células mediante el programa Image J. Como se puede observar en la Figura 17A-B, el

tratamiento con rWnt5a incrementó la capacidad de migración de los sinoviocitos reumatoides que fue un 48% superior a la observada en el grupo control no tratado. Sin embargo, este efecto no se observó en sinoviocitos de artrosis, puesto que su capacidad de migración fue similar en los tratados con rWnt5a que en los controles sin tratamiento (Figura 17C-D).



**Figura 17. El tratamiento con rWnt5a aumentó la capacidad de migración de los sinoviocitos reumatoides.** **A, C)** Representación gráfica del porcentaje de migración de sinoviocitos de pacientes con AR (**A**) y pacientes con OA (**C**) tras 96h de tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a con respecto al control no tratado en cada caso, que se consideró el 100%. **B, D)** Imágenes representativas del ensayo de migración a las 0 y 96h en sinoviocitos reumatoides (**B**) y en sinoviocitos de pacientes con OA (**D**). Los valores representan la media  $\pm$  ESM de sinoviocitos de 8 pacientes con AR y 5 pacientes con OA. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon).

A continuación, se analizó si rWnt5a podría incrementar también la invasividad de los sinoviocitos reumatoides. Para ello, las células procedentes de 6 pacientes con AR y 5 pacientes con OA se cultivaron en insertos transmembrana Millicell recubiertos de matrigel, como simulador de matriz extracelular, durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, las células invasoras se tiñeron con Giemsa y se contaron mediante el software Image J. El tratamiento con rWnt5a incrementó significativamente la capacidad invasiva de los sinoviocitos reumatoides. En concreto, la invasión fue un 35,7% superior a la observada en el grupo control (Figura 18A-B). Sin embargo, el tratamiento con rWnt5a no aumentó la capacidad de invasión de los FLS de artrosis (Figura 18C-D).

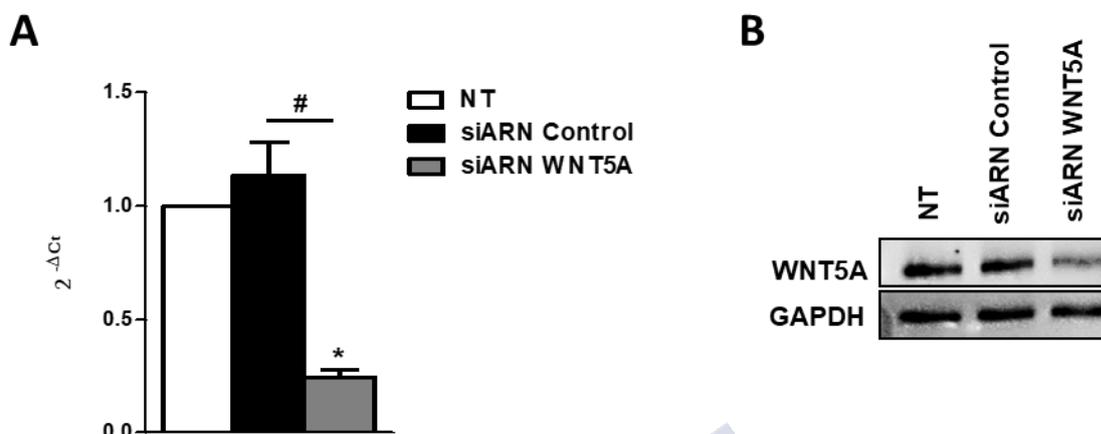


**Figura 18.** La capacidad de invasión de los sinoviocitos reumatoides aumentó tras el tratamiento con rWnt5a. **A, C)** Representación gráfica del porcentaje de células invasoras de pacientes con AR (**A**) y pacientes con OA (**C**) a las 48h tras el tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a con respecto al grupo control no tratado en cada caso, que se consideró el 100%. **B, D)** Imágenes representativas del ensayo de invasión a 48h del grupo control no tratado y tras el tratamiento con rWnt5a en sinoviocitos de pacientes con AR (**B**) y pacientes con OA (**D**). Los valores representan la media  $\pm$  ESM de sinoviocitos de 6 pacientes con AR y 5 pacientes con OA. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon).

### 1.3. LA SUPRESIÓN DE WNT5A DISMINUYE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN E INVASIÓN DE LOS SINOVIOCITOS REUMATOIDES

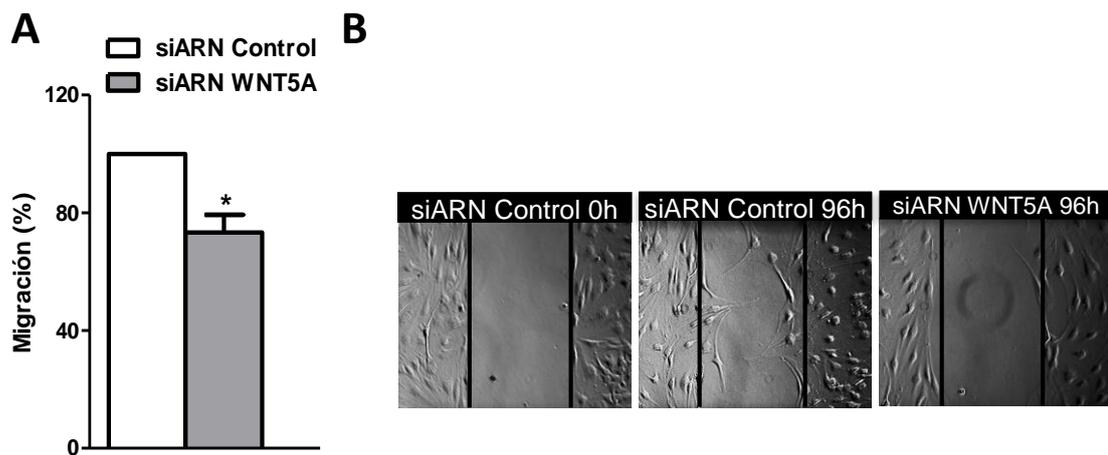
Puesto que el tratamiento con rWnt5a incrementó la capacidad de migración e invasión de los sinoviocitos reumatoides, decidimos estudiar si la expresión endógena de *WNT5A* modula estas capacidades. Para ello, *WNT5A* se silenció en sinoviocitos de 6 pacientes con AR para someterlos posteriormente a ensayos de migración e invasión. El silenciamiento del gen *WNT5A* se realizó mediante transfección de 50  $\mu$ M de siARN específico o siARN control. La eficacia del silenciamiento se analizó determinando la expresión del ARNm y de la proteína de *WNT5A* mediante PCR en tiempo real y Western blot, respectivamente (Figura 19). Los

resultados mostraron que la transfección de FLS con siRNA de *WNT5A* redujo más del 76% la transcripción del gen en comparación con el siARN Control y el NT (Figura 19).

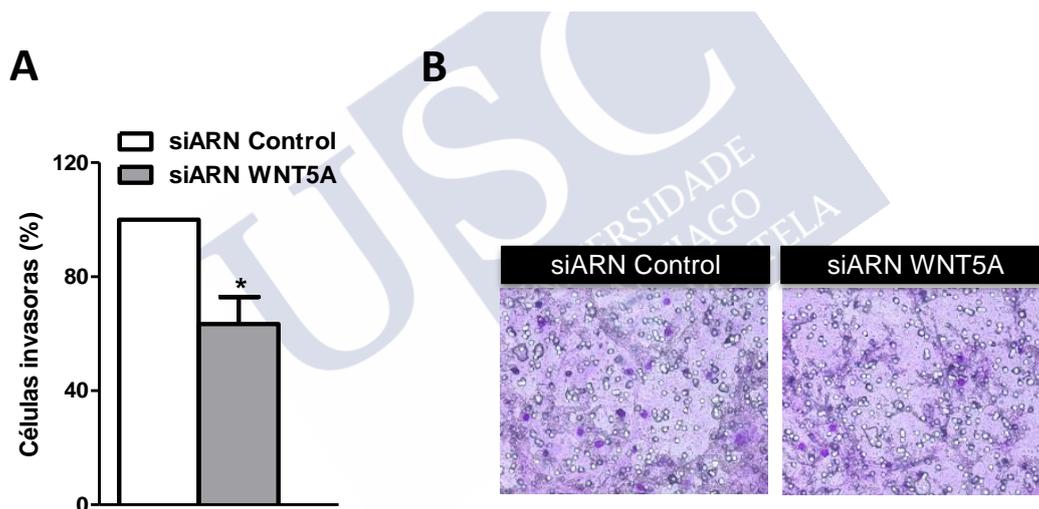


**Figura 19. Análisis de la eficacia del silenciamiento de *WNT5A*.** A) La expresión del ARNm para *WNT5A* con respecto a la  $\beta$ -*ACTINA* ( $2^{-\Delta C_t}$ ) se determinó mediante qPCR. Los datos se muestran en relación a los valores obtenidos en el grupo no transfectado. B) La expresión de la proteína *WNT5A* se determinó mediante WB utilizando la expresión de *GAPDH* como control de carga. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 6 pacientes con AR. \* y # indican  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). NT = no transfectado.

Una vez suprimida la expresión endógena de *WNT5A* en los FLS, estos fueron sometidos a ensayos de migración e invasión. Los sinoviocitos reumatoides transfectados con 50  $\mu$ M de siARN *WNT5A* mostraron menor capacidad de migración e invasión. En efecto, el silenciamiento de *WNT5A* redujo la capacidad de migración de los sinoviocitos reumatoides en un 30% (Figura 20) y alrededor del 37% la capacidad de invasión (Figura 21), cuando se comparó con el grupo siARN control. Estos datos confirman el papel promotor de *WNT5A* en la migración e invasión de los sinoviocitos reumatoides.



**Figura 20. La supresión endógena de WNT5A disminuye la capacidad de migración de los FLS.** **A)** Representación gráfica del porcentaje de migración a las 96h tras el silenciamiento de WNT5A con respecto al grupo transfectado con siARN control, que se consideró el 100%. **B)** Imágenes representativas del ensayo de migración a las 0 y 96h. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 6 pacientes con AR. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon).

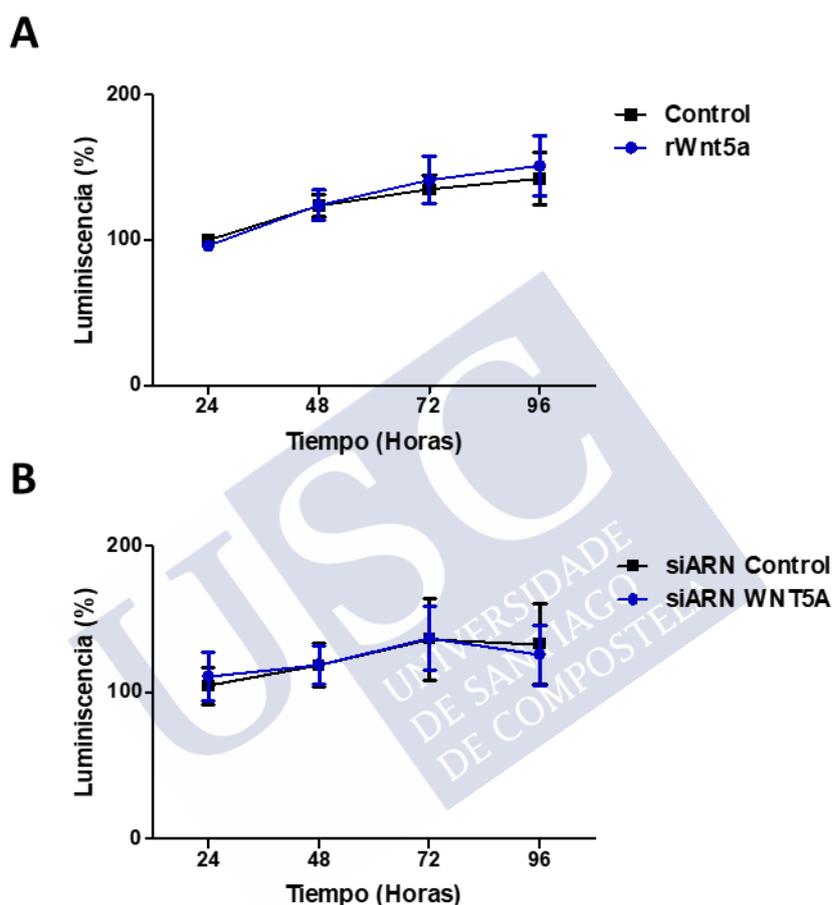


**Figura 21. La supresión endógena de WNT5A disminuye la capacidad de invasión de los FLS reumatoides.** **A)** Representación gráfica del porcentaje de las células invasoras a las 48h tras el silenciamiento de WNT5A. El grupo tratado con siARN control se consideró el 100%. **B)** Imágenes representativas del ensayo de invasión a las 48h. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 6 pacientes con AR. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon).

#### 1.4. WNT5A NO MODULA LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN DE LOS SINOVICITOS REUMATOIDES

Distintos trabajos en células de cáncer han descrito el papel inductor de WNT5A sobre la proliferación celular.<sup>191,192</sup> Por otro lado, como ya se ha comentado anteriormente, la desregulación de los mecanismos de proliferación y apoptosis en los sinoviocitos reumatoides

desencadena hiperplasia sinovial, que contribuye al fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides. Por ello, se analizó el efecto del tratamiento con rWnt5a, así como de la supresión endógena de *WNT5A*, sobre la proliferación de los FLS a las 24, 48, 72 y 96h. Los resultados mostraron que ni el tratamiento con rWnt5a ni la ausencia de *WNT5A* modificaron la proliferación de los FLS en comparación con sus respectivos controles (Figura 22).



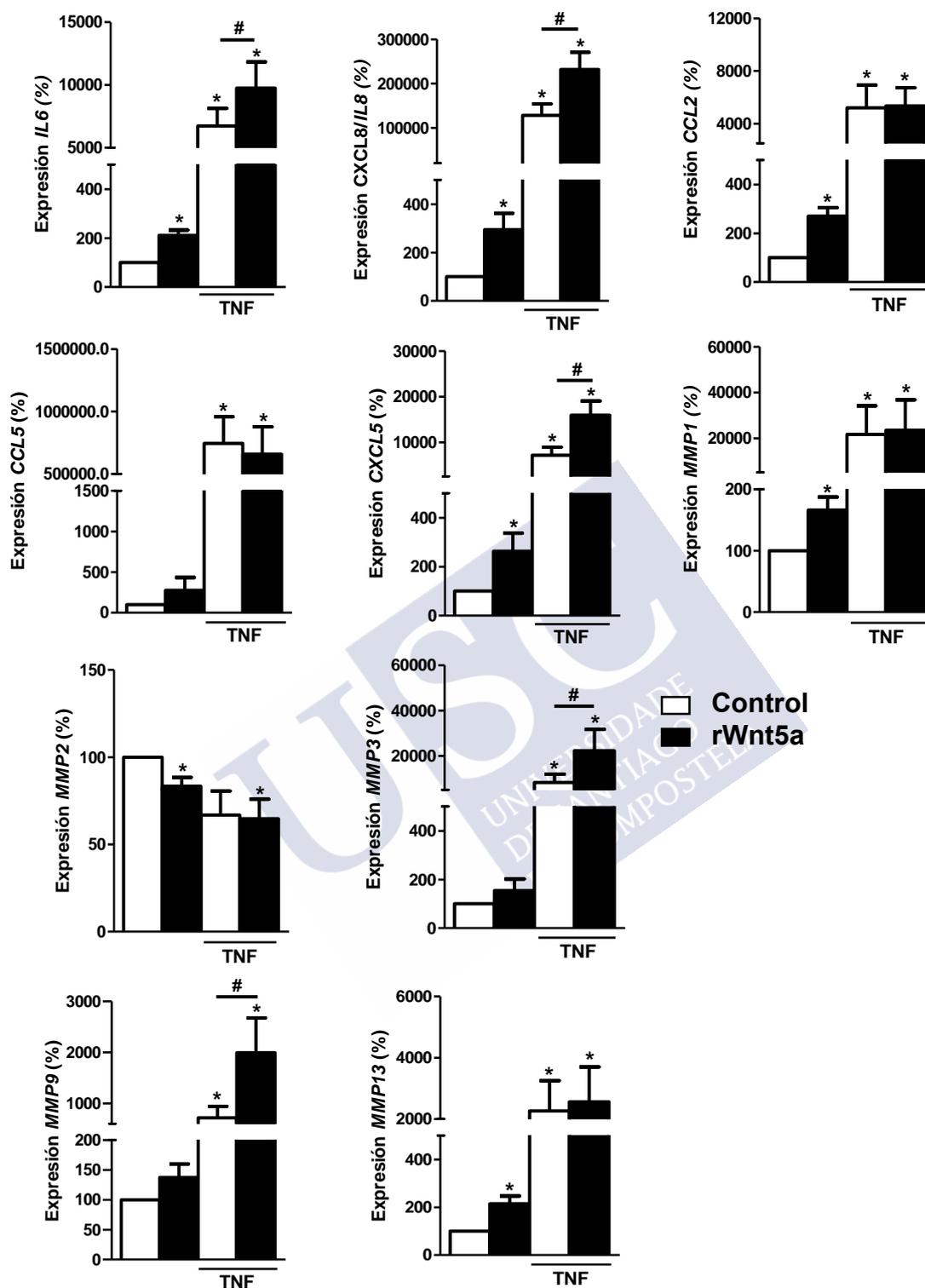
**Figura 22. WNT5A no modula la proliferación de los sinoviocitos reumatoides.** Representación gráfica de la proliferación de sinoviocitos reumatoides tratados con 400 ng/mL de rWnt5a (A) y transfectados con siARN Control o WNT5A (B) determinada mediante luminiscencia. La luminiscencia obtenida para el control y el siARN Control a las 24h fue considerada el 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 4-5 pacientes con AR.

### 1.5. WNT5A INDUCE LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Y METALOPROTEASAS EN LOS SINOVIOCITOS DE PACIENTES CON AR

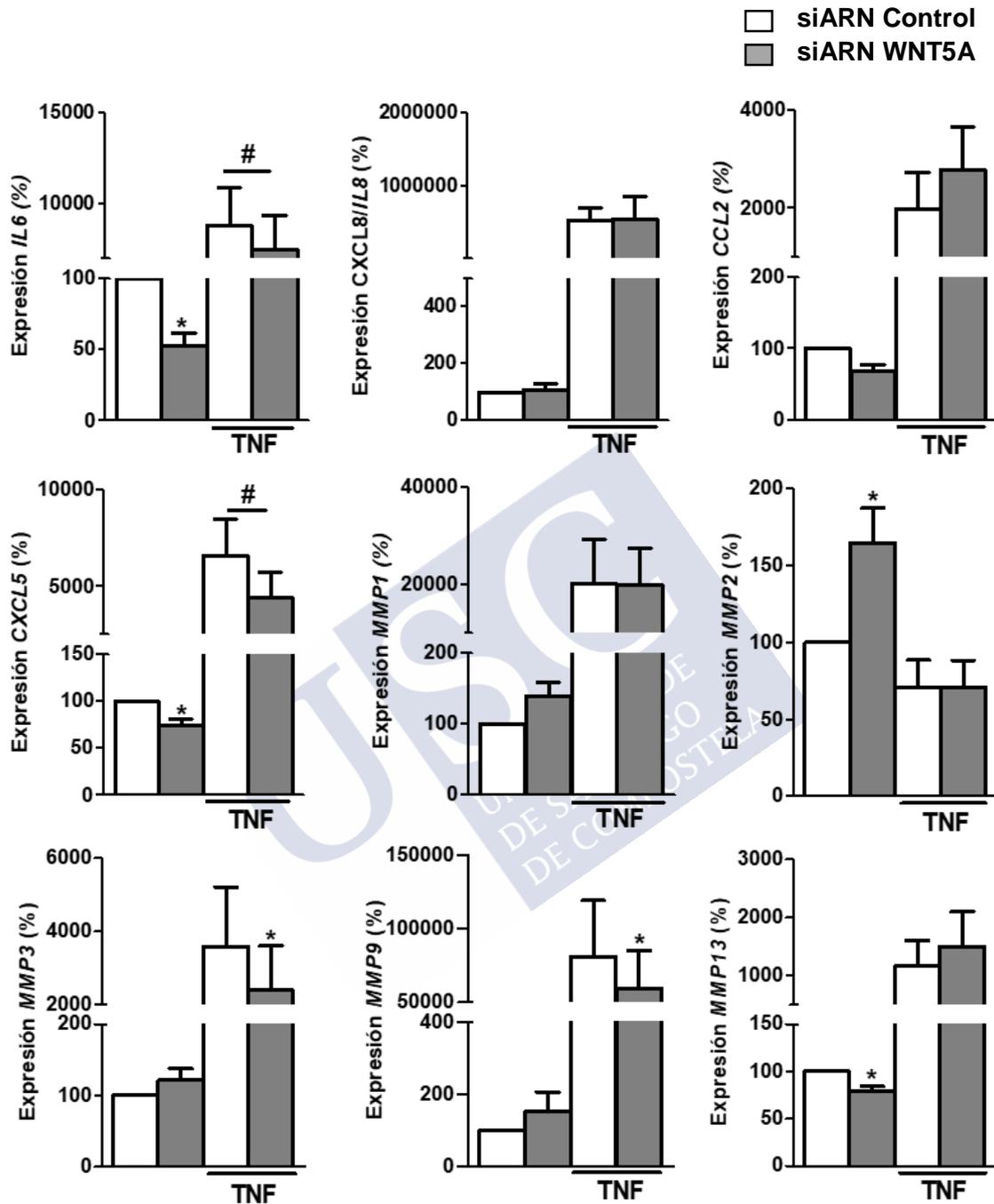
Además de los efectos de WNT5A sobre migración e invasión celular, distintos estudios han implicado la vía no canónica de WNT5A en la respuesta inflamatoria de distintos tipos celulares, como células endoteliales, microglia y macrófagos.<sup>179,180,193,194</sup> Por lo tanto, se

investigó el papel de WNT5A en la respuesta inflamatoria espontánea e inducida por TNF en sinoviocitos reumatoides. Para ello, se analizó la expresión de ARNm de varias citoquinas, quimioquinas y metaloproteasas en sinoviocitos de 7 pacientes con artritis reumatoide, tras 24 horas de tratamiento con rWnt5a (400 ng/mL), TNF (10 ng/mL) o tratamiento combinado. Como se muestra en la Figura 23, el tratamiento con rWnt5a aumentó significativamente la expresión de *IL6*, *CXCL8/IL8*, *CCL2*, *CXCL5*, *MMP1* y *MMP13* en comparación con el control no tratado, aunque los niveles fueron inferiores a los alcanzados tras la estimulación con TNF. Aun así, la adición de rWnt5a al tratamiento con TNF incrementó la expresión de *IL6*, *CXCL8/IL8* y *CXCL5* en comparación con la expresión inducida solo por TNF. Además, rWnt5a potenció la inducción mediada por TNF de la expresión de *MMP3* y *MMP9* en 2,3 y 2,7 veces, respectivamente, aunque no estimuló significativamente su expresión basal. Sin embargo, el tratamiento con rWnt5a, TNF o ambos redujo significativamente la expresión de *MMP2*. Por el contrario, el tratamiento con rWnt5a no alteró la expresión basal de la quimioquina *CCL5* ni modificó su inducción mediada por TNF (Figura 23).

Por otro lado, analizamos si la supresión de *WNT5A* endógeno modula la expresión de los mediadores inflamatorios y metaloproteasas que fueron inducidos por rWnt5a. Como se observa en la Figura 24, la supresión de *WNT5A* redujo la expresión basal de *IL6*, *CXCL5* y *MMP13*, y aumentó la expresión de la *MMP2*. Además, la supresión de *WNT5A* redujo la expresión inducida por TNF de *IL6*, *CXCL5*, *MMP3* y *MMP9* (Figura 24). Por lo tanto, el conjunto de estos datos identifica a *WNT5A* como inductor de mediadores inflamatorios y de metaloproteasas en FLS de pacientes con AR.



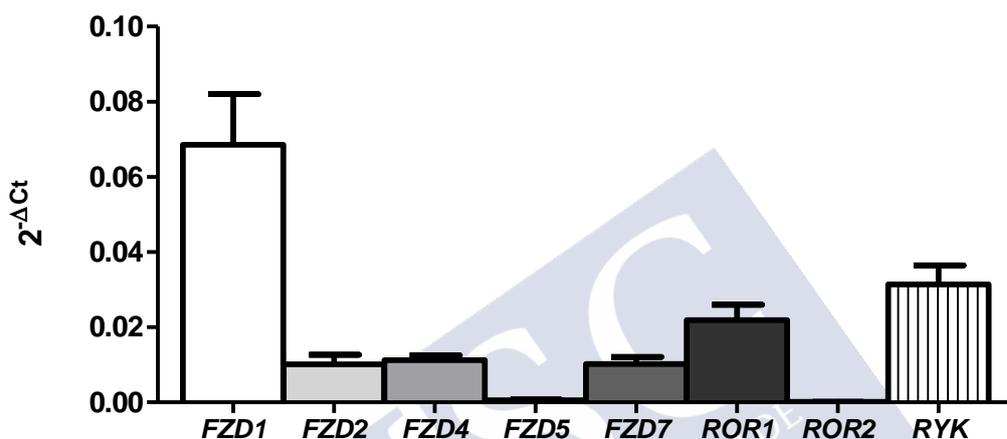
**Figura 23. Efecto de rWnt5a sobre la expresión de mediadores inflamatorios y metaloproteasas en sinoviocitos reumatoides.** Niveles de expresión de ARNm de mediadores inflamatorios y metaloproteasas, corregidos por la expresión de  $\beta$ -ACTINA en sinoviocitos reumatoides tras el tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a, solo o en combinación con 10 ng/mL de TNF. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 7 pacientes con AR con respecto al control no tratado, considerado el 100%. \* y # indican  $p < 0,05$  (test Wilcoxon).



**Figura 24. Efecto del silenciamiento de WNT5A sobre la expresión de mediadores inflamatorios y metaloproteasas en sinoviocitos reumatoides.** Niveles de expresión de ARNm de mediadores inflamatorios y metaloproteasas, corregidos por la expresión de  $\beta$ -ACTINA en sinoviocitos reumatoides tras el silenciamiento de WNT5A, en situación basal o tras estimulación con 10 ng/mL de TNF. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 4-7 pacientes con AR, con respecto al grupo transfectado con siARN control, que se consideró el 100%. \* y # indican  $p < 0,05$  (test Wilcoxon).

## 1.6. LA SEÑALIZACIÓN DE WNT5A EN LOS SINOVIOCIDOS REUMATOIDES DEPENDE DEL RECEPTOR RYK

Con el fin de explorar los mecanismos moleculares responsables de los efectos de WNT5A observados en sinoviocitos reumatoides, primero analizamos la expresión de ARNm de los receptores de WNT5A en FLS de 7 pacientes con AR mediante PCR en tiempo real (Figura 25).



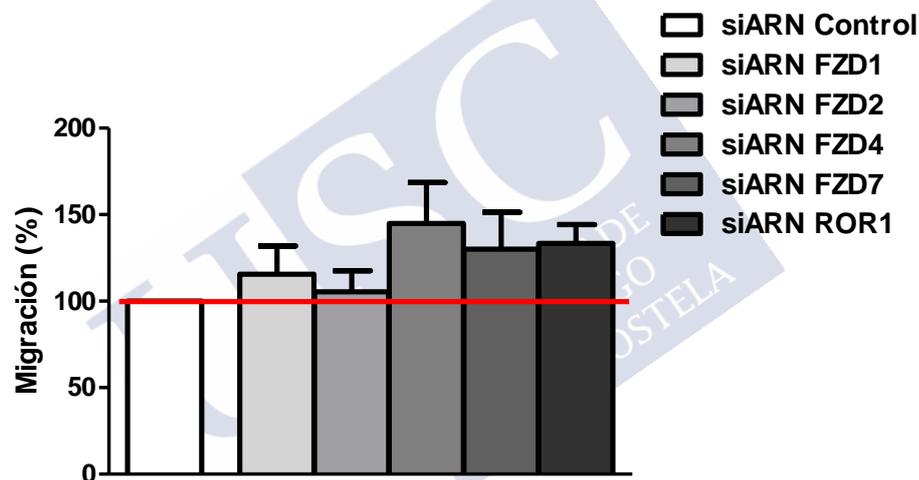
**Figura 25. Expresión de los receptores de WNT5A en sinoviocitos reumatoides.** Niveles de ARNm de los receptores *FZD1*, *FZD2*, *FZD4*, *FZD5*, *FZD7*, *ROR1*, *ROR2* y *RYK* corregidos por la expresión de la  $\beta$ -*ACTINA*, analizados mediante PCR en tiempo real, en 7 pacientes con AR.

Los resultados de la qPCR mostraron que seis de los ocho receptores de la vía no canónica de WNT5A se expresaron en los sinoviocitos reumatoides. El receptor con mayor expresión fue FZD1, seguido por RYK, y en un nivel inferior por ROR1, FZD2, FZD4 y FZD7. La expresión de los receptores ROR2 y FZD5 fue mucho más débil. Entonces, se decidió no seguir investigando el papel de FZD5 como receptor en la vía de señalización de WNT5A en los FLS de AR dadas las dificultades para lograr un silenciamiento adecuado debido a su baja expresión y la imposibilidad de obtener un anticuerpo bloqueante específico anti-FZD5. Sin embargo, se decidió continuar con la investigación del papel del receptor ROR2 dado que existe un anticuerpo bloqueante anti-ROR2 y puesto que trabajos previos han involucrado este receptor en la proliferación, migración e invasión de células cancerosas.<sup>195-197</sup>

Para identificar los receptores implicados en la señalización de WNT5A en los sinoviocitos reumatoides, se analizó el efecto de su silenciamiento en la migración inducida por rWnt5a. Así, se transfectaron FLS de 6 a 8 pacientes con 50  $\mu$ M de siARN para FZD1, FZD2, FZD4,

FZD7, ROR1, ROR2, RYK, o siARN Control. A las 24 horas de la transfección se realizó un ensayo de migración tras la estimulación de las células con 400 ng/mL de rWnt5a. La eficacia del silenciamiento se determinó mediante el análisis de la expresión del ARNm para los distintos receptores por PCR en tiempo real. Se obtuvo un silenciamiento eficiente superior al 80% en prácticamente todos los receptores, excepto para ROR2 y para RYK. La supresión alcanzó el 70% en el caso de *RYK* y sólo el 40% en el caso de *ROR2*.

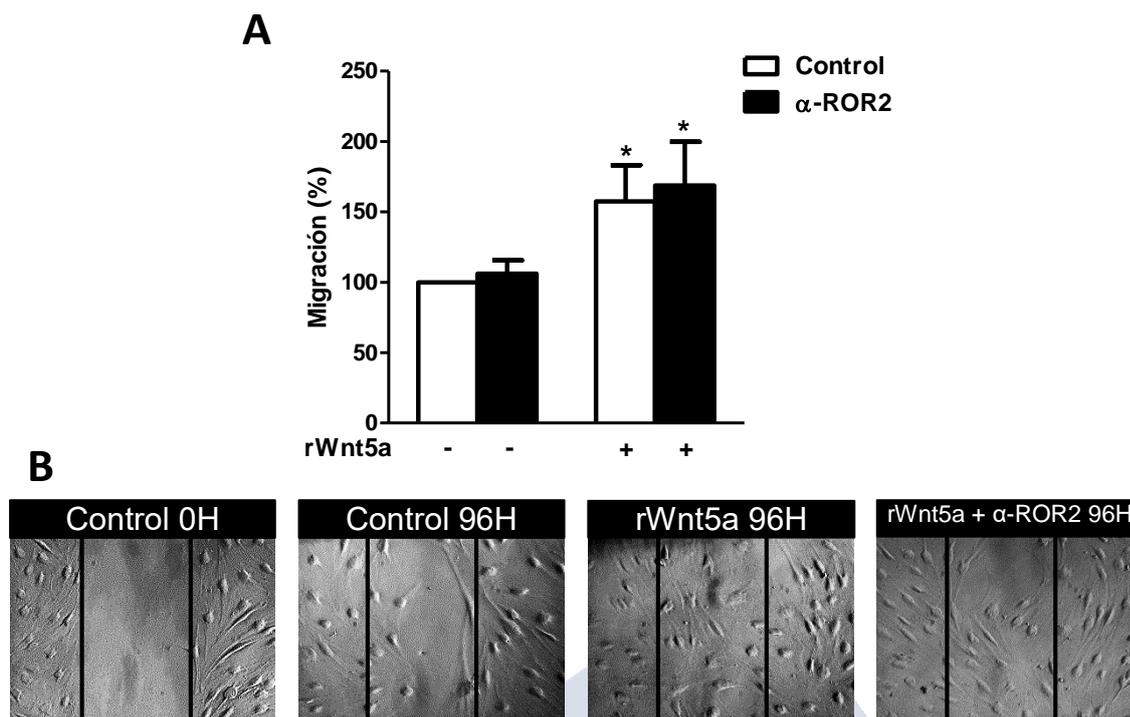
La migración de los sinoviocitos reumatoides inducida por rWnt5a no se modificó por el silenciamiento de los receptores FZD1, FZD2, FZD4, FZD7 y ROR1, ya que tras el ensayo de migración el porcentaje de migración fue similar en las células transfectadas con siARN frente a estos genes que en células transfectadas con siARN Control (Figura 26).



**Figura 26. Efectos del silenciamiento de receptores de WNT5A en la migración inducida por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides.** Representación gráfica del porcentaje de migración a las 96h tras el tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a después de la supresión de *FZD1*, *FZD2*, *FZD4*, *FZD7* o *ROR1*. La capacidad de migración del siARN Control estimulado por rWnt5a se consideró el 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 6-8 pacientes con AR.

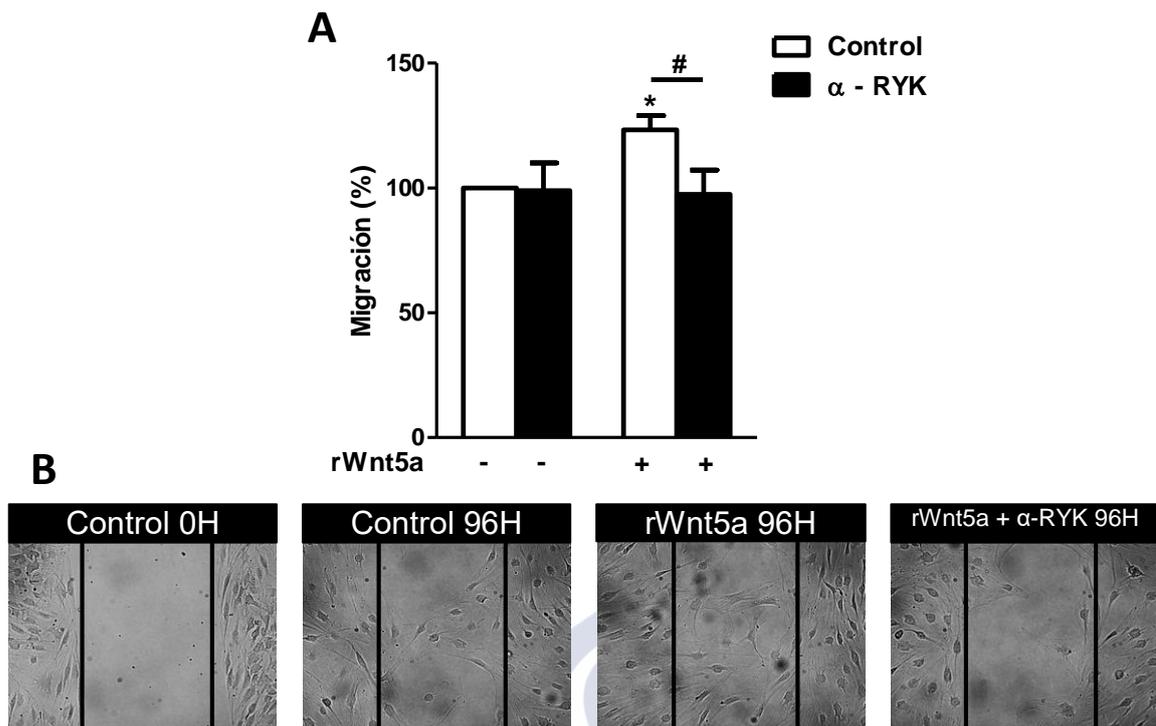
Por lo tanto, centramos el estudio en los dos receptores para los que no se consiguió un silenciamiento eficiente, ROR2 y RYK. Para ello, se utilizaron anticuerpos anti-ROR2 y anti-RYK, bloqueando así su función en los sinoviocitos reumatoides.

Sinoviocitos de 7 pacientes se trataron con 4  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti-ROR2 ( $\alpha$ -ROR2) y 1 hora después con 400 ng/mL de rWnt5a y sometidos, posteriormente, al ensayo de migración. A las 96 horas, el porcentaje de migración basal o la inducida por rWnt5a fue similar en sinoviocitos tratados o no con el anticuerpo anti-ROR2 (Figura 27).



**Figura 27. Efecto del anticuerpo anti-ROR2 sobre la migración inducida por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides.** **A)** Representación gráfica del porcentaje de migración basal e inducida tras 96 h de tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a en sinoviocitos tratados o no con 4  $\mu$ g/mL de  $\alpha$ -ROR2 en comparación con el control en situación basal, que fue considerado el 100%. **B)** Imágenes representativas del ensayo de migración a 0 y 96h tras los distintos tratamientos. Los valores representan la media  $\pm$  ESM de FLS de 7 pacientes con AR. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon).  $\alpha$ -ROR2: anti-ROR2.

Posteriormente, se analizó el efecto del anticuerpo anti-RYK ( $\alpha$ -RYK) sobre la migración de los sinoviocitos reumatoides. Para ello, FLS de 7 pacientes con AR fueron tratados con 1  $\mu$ g/mL de anticuerpo anti-RYK y 1 hora después se trataron con 400 ng/mL de rWnt5a y, a continuación, se sometieron al ensayo de migración. Como se observa en la Figura 28, el tratamiento con anticuerpo anti-RYK revirtió la migración inducida por rWnt5a.



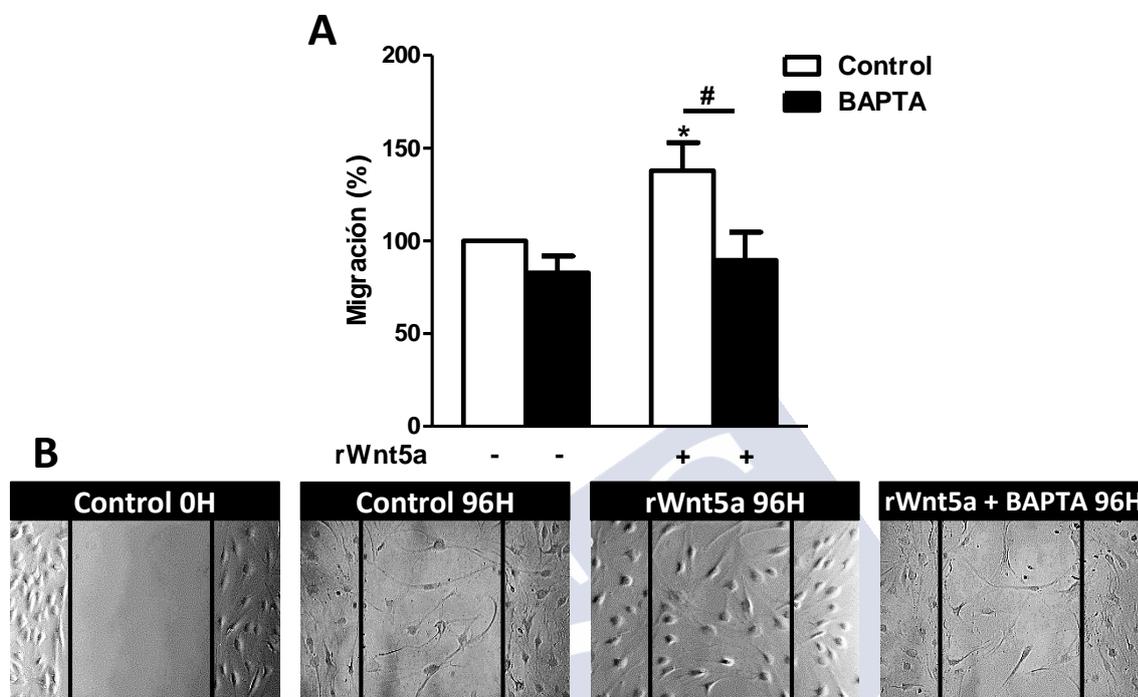
**Figura 28. El bloqueo del receptor RYK reduce la migración inducida por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides.** A) Representación gráfica del porcentaje de la migración basal e inducida tras 96 h de tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a en FLS tratados o no con 1 µg/mL de anticuerpo anti-RYK. El grupo control en situación basal fue considerado el 100%. B) Imágenes representativas del ensayo de migración a 0 y 96h tras los distintos tratamientos. Los valores se expresan como la media ± ESM de FLS de 7 pacientes con AR. \* y # indican  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). α-RYK: anti-RYK.

El conjunto de estos hallazgos muestra que WNT5A promueve la migración de los sinoviocitos reumatoides activando la señalización no canónica de WNT, a través de RYK.

### 1.7. WNT5A ESTIMULA LA MIGRACIÓN DE LOS SINOVIOCIOS REUMATOIDES A TRAVÉS DE LAS VÍAS WNT/Ca<sup>2+</sup> Y RHOA/ROCK

Para profundizar más en el estudio de la vía de señalización de WNT5A se examinó qué rama de la vía no canónica, WNT/Ca<sup>2+</sup> o WNT/PCP, se activa en los FLS reumatoides tras la estimulación con rWnt5a. En primer lugar, se analizó si el tratamiento con rWnt5a indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> en sinoviocitos reumatoides. Para ello, FLS de 7 pacientes fueron tratados con 10 µM del quelante selectivo del calcio, 1,2-bis (2 aminofenoxi) etano- N, N, N, N- ácido tetraacético (BAPTA) y 1 hora después se trataron con 400 ng/mL de rWnt5a y se sometieron a un ensayo de migración posteriormente. El tratamiento con BAPTA redujo significativamente la migración inducida con rWnt5a alcanzando los niveles del control en situación basal. El

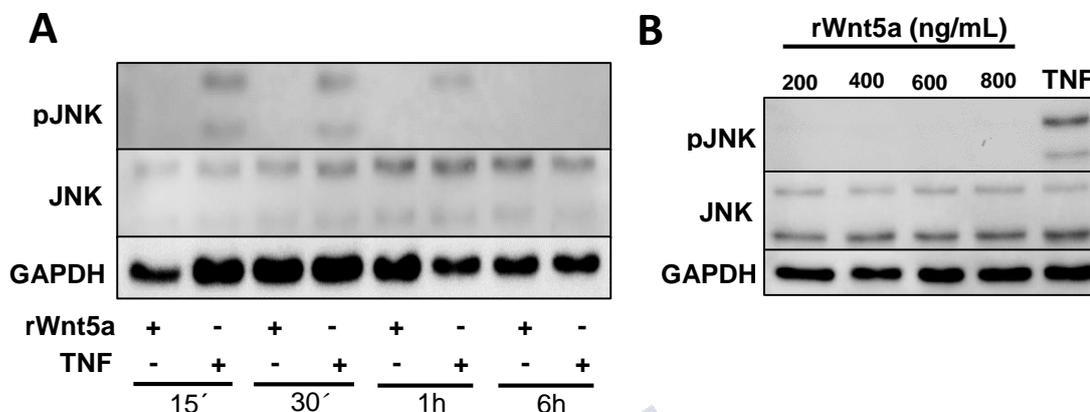
tratamiento con BAPTA también redujo la migración espontánea, aunque no se alcanzó la significación estadística (Figura 29). Por lo tanto, estos datos indican que la vía WNT/Ca<sup>2+</sup> puede contribuir a la migración inducida por rWnt5a en FLS de AR.



**Figura 29. Papel de la vía WNT/Ca<sup>2+</sup> sobre la migración inducida por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides.** A) Representación gráfica del porcentaje de migración basal e inducida tras 96h de tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a en FLS tratados o no con 10  $\mu$ M de BAPTA. El grupo control en situación basal se consideró el 100%. B) Imágenes representativas del ensayo de migración a las 0 y 96h tras los distintos tratamientos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 7 pacientes con AR. \* y # indican  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). BAPTA: 1,2-bis (2 aminofenoxi) etano- N, N, N, N- ácido tetraacético.

Por otro lado, la vía de señalización WNT/PCP puede conducir a la activación de RhoA/ROCK o a la activación de JNK. En primer lugar, se analizó la activación de JNK tras el tratamiento con rWnt5a en sinoviocitos reumatoides. Para ello, FLS de 4 pacientes con AR se trataron con 400 ng/mL de rWnt5a durante 15, 30, 60 minutos y 6 horas. A continuación, mediante Western blot se detectó la fosforilación de la proteína JNK. Como control positivo, se utilizaron FLS reumatoides tratados con 10 ng/mL de TNF a los mismos tiempos. Como se puede observar en la figura 30A, no se observó fosforilación de JNK en los FLS estimulados con rWnt5a, mientras que la estimulación con TNF indujo la activación de JNK a los 15, 30 y 60 minutos de tratamiento. Además, se analizó el efecto del tratamiento con distintas dosis de rWnt5a (de 200 a 800 ng/mL) durante 1 hora en la activación de JNK. Como se observa en la Figura 30B,

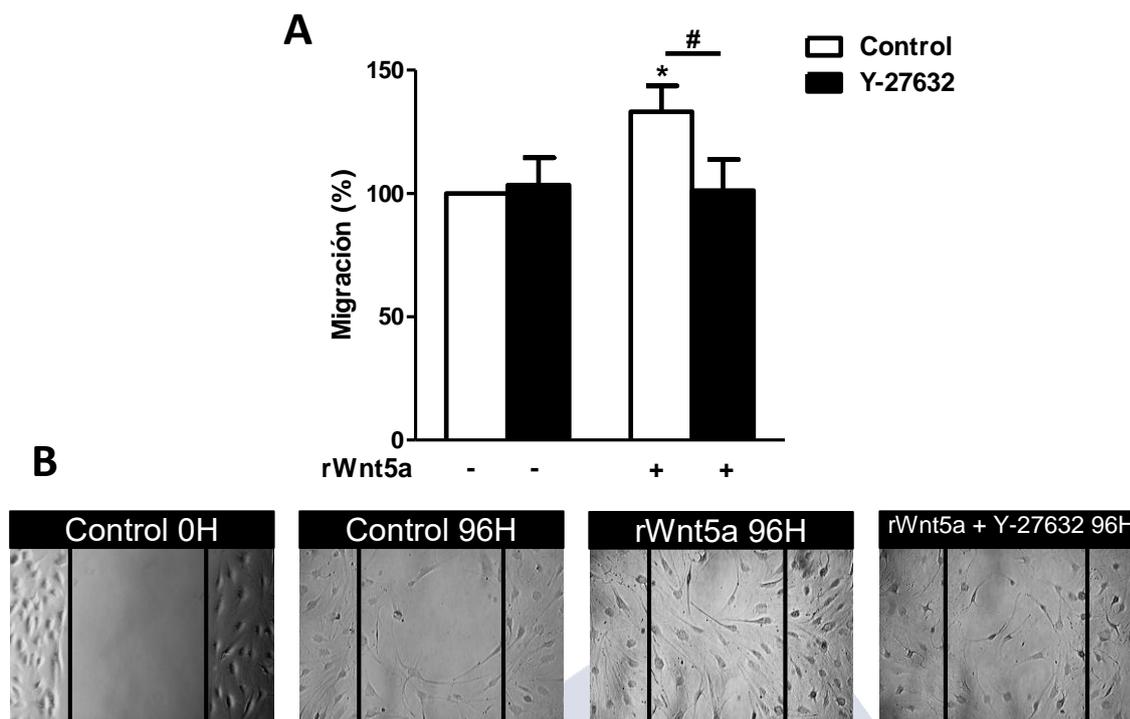
rWnt5a no activó JNK con ninguna de las dosis utilizadas. Sin embargo, el tratamiento con 10 ng/mL de TNF indujo la fosforilación de JNK.



**Figura 30. El tratamiento con rWnt5a no induce activación de JNK en sinoviocitos reumatoides.** **A)** Western blot representativo del análisis temporal de los cambios en la fosforilación de JNK tras el tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a en comparación con 10 ng/mL de TNF, en FLS de 4 pacientes con AR. **B)** Imagen representativa del estado de activación de JNK en FLS de 4 pacientes con AR tratados con distintas dosis (200, 400, 600 y 800 ng/mL) de rWnt5a durante 1 hora en comparación con 10 ng/mL de TNF. pJNK: JNK fosforilado.

Con el fin de analizar si rWnt5a activa la rama RhoA/ROCK de la vía PCP se utilizó el inhibidor específico de ROCK, Y-27632. Así, los FLS fueron tratados con 20  $\mu$ M de Y-27632, 1 hora después se trataron con 400 ng/mL de rWnt5a y se realizó un ensayo de migración. Los resultados mostraron que la migración inducida por rWnt5a se redujo significativamente en presencia de Y-27632, ya que el porcentaje de migración fue similar al observado en ausencia de estimulación con rWnt5a. Además, Y-27632 no modificó la migración espontánea de los FLS (Figura 31).

El conjunto de estos datos indica que WNT5A induce la migración de los sinoviocitos reumatoides mediante la activación de la vía WNT/Ca<sup>2+</sup> y la rama RhoA/ROCK de la vía WNT/PCP.



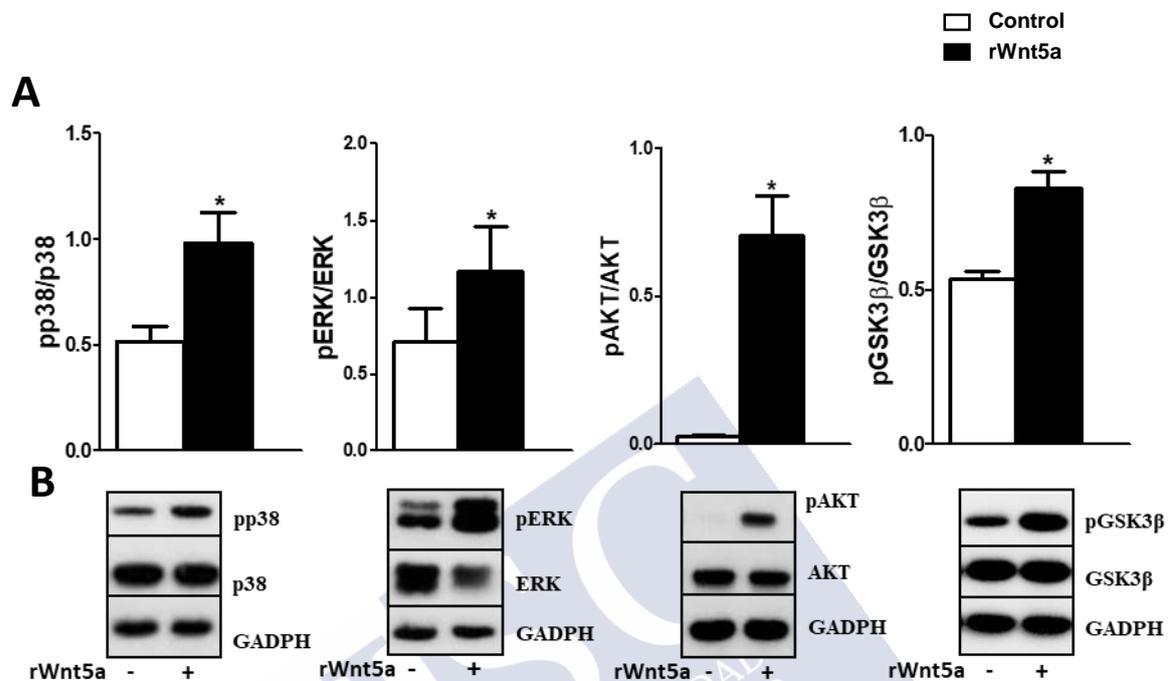
**Figura 31. La inhibición de ROCK reduce la migración inducida por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides.** A) Representación gráfica del porcentaje de migración basal e inducida tras 96h de tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a en sinoviocitos reumatoides tratados o no con 20  $\mu$ M de Y-27632. El grupo control en situación basal se consideró el 100%. B) Imágenes representativas del ensayo de migración a 0 y 96h tras los distintos tratamientos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 8 pacientes con AR. \* y # indican  $p < 0,05$  (Wilcoxon de datos pareados). Y-27632: inhibidor de ROCK.

### 1.8. WNT5A ACTIVA LAS VIAS p38 Y ERK MAPK Y PI3K/AKT EN SINOVIOCITOS REUMATOIDES

Se ha descrito que las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT están implicadas en la migración de los FLS de pacientes con artritis reumatoide<sup>198,199</sup> y en otros tipos de células.<sup>200</sup> Por lo tanto, se decidió analizar el efecto de WNT5A en la activación de estas vías. Para ello, se analizó la fosforilación de las quinasas p38, ERK, AKT y el sustrato de AKT, GSK3 $\beta$  mediante Western blot en FLS de 6 pacientes con AR después de la estimulación con 400 ng/mL de rWnt5a durante 1 hora.

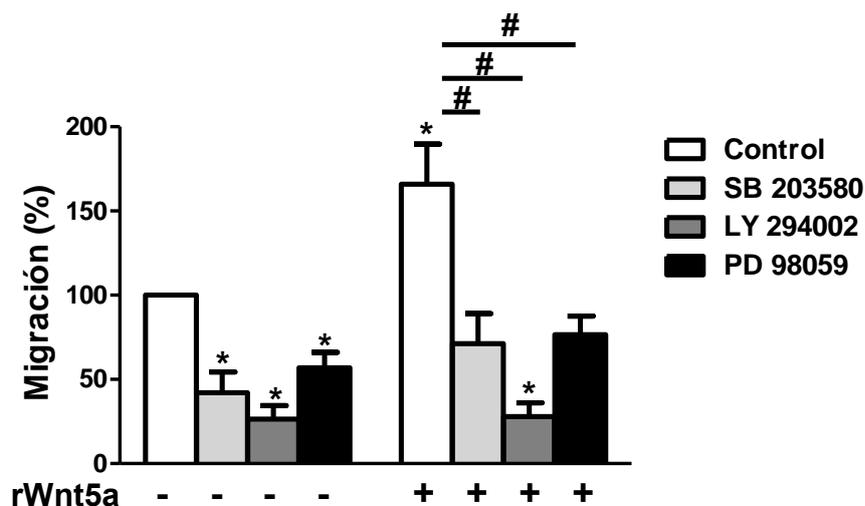
Los resultados mostraron evidencias de la activación de las MAPK quinasas y AKT (Figura 32). Se observaron niveles más elevados de fosfo-p38 (pp38), fosfo-ERK (pERK), fosfo-AKT (pAKT) y fosfo-GSK3 $\beta$  (pGSK3 $\beta$ ) en los FLS estimulados con rWnt5a que en los FLS sin tratar (Figura 32). La diferencia más notable se observó en la quinasa AKT, cuya forma

fosforilada se incrementó 35 veces en comparación con el control no estimulado. Le siguió p38, que aumentó 1,9 veces su forma fosforilada tras el tratamiento. Y, por último, ERK y GSK3β cuyas variantes fosforiladas aumentaron respecto al control, 1,6 y 1,5 veces, respectivamente.



**Figura 32. Efecto del tratamiento con rWnt5a en la fosforilación de p38, ERK, AKT y GSK3β en sinoviocitos reumatoides.** **A)** Representación gráfica de la fosforilación de las MAPKS p38 y ERK, así como de AKT y GSK3β en FLS tratados con 400 ng/mL de rWnt5a durante 1 h en comparación con el control no tratado. **B)** Imágenes representativas del Western blot de las 4 quinasas estudiadas. Los valores representan la media ± ESM de FLS de 6 pacientes con AR. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). pp38: p38 fosforilado; pERK: ERK fosforilado; pAKT: AKT fosforilado; pGSK3β: GSK3β fosforilado.

A continuación, se estudió el efecto de la inhibición de estas dos vías sobre la migración de los sinoviocitos reumatoides. Para ello, FLS de 7 pacientes con AR se trataron con inhibidores específicos de las MAPKS p38 (SB 203580) y ERK (PD 98059) o PI3K (LY 294002) durante 1 hora y luego se estimularon o no con 400 ng/mL de rWnt5a antes de medir la migración mediante el ensayo de cierre de herida. Los tres inhibidores redujeron significativamente la migración de los FLS de AR, tanto en condiciones basales como después de la inducción con rWnt5a, lo que confirma la participación de las dos vías de quinasas (Figura 33).



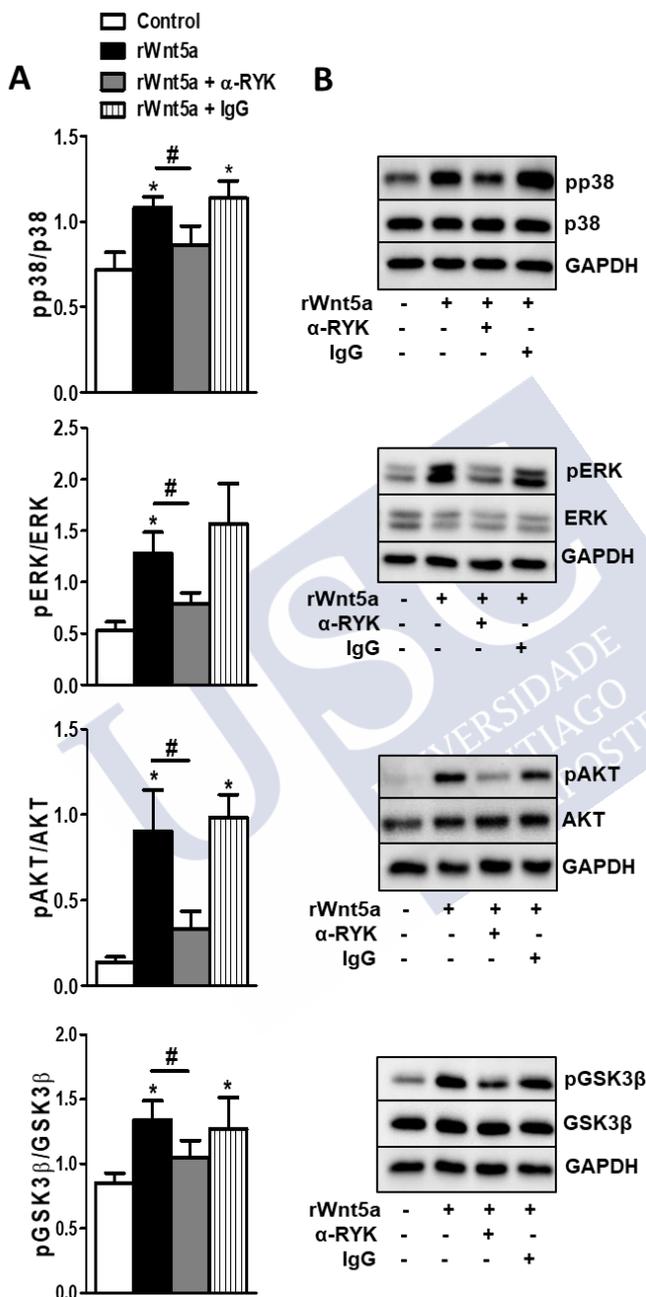
**Figura 33.** Los inhibidores de las MAPKs p38 y ERK, así como el inhibidor de PI3K reduce la migración basal y la inducida por rWnt5a de los sinoviocitos reumatoides. Representación gráfica del porcentaje de migración basal e inducida tras 96h de tratamiento con 400 ng/mL de rWnt5a en FLS reumatoides tratados o no con 10  $\mu$ M del inhibidor de p38 (SB 203580), 10  $\mu$ M del inhibidor de PI3K (LY 294002) o 20  $\mu$ M del inhibidor de ERK (PD 98059). El grupo control en situación basal se consideró el 100%. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 7 pacientes con AR. \* y # indican  $p < 0,05$  (test Wilcoxon).

### 1.9. WNT5A ACTIVA LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MAPK Y PI3K/AKT A TRAVÉS DEL RECEPTOR RYK Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN ROCK

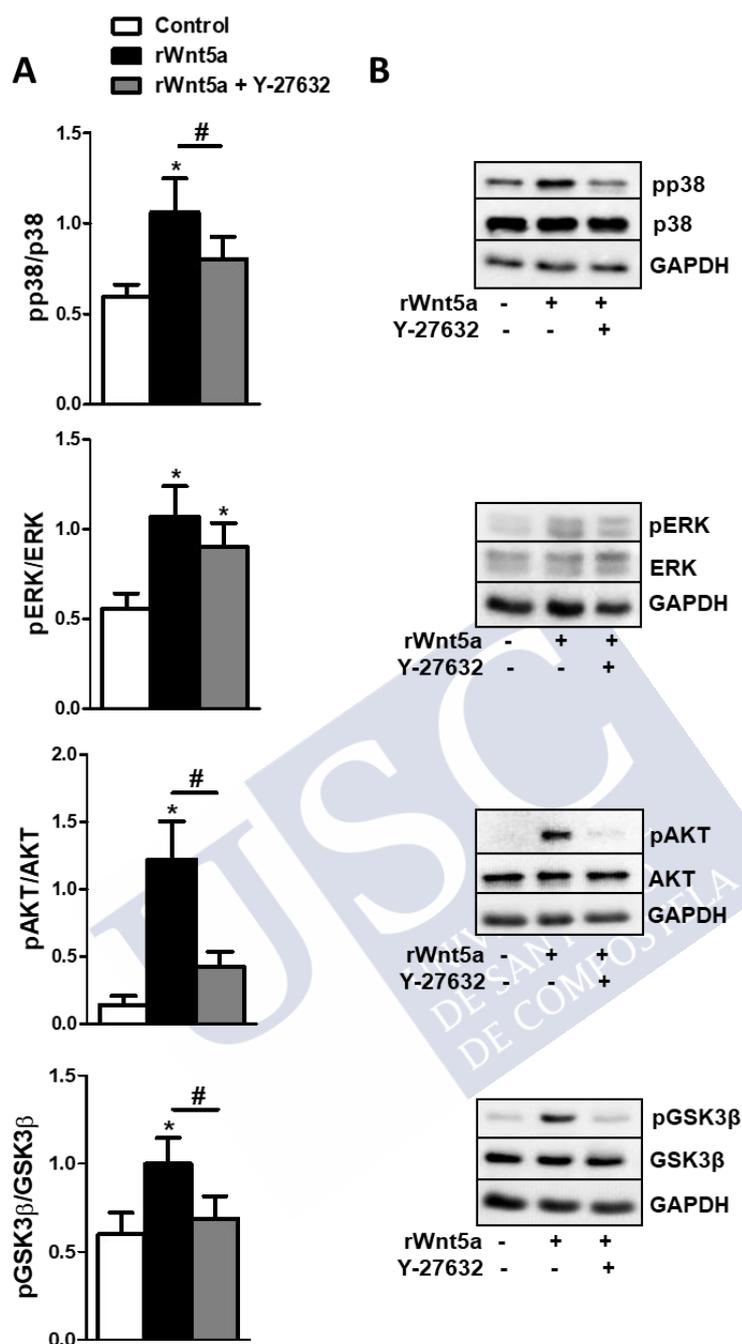
Dado que nuestros resultados indican que WNT5A promueve la migración de los sinoviocitos reumatoides a través del receptor RYK, se decidió analizar el efecto de la inhibición de este receptor sobre la fosforilación, inducida por rWnt5a, de las quinasas analizadas anteriormente. Con este fin, FLS de 6 a 8 pacientes con AR se trataron durante 1 hora con anti-RYK (1  $\mu$ g/mL) o con IgG isotipo control y se estimularon, posteriormente, 1 hora adicional con rWnt5a (400 ng/mL). Mediante Western blot se observó que el tratamiento con anti-RYK redujo significativamente la fosforilación inducida por rWnt5a de p38, ERK, AKT y GSK3 $\beta$ , mientras que el tratamiento con IgG control no modificó la fosforilación de estas proteínas (Figura 34).

Además, puesto que la migración inducida por rWnt5a en los sinoviocitos reumatoides también depende de la activación de ROCK, se analizó el efecto del inhibidor específico de ROCK, Y-27632, sobre la fosforilación de p38, ERK, AKT y GSK3 $\beta$ . Así, FLS de 6 pacientes con AR se trataron 1 hora con Y-27632 (20  $\mu$ M) y posteriormente se estimularon durante 1 hora con rWnt5a (400 ng/mL). Los datos mostraron que la inhibición de ROCK redujo

significativamente la fosforilación de p38, AKT y GSK3 $\beta$  y se observó una disminución no significativa de la activación de ERK (Figura 35).



**Figura 34. Efecto de la inhibición de RYK sobre la fosforilación de p38, ERK, AKT y GSK3 $\beta$  inducida por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides.** A) Representación gráfica de la fosforilación de las MAPKs p38 y ERK, así como de AKT y GSK3 $\beta$  en FLS estimulados con 400 ng/mL de rWnt5a y tratados o no con 1  $\mu$ g/mL de anti-RYK. B) Imágenes representativas del Western blot de las 4 quinasas estudiadas. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de FLS de 6-8 pacientes con AR. \* y # indican  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). pp38: p38 fosforilado; pERK: ERK fosforilado; pAKT: AKT fosforilado; pGSK3 $\beta$ : GSK3 $\beta$  fosforilado;  $\alpha$ -RYK: anti-RYK.



**Figura 35. Efecto de la inhibición de ROCK sobre la fosforilación de p38, ERK, AKT y GSK3β inducida por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides.** A) Representación gráfica de la fosforilación de las MAPKs p38 y ERK, así como de AKT y GSK3β en FLS estimulados con 400 ng/mL de rWnt5a y tratados o no con 20μM de iROCK y B) Imágenes representativas del Western blot de las 4 quinasas estudiadas. Los valores se expresan como la media ± ESM de FLS de 6 pacientes con AR. \* y # indican p<0,05 (test Wilcoxon). pp38: p38 fosforilado; pERK: ERK fosforilado; pAKT: AKT fosforilado; pGSK3β: GSK3β fosforilado; Y-27632: inhibidor de ROCK.

El conjunto de estos resultados indica que WNT5A contribuye al fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides mediante su interacción con el receptor RYK y la subsecuente

activación de diferentes vías de señalización (vía no canónica WNT/PCP - RhoA/ROCK y WNT/Ca<sup>2+</sup>, vía de las MAPK p38 y ERK y vía de AKT/PI3K).





## **CAPÍTULO 2**

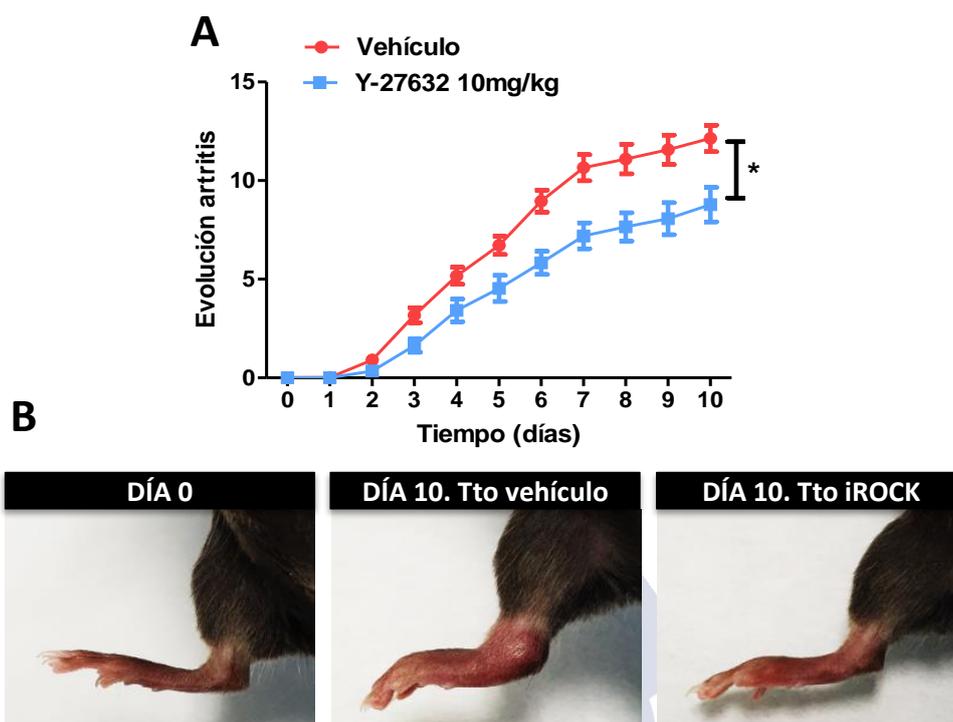
El papel de la inhibición de ROCK en el modelo de  
artritis experimental



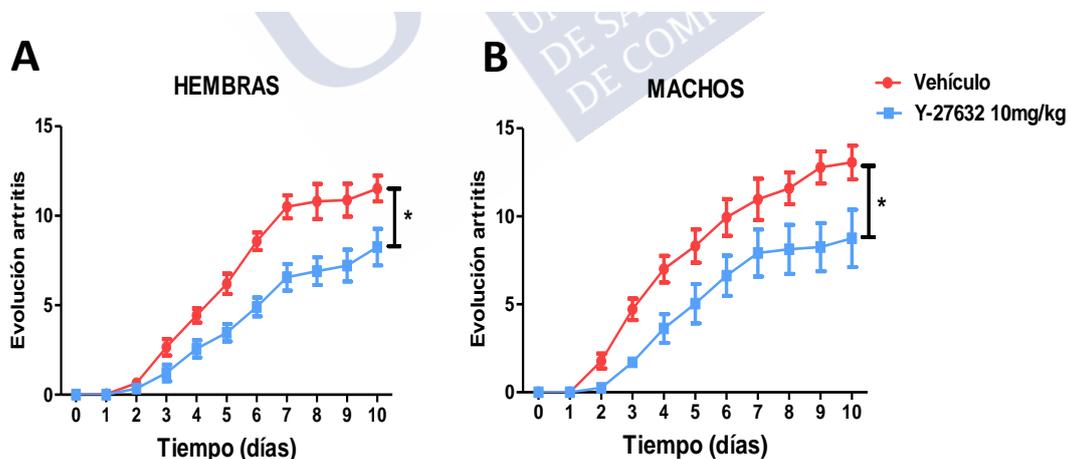


## 2.1. LA INHIBICIÓN DE ROCK DISMINUYE LA SEVERIDAD DE LA ARTRITIS EN EL MODELO MURINO POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN

Puesto que nuestros resultados *in vitro* indicaron que WNT5A contribuye al fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides a través de la vía de señalización RYK-RhoA/ROCK, se decidió evaluar el potencial terapéutico del inhibidor específico de ROCK (Y-27632) en el modelo murino de artritis pasiva. Para ello, se indujo artritis mediante transferencia de suero de ratones K/BxN en ratones C57BL/6J y se trataron con 10 mg/Kg de Y-27632 o con vehículo (suero fisiológico). Así, los ratones C57BL/6J se dividieron en dos grupos: un grupo control en el que 15 ratones (10 hembras y 5 machos) fueron tratados con suero fisiológico y un grupo experimental en el que 14 ratones (8 hembras y 6 machos) fueron tratados con el inhibidor de ROCK, siguiendo el esquema terapéutico detallado en el apartado material y métodos. La evolución clínica de la artritis fue evaluada por dos observadores independientes hasta el día 10, cuando se alcanza la máxima actividad clínica en este modelo, en nuestro animalario. La incidencia de la artritis fue del 100% en ambos grupos de ratones y no se observaron diferencias en el curso de la enfermedad. Como se muestra en la Figura 36, la severidad de la artritis fue significativamente menor en el grupo tratado con el inhibidor que en el grupo control. No se observaron diferencias en la gravedad o evolución de la enfermedad en función del sexo de los ratones (Figura 37).



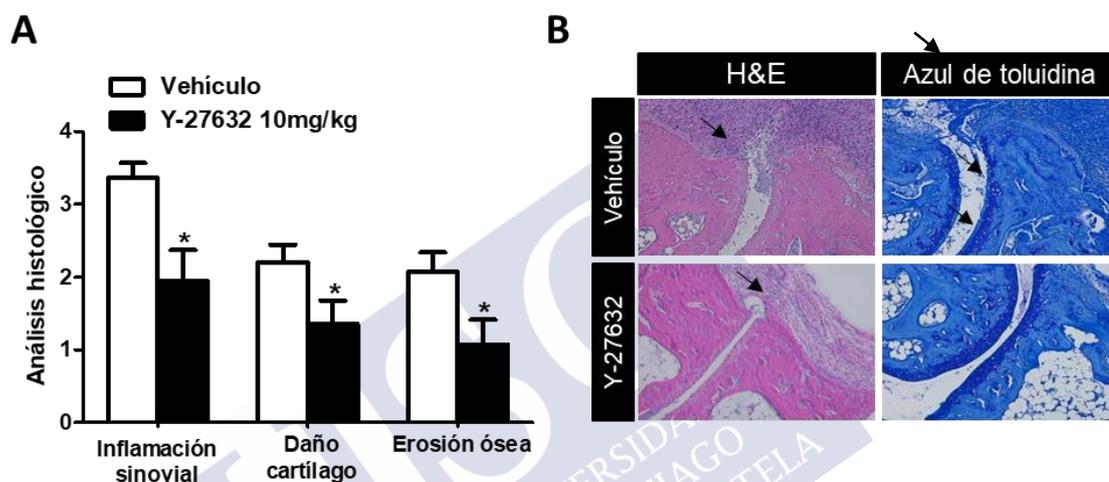
**Figura 36. La inhibición de ROCK disminuyó la severidad de la artritis experimental.** Evolución clínica de la artritis en 14 ratones C57BL/6J tratados con Y-27632 y en 15 ratones tratados con vehículo. **B)** Imágenes representativas de patas traseras de ratones de ambos grupos a días 0 y 10. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM (ANOVA de medidas repetidas). Y-27632: inhibidor de ROCK.



**Figura 37. Evolución clínica de la artritis inducida por transferencia de suero K/BxN.** Evolución clínica de la artritis en 18 C57BL/6J hembras (**A**) y 11 machos (**B**) tras el tratamiento con el inhibidor de ROCK (Y-27632) o vehículo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM (ANOVA de medidas repetidas). Y-27632: inhibidor de ROCK.

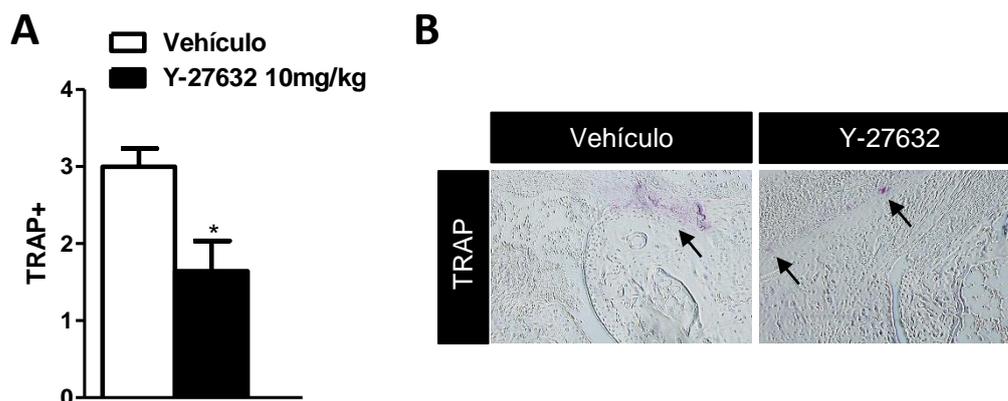
Posteriormente, se realizó el análisis histológico de las articulaciones tibio-talares y articulaciones del metatarso de los ratones. Para ello, los bloques incluidos en parafina se cortaron y tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para estudiar la inflamación sinovial y la

erosión ósea y con azul de toluidina para evaluar el daño del cartílago. Como se observa en la Figura 38, el análisis histológico reveló una reducción significativa de la inflamación sinovial, del daño del cartílago y de la erosión ósea en el grupo de ratones tratado con el inhibidor de ROCK en comparación con el grupo control. De este modo, la inflamación sinovial fue un 42,3% inferior en los ratones tratados con iROCK con respecto al grupo control. Se observó una disminución similar, del 38,6%, en el daño del cartílago. La reducción de la erosión ósea fue más marcada, con un descenso del 48,3%.



**Figura 38. La inhibición de ROCK disminuyó la inflamación sinovial, el daño del cartílago y la erosión ósea.** **A)** Graduación histológica de la inflamación sinovial, daño del cartílago y erosión ósea en las articulaciones de ratones control (vehículo) y tratados (Y-27632). **B)** Imágenes representativas de la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y azul de toluidina en ambos grupos de ratones. Las flechas indican infiltrado celular (H&E) y pérdida de proteoglicanos y destrucción del cartílago (azul de toluidina). Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM. \*  $P < 0,05$  (test de Mann-Whitney). Y-27632: inhibidor de ROCK.

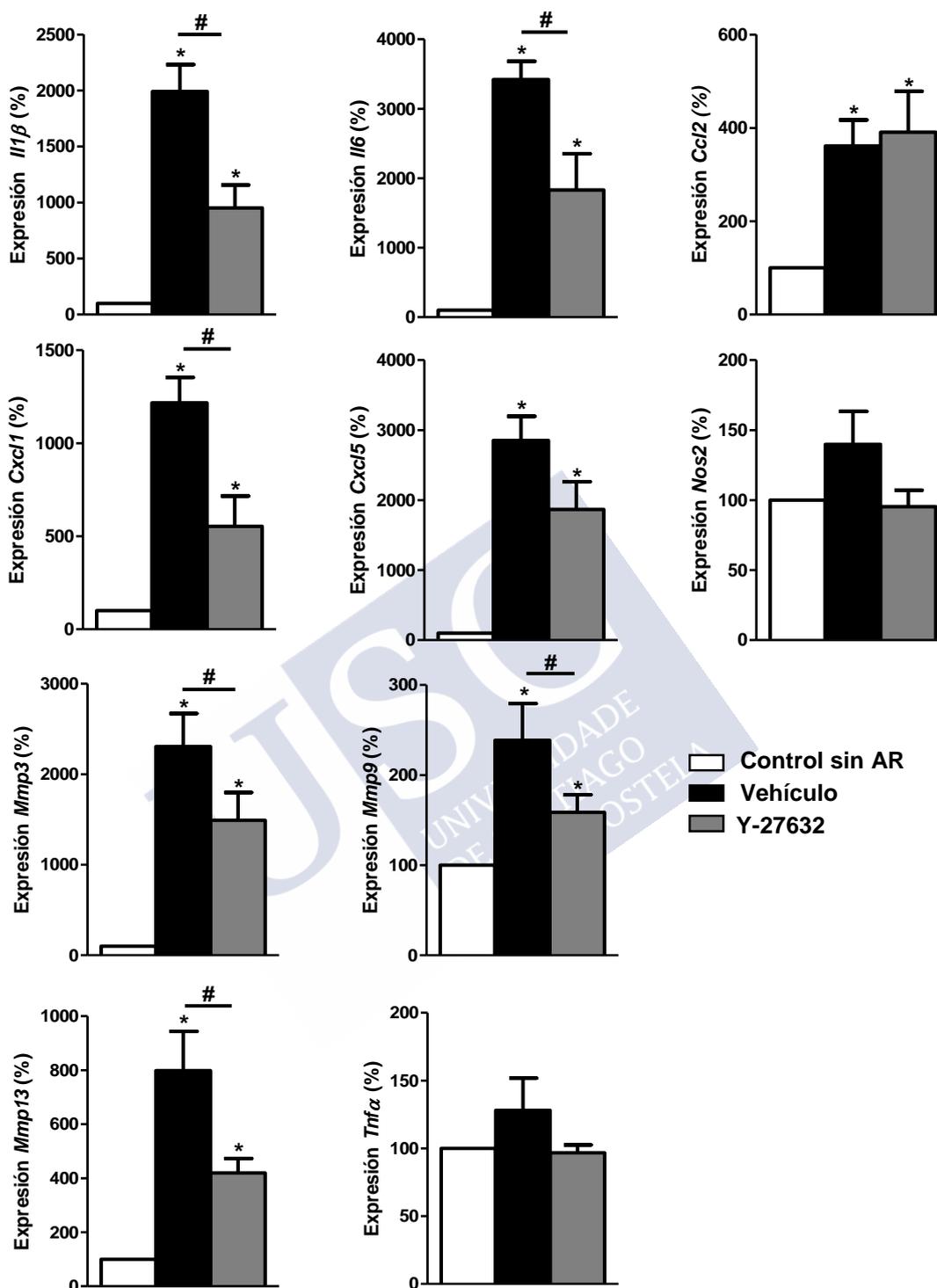
Para evaluar más a fondo el impacto del tratamiento con iROCK en la erosión ósea, las secciones histológicas fueron teñidas con la tinción para la actividad fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite identificar la presencia de osteoclastos y las áreas de resorción en el tejido óseo. Como se observa en la Figura 39, esta tinción permitió identificar un marcado descenso de osteoclastos TRAP positivos en ratones tratados con el inhibidor de ROCK en comparación con los ratones tratados con vehículo.



**Figura 39. La inhibición de ROCK redujo la actividad fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) en ratones artríticos. A)** Graduación histológica de la actividad fosfatasa ácida tartrato-resistente en el grupo control (vehículo) y el grupo tratado (Y-27632). **B)** Imágenes representativas de la tinción de TRAP en ambos grupos. Las flechas indican células TRAP positivas (osteoclastos, en rojo) en las áreas de erosión local. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM. \*  $P < 0,05$  (test de Mann-Whitney). TRAP: fosfatasa ácida tartrato-resistente. Y-27632: inhibidor de ROCK.

## 2.2. LA INHIBICIÓN DE ROCK DISMINUYE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN EL TEJIDO ARTICULAR DE RATONES ARTRÍTICOS

Con el fin de analizar los mecanismos que contribuyen a la reducción de la severidad de la artritis en ratones tratados con el inhibidor de ROCK, se analizó la expresión de mediadores inflamatorios y Mmps mediante PCR a tiempo real a partir de ARN extraído de las articulaciones de 9 ratones controles y 9 ratones tratados con Y-27632. Los niveles de ARNm de *Il1 $\beta$* , *Il6*, *Cxcl1*, *Mmp3*, *Mmp9* y *Mmp13* en el tejido articular de ratones tratados con el inhibidor de ROCK fueron significativamente menores que los observados en el grupo control, tratado con vehículo (Figura 40), excepto los niveles de *Cxcl5* que mostraron una disminución no significativa con el tratamiento. Además, hay que destacar que el inhibidor redujo la expresión de *Tnfa* y *Nos2*, hasta los niveles detectados en el tejido articular de ratones C57BL/6J sin artritis, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística (Figura 40). Por el contrario, la inhibición de ROCK no modificó la expresión de la quimioquina *Ccl2* cuyo nivel de expresión fue similar en ambos grupos de ratones (Figura 40).

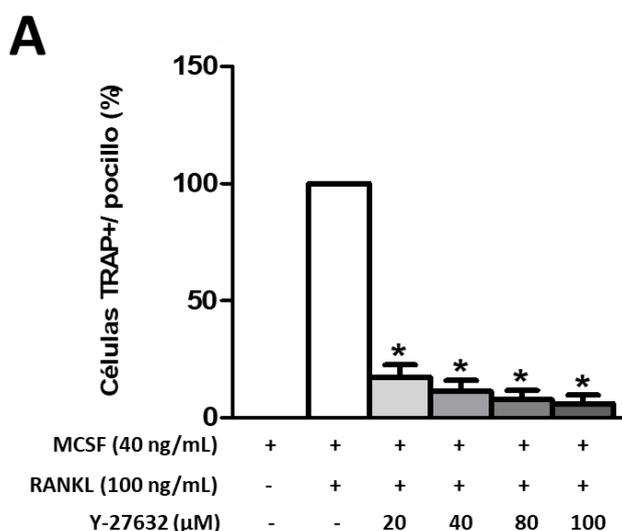


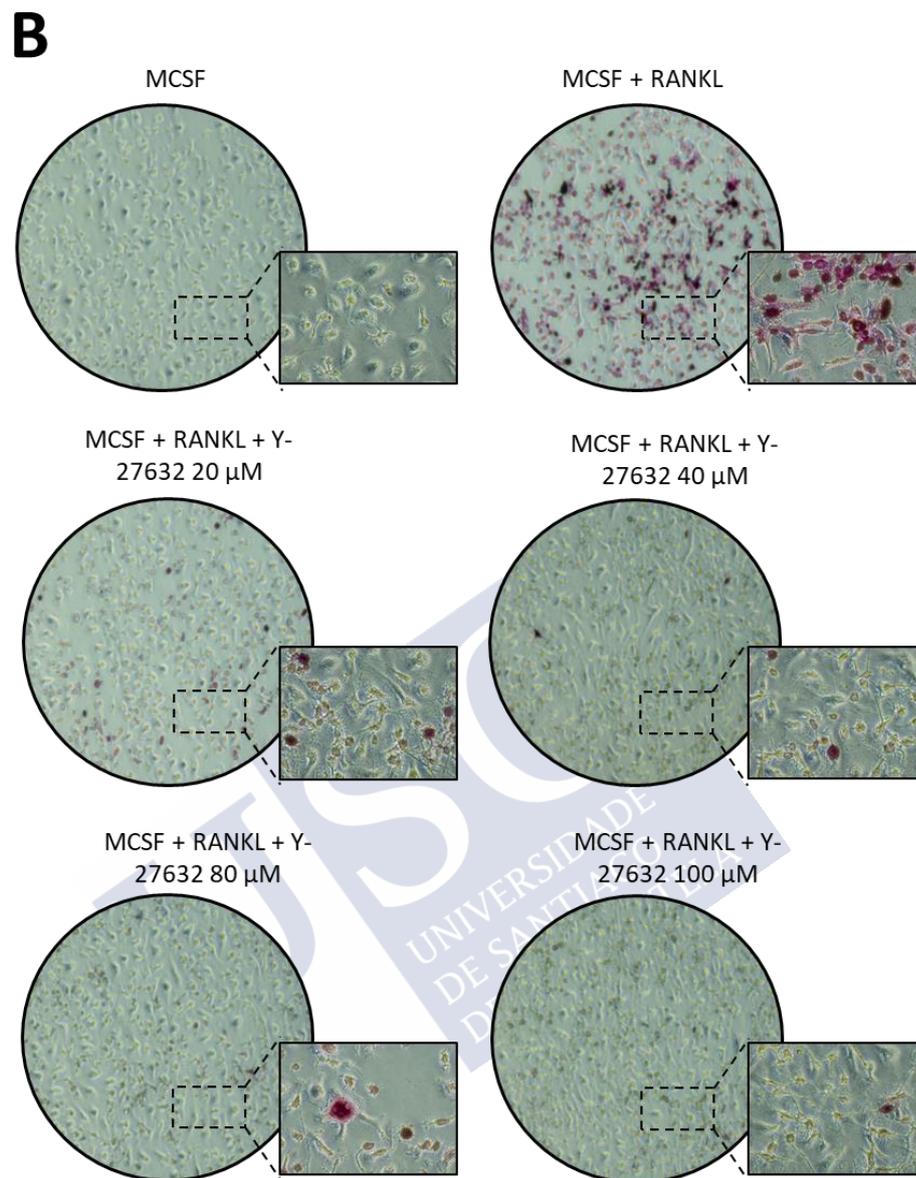
**Figura 40. La inhibición de ROCK disminuyó la expresión de mediadores inflamatorios y metaloproteasas en tejido articular de ratones artríticos.** Niveles de ARNm de los distintos mediadores inflamatorios y metaloproteasas corregidos por la  $\beta$ -Actina en ratones artríticos, tratados con Y-27632 o con vehículo, y ratones controles sin artritis. Los valores representan la media  $\pm$  ESM de 6-9 ratones en cada grupo con respecto al control sin artritis, considerado el 100%. \* y # indican  $p < 0,05$  (test de Mann-Whitney). Y-27632: inhibidor de ROCK.

### 2.3. LA DIFERENCIACIÓN Y FUNCIÓN DE OSTEOCLASTOS DE RATONES ARTRÍTICOS DISMINUYE TRAS LA INHIBICIÓN DE ROCK

La importante reducción de la erosión ósea y de la actividad TRAP observada en las articulaciones de ratones artríticos tratados con Y-27632 indica el efecto de la inhibición de ROCK en la modulación del metabolismo óseo en la artritis.

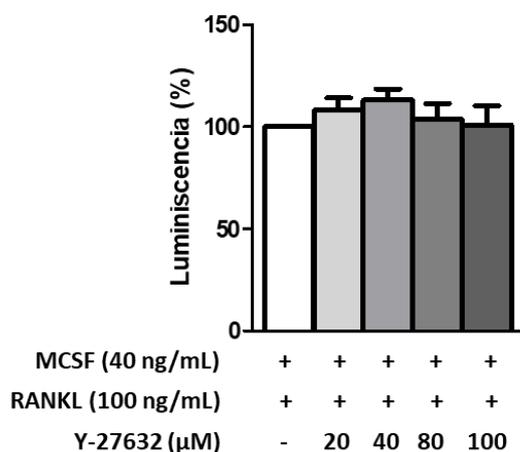
Con el fin de estudiar los mecanismos implicados en este proceso, se analizó el efecto *in vitro* del inhibidor de ROCK en la diferenciación y función de osteoclastos derivados de precursores de MO de ratones C57BL/6J artríticos. Para ello, los precursores de osteoclastos se diferenciaron a osteoclastos *in vitro* mediante el tratamiento con MCSF (40 ng/mL) y RANKL (100 ng/mL) durante 8 días, como se ha detallado en el apartado material y métodos. Durante este proceso, los precursores se trataron con distintas concentraciones de iROCK: 20, 40, 80 o 100  $\mu$ M y el control, con 0,04% de DMSO en el medio de cultivo (vehículo). El tratamiento con Y-27632 redujo drásticamente la diferenciación hacia osteoclastos. Como se observa en la Figura 41, la menor dosis del inhibidor utilizada, 20  $\mu$ M, redujo en un 82,8 % el porcentaje de células TRAP+ multinucleadas (osteoclastos) en comparación con cultivos tratados con el vehículo DMSO (Figura 41). Además, esta reducción fue dosis dependiente ya que el incremento de la concentración del inhibidor disminuyó el porcentaje de osteoclastos tras el proceso de diferenciación, obteniendo solo el 6 % de osteoclastos con 100  $\mu$ M de Y-27632 (Figura 41).





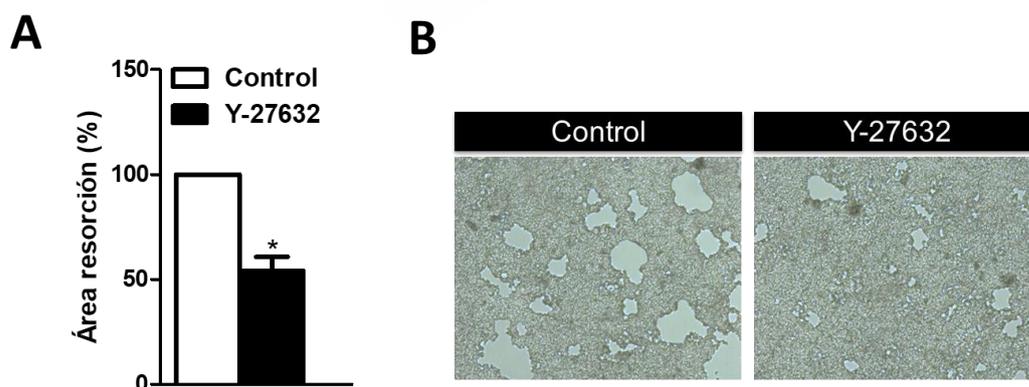
**Figura 41. La inhibición de ROCK bloquea la diferenciación *in vitro* de osteoclastos en ratones artríticos.** **A)** Representación gráfica del porcentaje de células TRAP<sup>+</sup> multinucleadas diferenciadas a partir de precursores de médula ósea de ratones artríticos, tratados con MCSF (control negativo), MCSF + RANKL (control positivo, considerado el 100%) y distintas concentraciones del inhibidor de ROCK (20, 40, 80 y 100 $\mu$ M). **B)** Imágenes representativas de osteoclastos obtenidos en el proceso de diferenciación con los tratamientos indicados. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de células de 7 ratones artríticos. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). MCSF: factor estimulante de colonias de macrófagos, RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B; Y-27632: inhibidor de ROCK.

Como se muestra en la siguiente figura, la reducción del número de células TRAP positivas multinucleadas observadas con el tratamiento de iROCK no se puede atribuir a un exceso de apoptosis en los precursores de MO dado que no se observaron cambios en la supervivencia celular en comparación con el control positivo, tratado solo con MCSF y RANKL (Figura 42).



**Figura 42. La viabilidad de los precursores de MO no se afectó por el tratamiento con el inhibidor de ROCK.** Representación gráfica de la viabilidad de los precursores de MO tratados durante 8 días con las concentraciones de Y-27632 indicadas en el ensayo de osteoclastogénesis. La viabilidad celular se cuantificó con el kit “CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay” y la luminiscencia obtenida para el control positivo fue considerada el 100%. Los valores representan la media  $\pm$  ESM de FLS de 4 ratones artríticos. MCSF: factor estimulante de colonias de macrófagos; RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B; Y-27632: inhibidor de ROCK.

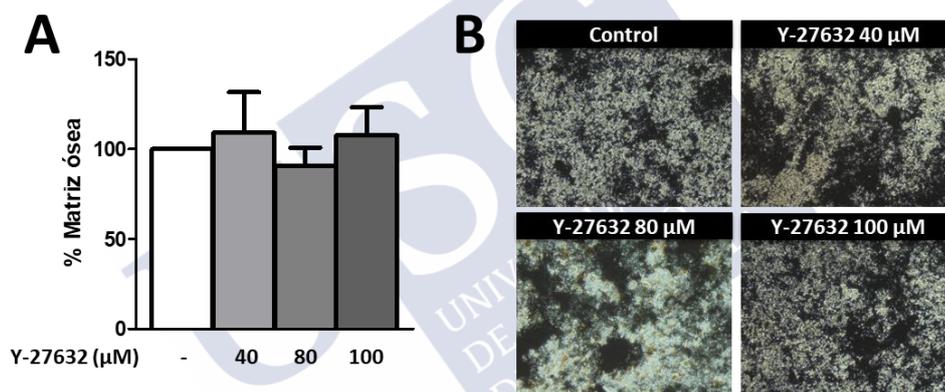
Para determinar el efecto del inhibidor de ROCK sobre la capacidad funcional de los osteoclastos diferenciados *in vitro*, precursores de MO procedentes de ratones artríticos se diferenciaron a osteoclastos en placas de cultivo con pocillos recubiertos de carbonato de apatita y se cuantificaron las áreas de resorción ósea producidas. El tratamiento con el inhibidor Y-27632 redujo las áreas de resorción un 46% cuando se comparó con el control tratado con vehículo, como se muestra en la Figura 43.



**Figura 43. La inhibición de ROCK disminuyó la resorción del carbonato de apatita producida por osteoclastos.** A) Representación gráfica del porcentaje de resorción producida por osteoclastos derivados de MO de ratones artríticos tratados con 40μM de Y-27632 y del control tratado con 0,04% de DMSO, considerado el 100%. B) Imágenes representativas de las áreas de resorción de los distintos tratamientos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de células de 6 ratones artríticos. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). Y-27632: inhibidor de ROCK.

## 2.4. LA INHIBICIÓN DE ROCK NO MODULA A LOS OSTEÓBLASTOS EN RATONES ARTRÍTICOS

Puesto que ROCK está implicado en la diferenciación y función de los osteoclastos en ratones artríticos, se ha planteado a la posibilidad de la participación de ROCK en el otro tipo celular implicado en el remodelado óseo, los osteoblastos. La función de los osteoblastos se evaluó mediante un ensayo de mineralización, explicado en el apartado material y métodos. Tras 10 días de cultivo de los osteoblastos con distintas concentraciones de iROCK (40, 80 y 100  $\mu\text{M}$ ) o 0,04% de DMSO, se realizó la tinción de von Kossa para analizar el grado de mineralización. Se observó que el tratamiento con iROCK no incrementó la osteoblastogénesis ni la formación de nódulos mineralizados en ninguna de las dosis utilizadas en comparación con el control tratado con DMSO (Figura 44).



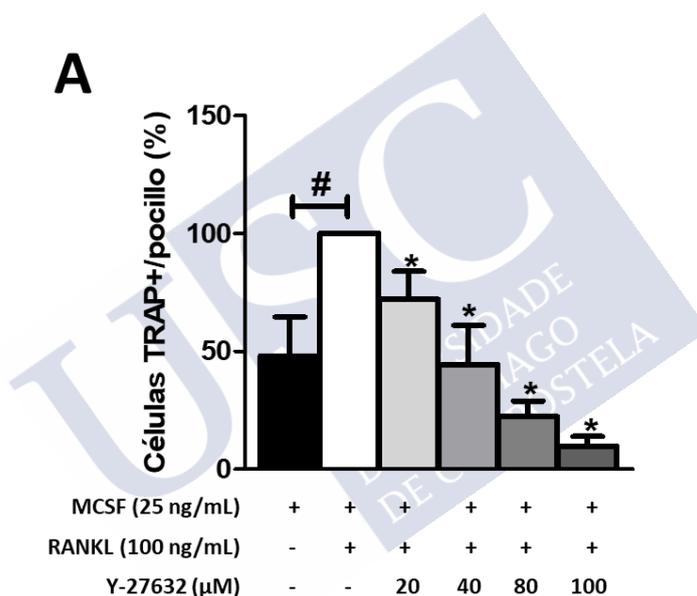
**Figura 44. El número de osteoblastos obtenidos de ratones artríticos y su función no se alteró por la inhibición de ROCK.** **A)** Representación gráfica del porcentaje de matriz ósea producida por osteoblastos primarios de ratones artríticos tratados con las concentraciones indicadas de Y-27632 y del control tratado con 0,04% de DMSO, considerado el 100%. **B)** Imágenes representativas de nódulos mineralizados de los distintos tratamientos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de células de 5 ratones artríticos. Y-27632: inhibidor de ROCK.

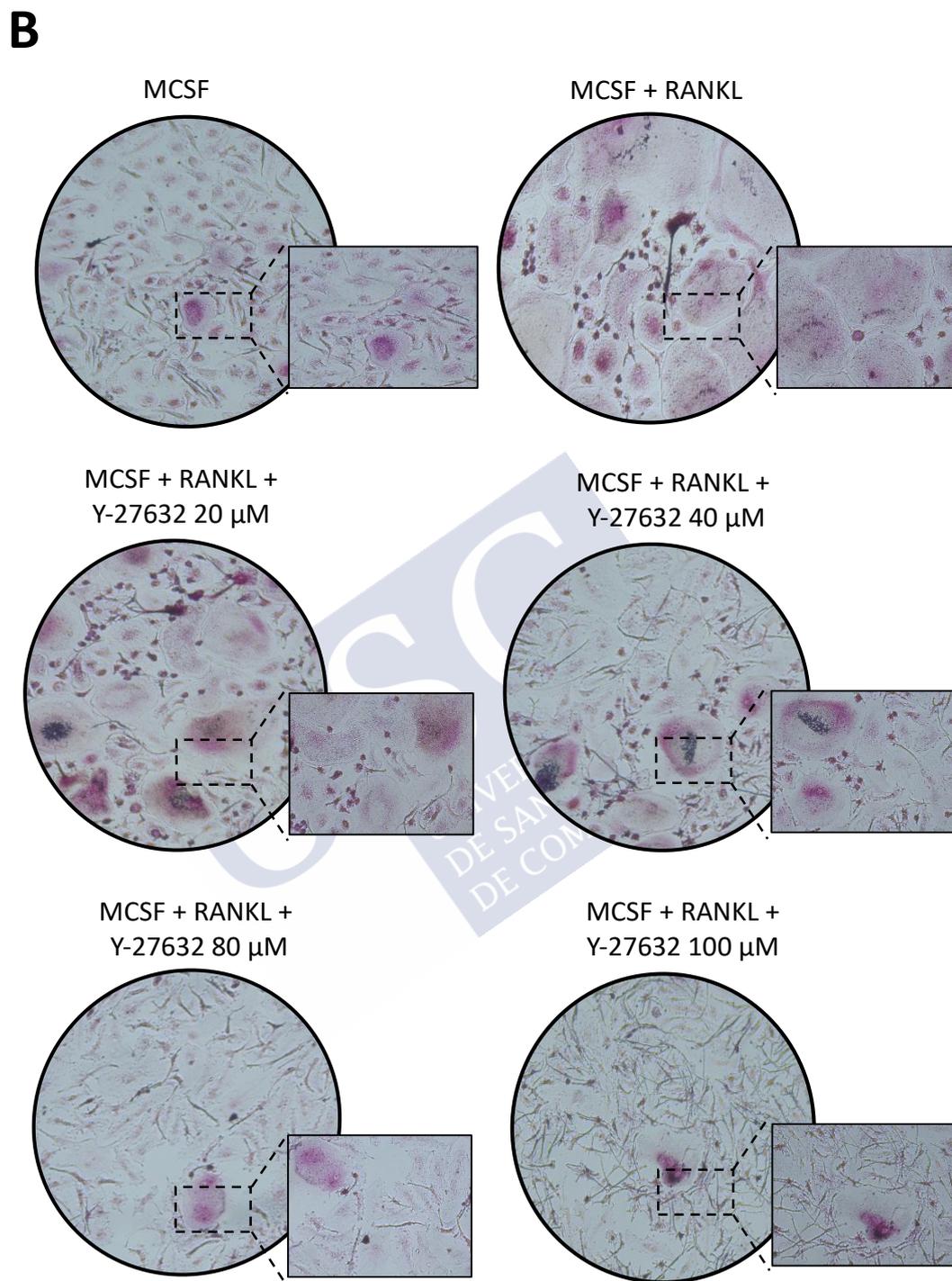
## 2.5. LA INHIBICIÓN DE ROCK REDUCE LA DIFERENCIACIÓN Y FUNCIÓN DE LOS OSTEÓCLASTOS EN PACIENTES CON AR

En la patogenia de la AR, el aumento de la actividad de los osteoclastos es crucial en la pérdida ósea irreversible que conduce a deformidades articulares y a la incapacidad funcional en los pacientes que la padecen.

Con el fin de analizar si el efecto de la inhibición de ROCK sobre la diferenciación y función de osteoclastos en ratones artríticos se confirma en pacientes, se obtuvieron células PBMCs de

pacientes con artritis inflamatoria que van a iniciar tratamiento con FAME. Posteriormente, se diferenciaron a osteoclastos mediante el tratamiento con MCSF (25 ng/mL) y RANKL (100 ng/mL) durante 21 días. Además, se trataron con distintas concentraciones de iROCK: 20, 40, 80 y 100  $\mu$ M. El grupo control se trató con 0,04% de DMSO (vehículo). Como se observa en la Figura 45, el tratamiento con Y-27632 redujo significativamente las células TRAP+ multinucleadas obtenidas, en comparación con los cultivos tratados con el vehículo DMSO. Esta reducción fue dependiente de dosis, ya que se incrementó con el aumento de la concentración del inhibidor. Así, el mayor efecto se observó con la concentración de 100  $\mu$ M del inhibidor, con la que la osteoclastogénesis se redujo en un 90 % en comparación con el grupo control.

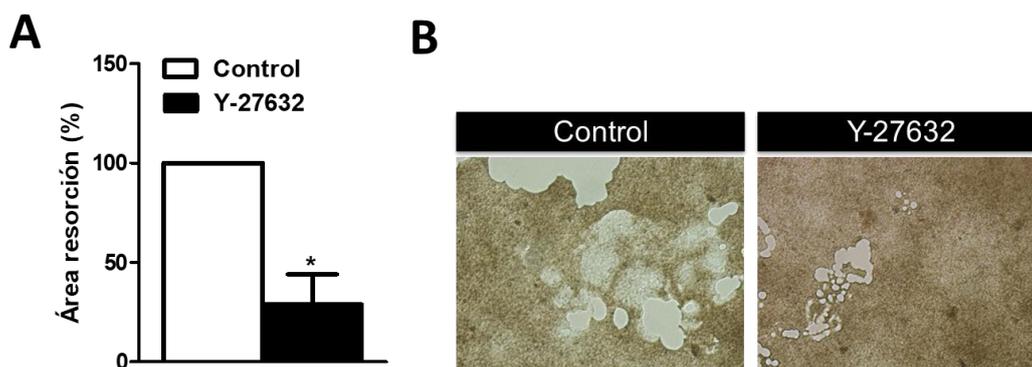




**Figura 45. La inhibición de ROCK reduce la diferenciación *in vitro* de los osteoclastos en pacientes con artritis.**

**A)** Representación gráfica del número de células TRAP+ multinucleadas diferenciadas a partir de PBMCs de pacientes con artritis, tratados con MCSF (control negativo), MCSF + RANKL (control positivo, considerado el 100%) y distintas concentraciones del tratamiento de iROCK (20, 40, 80 y 100 $\mu$ M). **B)** Imágenes representativas de los osteoclastos obtenidos con los tratamientos indicados. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de células de 6 pacientes con artritis. \* y # indican  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). MCSF: factor estimulante de colonias de macrófagos, RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B; Y-27632: inhibidor de ROCK.

También se estudió el efecto del inhibidor de ROCK sobre la capacidad de resorción ósea de los osteoclastos diferenciados *in vitro*. Para ello, PBMCs se diferenciaron a osteoclastos en pocillos recubiertos de carbonato de apatita y se cuantificaron las áreas de resorción ósea producidas. Como se observa en la Figura 46, la inhibición de ROCK redujo en un 72% las áreas de resorción en comparación con el grupo control tratado con vehículo.



**Figura 46. La inhibición de ROCK disminuyó el área de resorción sobre carbonato de apatita. A)** Representación gráfica del porcentaje de resorción producida por osteoclastos derivados de PBMCs de pacientes con artritis, tratadas con 80 $\mu$ M de Y-27632 y del control tratado con 0,04% de DMSO, considerado el 100%. **B)** Imágenes representativas de las áreas de resorción de los distintos tratamientos. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM de células de 5 pacientes con artritis. \* indica  $p < 0,05$  (test Wilcoxon). Y-27632: inhibidor de ROCK.



# **DISCUSIÓN**



## **1. WNT5A contribuye al fenotipo agresivo de los FLS de pacientes con AR promoviendo su capacidad de migración e invasión y la expresión de mediadores inflamatorios**

En la AR, los sinoviocitos tipo fibroblasto tienen un papel central en la inflamación persistente y la progresión hacia el daño articular. Estas células adquieren un fenotipo agresivo, pseudotumoral, que se caracteriza por la sobreexpresión de protooncogenes, mutaciones en genes supresores de tumores, aumento de la proliferación y resistencia a la apoptosis y a la inhibición por contacto. Este fenotipo agresivo se mantiene a lo largo del tiempo, incluso en ausencia de estímulo inflamatorio externo. Recientemente, numerosos trabajos se han centrado en el estudio del fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides.<sup>60,75,89,92,93,201</sup> Sin embargo, el aumento de la capacidad de migración e invasión de estas células es un aspecto de su fenotipo que no ha sido suficientemente estudiado y que puede proporcionar nuevas dianas terapéuticas.

Trabajos previos han destacado el papel de la vía de señalización de WNT5A en procesos de migración e invasión durante el desarrollo embrionario y en distintas patologías.<sup>118,149,160</sup> Pese a la existencia de trabajos que sugieren la contribución de WNT5A en la patogenia de la AR, se desconoce su papel en el fenotipo agresivo de los sinoviocitos. Por ello, en este trabajo de tesis se ha analizado el papel de la señalización no canónica de WNT5A en la capacidad de migración, invasión y proliferación de los sinoviocitos reumatoides, así como en la producción de mediadores inflamatorios.

Nuestros resultados indican que WNT5A contribuye al fenotipo agresivo de los FLS reumatoides promoviendo su capacidad de migración e invasión. Este efecto fue demostrado no solo con la adición de rWnt5a, sino también con el silenciamiento de la expresión endógena de WNT5A. Además, hemos encontrado que este efecto modulador es específico de FLS de pacientes con AR, ya que el tratamiento con rWnt5a en FLS de pacientes con OA no incrementó su capacidad de migración e invasión.

El análisis de expresión de WNT5A en sinoviocitos de ambas enfermedades también mostró diferencias, así el nivel de ARNm de WNT5A fue casi tres veces superior en sinoviocitos reumatoides que en los de pacientes con OA. En el mismo sentido, el trabajo de Sen y col.<sup>185</sup> ya mostró una expresión significativamente mayor de WNT5A en tejido sinovial de pacientes con AR en comparación con tejido sinovial procedente de pacientes con OA.

El papel regulador de WNT5A sobre la migración e invasión de los sinoviocitos reumatoides es consistente con trabajos previos en distintos tipos de cáncer. Así, la sobreexpresión de WNT5A en líneas celulares de cáncer nasofaríngeo indujo significativamente migración e invasión mientras que su silenciamiento las disminuyó.<sup>170</sup> WNT5A también indujo migración e invasión en cáncer gástrico a través de su unión con FZD2 y ROR2, y el tratamiento *in vivo* con anticuerpo anti-Wnt5a inhibió el desarrollo de metástasis hepáticas de células cancerosas gástricas.<sup>202</sup> Del mismo modo, WNT5A indujo migración en células de leucemia linfocítica crónica<sup>203</sup> y melanoma.<sup>204</sup> También se ha descrito que WNT5A promueve la migración de células de osteosarcoma a través de los receptores ROR1/2 y mediante la activación de Daam1 y RhoA.<sup>205</sup> Sin embargo, el papel de WNT5A es complejo y depende del contexto celular, lo que podría explicar los efectos opuestos que se han descrito en otras células cancerosas. Así, el aumento de expresión de WNT5A en células de cáncer de colon se ha asociado con un mejor pronóstico debido a la disminución de la capacidad de migración e invasión de estas células, así como a la reducción de metástasis.<sup>177</sup> También se ha demostrado que altos niveles de expresión de WNT5A en cáncer de próstata de grado bajo se asocia con una mejor evolución y pronóstico en pacientes sometidos a prostatectomía al disminuir la capacidad invasiva de la células tumorales.<sup>206,207</sup>

La dependencia del efecto de WNT5A en función del tipo celular es una característica común de los ligandos WNT, donde el contexto celular es el principal determinante de factores tales como el repertorio de receptores y transductores de señal expresados.<sup>208</sup> La falta de respuesta a rWnt5a de los sinoviocitos de pacientes con OA constituye otro ejemplo de la importancia del contexto celular. Un contexto que difiere en un amplio rango de marcas epigenéticas y patrones de expresión génica entre los FLS de AR y los de OA.<sup>209,210</sup>

La magnitud de los cambios observados en los sinoviocitos reumatoides en la migración e invasión fue alrededor de un tercio del nivel de referencia. Estos cambios son modestos en comparación con los inducidos por algunas citoquinas y quimioquinas,<sup>211-213</sup> pero similares a lo observado en otros estudios, incluido el estudio que bloquea la vía Sonic hedgehog<sup>198</sup> o la supresión de la cathepsina B.<sup>214</sup>

Por otro lado, otros estudios también han demostrado el papel de WNT5A en la modulación de la proliferación celular.<sup>192,215,216</sup> Así, WNT5A estimula la proliferación celular en la leucemia linfocítica crónica mediante la activación de ERK mediante la vía ROR1/DOCK2.<sup>215</sup> En la

misma línea, la sobreexpresión de WNT5A en condrocitos incrementó su capacidad de proliferación, migración e hipertrofia.<sup>216</sup> Sin embargo, en este trabajo de tesis, WNT5A no moduló la capacidad de proliferación de los FLS, ya que no se produjeron cambios ni con el tratamiento de rWnt5a ni con el silenciamiento de WNT5A endógeno. Estos datos señalan nuevamente la importancia del tipo celular en los efectos de la señalización de WNT5A.

La nueva contribución de WNT5A a la migración e invasión en sinoviocitos reumatoides completa la ya conocida participación de WNT5A en la inducción de mediadores inflamatorios por estas células.<sup>185,217</sup> En este sentido, nuestro estudio confirma la inducción de IL6 y CXCL8/IL8, y muestra también que quimioquinas, como CCL2 y CXCL5, y metaloproteasas de matriz, como MMP1, MMP3, MMP9 y MMP13, son inducidas por rWnt5a en sinoviocitos reumatoides. Estos efectos fueron corroborados con la supresión de WNT5A endógeno. Las quimioquinas CCL2 y CXCL8/IL8 generalmente solo se expresan en condiciones inflamatorias.<sup>74</sup> Mientras que la quimioquina CCL2 es un potente quimioatrayente para macrófagos y monocitos al sitio de lesión, las quimioquinas CXCL5 y CXCL8/IL8 promueven el reclutamiento de neutrófilos. Además, la quimioquina CCL2 promueve la osteoclastogénesis y la angiogénesis, eventos involucrados en la patogénesis de la AR.<sup>65,218</sup> El papel de WNT5A en la estimulación de la producción de MMPs ya fue estudiado en otros tipos celulares. Así en condrocitos, el tratamiento con rWnt5a indujo la expresión de MMP1 MMP3 y MMP13.<sup>219</sup> Nuestros resultados indican que algunos mediadores son más sensibles a WNT5A que otros. El primer grupo incluye IL6 y CXCL5, que fueron modulados por rWnt5a en FLS, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con TNF. Por el contrario, MMP13 solo respondió a rWnt5a en ausencia de TNF, mientras que MMP3 y MMP9 fueron sensibles a rWnt5a en presencia de TNF, lo cual podría ser más relevante en el contexto de la patogénesis de la AR. Finalmente, CXCL8/IL8 y MMP1 fueron inducidas por rWnt5a, aunque no disminuyeron su expresión tras el silenciamiento de WNT5A endógeno. Esta heterogeneidad en la respuesta refleja probablemente la participación de una gran variedad de vías en la regulación de estos mediadores en los sinoviocitos reumatoides.

Por otro lado, nuestros datos muestran que rWnt5a reguló negativamente MMP2. Este efecto fue confirmado con la supresión de WNT5A endógeno, la cual provocó un aumento de la expresión de esta metaloproteasa. Esta regulación a la baja de la expresión de MMP2 contrasta con la expresión disminuida de MMP2 observada en ratones artríticos con deficiencia inducible de Wnt5a.<sup>188</sup> Sin embargo, ambos resultados no son completamente comparables debido a que

en el trabajo de ratones, el análisis de la expresión de Mmp2 se realizó en extractos de articulaciones que constituyen una compleja mezcla celular. Nuestro resultado es concordante con otros trabajos, que atribuyen un papel protector a esta MMP. Xue y col.<sup>76</sup> mostraron que la inhibición de MMP2 aumentó la expresión de TNF $\alpha$  e IL17 y activó al factor NF kB, mientras que la adicción de MMP2 recombinante inhibió la activación de NF kB por sinoviocitos reumatoides. En este sentido, Hong y col.<sup>220</sup> demostraron que MMP2 disminuye la expresión e inactiva a la citoquina IL17, importante en la migración, invasión y producción de mediadores inflamatorios de los FLS en la AR. Además, ratones knockout para Mmp2 desarrollaron una artritis más severa, mostrando *in vivo* el papel protector de esta metaloproteasa.<sup>77</sup> No hay otros estudios en los que se analice la regulación de MMP2 por WNT5A en la artritis reumatoide, pero en células de cáncer pueden encontrarse ambos resultados. Así, los trabajos de Ren y col.<sup>221</sup> y Sakamoto y col.<sup>222</sup> mostraron que WNT5A induce la expresión de MMP2 en células de carcinoma. Sin embargo, Cao y col.<sup>223</sup> observaron que la activación de WNT5A en células de cáncer de vejiga redujo la expresión de MMP2. Los estudios de Ren y col. y Sakamoto y col. resultan interesantes puesto que mostraron que WNT5A indujo la expresión de MMP2 a través de ROR2,<sup>221,222</sup> un receptor que se expresó muy poco en los sinoviocitos reumatoides y que no moduló la migración mediada por WNT5A de estas células.

La dependencia del contexto es también un factor determinante de la vía de señalización activada por el ligando WNT. La vía específica activada por WNT5A en los sinoviocitos reumatoides requirió el receptor RYK. RYK es un receptor tirosina quinasa atípico debido a que su dominio tirosina quinasa es inactivo.<sup>135</sup> Se ha estudiado mucho en el desarrollo del sistema nervioso donde es importante para establecer la polaridad planar durante el desarrollo del tubo neural y la migración neuronal hacia la placa cortical en expansión.<sup>162</sup> Sin embargo, participa en muchos otros sistemas como se ha puesto de manifiesto en ratones deficientes de RYK. Estos ratones desarrollaron anomalías esqueléticas, craneofaciales y cardíacas, muchas de las cuales se superponen con las observadas en ratones deficientes de WNT5A.<sup>224</sup> Nuestros resultados son concordantes con los hallazgos de Skaria y col.<sup>225</sup> que describieron la activación de ROCK a través de la señalización WNT5A/RYK en células endoteliales vasculares sin la participación de los receptores FZD o ROR. Del mismo modo, se ha descrito que WNT5A regula la proliferación y repoblación de células madre hematopoyéticas a través de su interacción con RYK.<sup>226</sup> Sin embargo, en otro tipo de células, la señalización WNT5A/RYK requiere la participación de otros receptores, como describieron Anastas y col.<sup>227</sup> en su estudio

en melanoma. En este trabajo los autores mostraron que la sobreexpresión de WNT5A promovió el crecimiento de células de melanoma *in vitro* a través de su unión con FZD7 y RYK e incrementó el potencial carcinogénico de las células de melanoma *in vivo*, que se acompañó de la activación de la señalización de AKT.

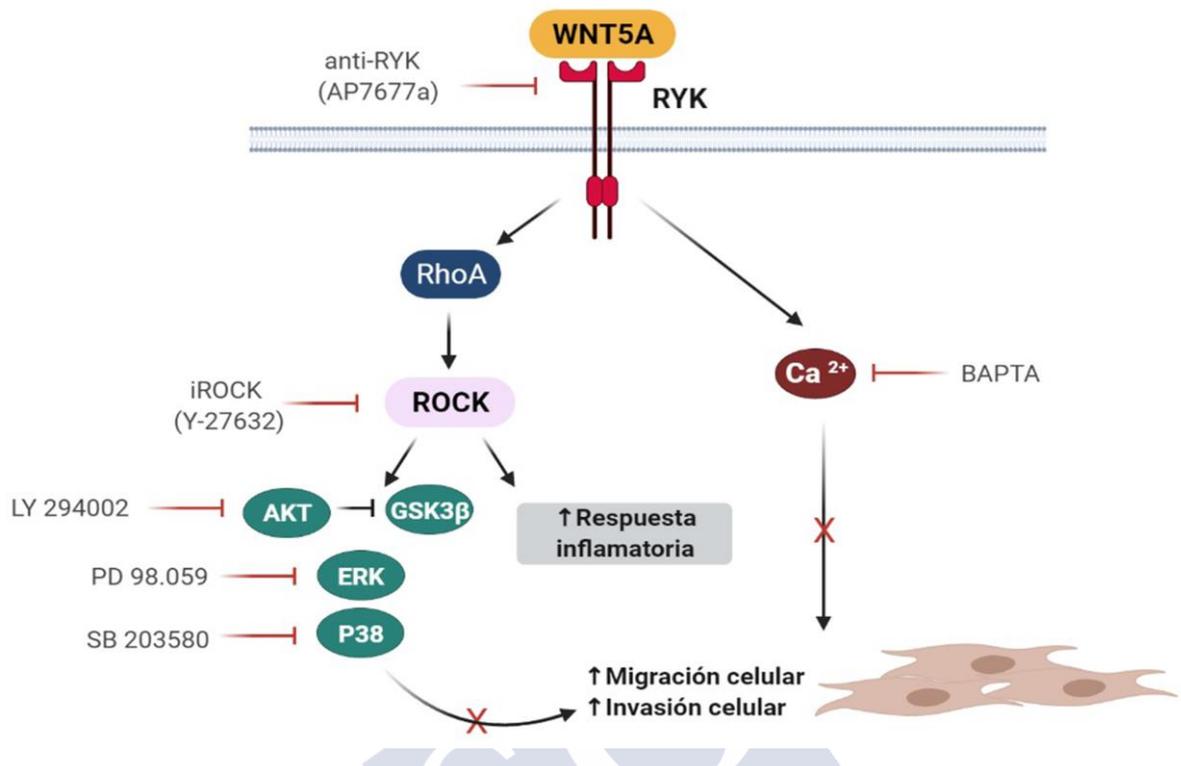
En nuestro trabajo no se pudo excluir completamente la señalización a través de los receptores FZD debido a la ausencia de reactivos específicos y al alto grado de redundancia entre ellos.<sup>228</sup> De este modo, el silenciamiento individual de cada uno de los receptores FZD no revela necesariamente su participación, tal y como se observó en ratones knockout para FZD que mostraron fenotipos incompletos debido a la señalización mediante otro FZD alternativo.<sup>229</sup> Una circunstancia que solo se podría resolver en los animales doble knockout. Este escenario debe tenerse en cuenta porque el papel de RYK en algunos sistemas actúa como un correceptor asociado con los receptores FZD.<sup>162,228</sup> Por el contrario, en otros sistemas la migración modulada por WNT5A requiere el receptor ROR2.<sup>195–197</sup> Nuestros resultados mostraron que en los sinoviocitos reumatoides ROR2 se expresa muy poco y que este receptor no interviene en la migración inducida por rWnt5a. Estos hallazgos son de interés porque se ha descrito que ROR2 recluta la proteína de unión a la actina, filamina A, que conduce a la remodelación del citoesqueleto y extensión de los filopodios mediante la activación de JNK,<sup>165</sup> que tampoco fue observada en los sinoviocitos reumatoides. Además, está descrita una comunicación cruzada entre las diferentes Rho GTPasas.<sup>230</sup> Así, RhoA y Rac, de ambas ramas de la vía no canónica PCP, se antagonizan entre sí, y la activación de Rac1 inhibe la actividad de RhoA y viceversa.

Las dos vías de señalización no canónica que se activaron en nuestros experimentos fueron WNT/Ca<sup>2+</sup> y la rama de la vía PCP que involucra a ROCK. Estas dos vías muestran una gran interacción y cooperan en algunos procesos que llevan a la superposición de sus funciones. Así, un ejemplo de esta superposición la encontramos en el desarrollo: la vía PCP es importante para la migración celular, crecimiento de axones, sinaptogénesis y formación de filopodios a través de la modulación del citoesqueleto de actina y microtúbulos, y la vía WNT/Ca<sup>2+</sup> es importante en la determinación del destino celular, la migración, extensión convergente embrionaria y guía de axones.<sup>162</sup> Por lo tanto, no es sorprendente que las dos vías cooperen para potenciar la migración de FLS reumatoides. La participación de ROCK también es congruente con la función más conocida de este miembro de las quinasas serina/treonina, que facilita la contractilidad del citoesqueleto de actomiosina. Específicamente, ROCK está involucrado en la formación de fibras de estrés y adherencias focales.<sup>153</sup>

Una limitación de nuestro estudio es la falta de distinción entre ROCK1 y ROCK2. Sin embargo, este es el enfoque más común en la investigación actual debido al alto grado de homología entre los dos, los muchos puntos en común en su regulación, patrón de expresión y funciones.<sup>153</sup>

Nuestros datos también han mostrado que, en los sinoviocitos reumatoides, la señalización de la vía WNT5A/RYK conduce, a través de ROCK, a la activación de las MAP quinasas p38 y ERK y de la vía PI3K/AKT. Este hallazgo completa la vía de señalización de WNT5A en los sinoviocitos reumatoides y además implica la participación de vías cuya relevancia en la patogenia de la AR ya ha sido descrita.<sup>198,199</sup>

En resumen, nuestros resultados indican que WNT5A contribuye al fenotipo agresivo de los FLS en pacientes con AR promoviendo su capacidad de migración e invasión y la expresión de mediadores inflamatorios a través de las vías de señalización WNT/Ca<sup>2+</sup> y RYK/RhoA/ROCK (Figura 47). De este modo, la identificación del papel de WNT5A en el fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides y de la vía de señalización mejora nuestro conocimiento de la patogenia de la AR y nos ha permitido identificar a ROCK como una potencial diana terapéutica que podría mejorar el tratamiento de los pacientes con esta enfermedad.



**Figura 47.** Vías de señalización de WNT5A en los sinoviocitos reumatoides. Las moléculas participantes se muestran junto con el respectivo reactivo utilizado para demostrar su participación. Imagen de autoría propia creada con BioRender.com.



## **2. El inhibidor específico de ROCK, Y-27632, disminuye la severidad de la artritis en el modelo murino de artritis pasiva por transferencia de suero K/BxN**

Con el fin de mejorar el conocimiento del papel de ROCK en la artritis reumatoide, en este trabajo de tesis se analizó el efecto del inhibidor específico Y-2632 en el modelo murino de artritis por transferencia de suero K/BxN.

Nuestros resultados muestran que el inhibidor Y-27632 es un tratamiento efectivo en este modelo murino. Así, la inhibición de ROCK redujo la severidad de la artritis. Esta mejoría de la evolución clínica se acompañó de disminución de la inflamación sinovial, del daño del cartílago y de la erosión ósea. Estos resultados concuerdan con varios trabajos publicados previamente. El trabajo más reciente de Okamoto y col.<sup>231</sup> mostró que el tratamiento con Fasudil, un inhibidor no específico de ROCK, redujo la severidad de la artritis con disminución de la inflamación sinovial en ratas. Estos datos confirmaron, a su vez, un estudio más antiguo en el que ya se había mostrado la activación de la vía RhoA-ROCK en tejido sinovial de pacientes con AR y de ratas con artritis inducida por colágeno.<sup>232</sup> En este estudio, el tratamiento con Fasudil redujo también la severidad de la inflamación sinovial en ratas con artritis inducida por colágeno.<sup>232</sup>

Sin embargo, hay que señalar que en estos trabajos las ratas artríticas se trataron con Fasudil, un inhibidor con menor afinidad por ROCK que el inhibidor Y-27632 e inespecífico, ya que inhibe también otras quinasas como PRK2, MSK1 y MAPKAP-K1b. Por lo tanto, la mejoría de la artritis observada en estos trabajos no se podría atribuir a la inhibición exclusiva de ROCK. De este modo, nuestros resultados muestran, por primera vez, que la inhibición de ROCK reduce la severidad de la artritis en ratones.

Además, en nuestro trabajo observamos en el tejido articular de ratones tratados con Y-27632, una reducción de la expresión de los mediadores inflamatorios, Il1 $\beta$ , Il6, Cxcl1 y de las metaloproteasas, Mmp3, Mmp9 y Mmp13, así como una tendencia a la reducción de Tnfa y Nos2. Estos resultados indican la contribución de ROCK en la sinovitis y son consistentes con otros trabajos que han mostrado el papel de ROCK en la inflamación, en el contexto de la artritis y en otras patologías. Así, el trabajo de Okamoto y col.<sup>231</sup> mostró que la inhibición de ROCK redujo la producción de IL6, IL8 y GM-CSF en sinoviocitos de pacientes con AR. En la misma línea, en el estudio de Ha y col.<sup>232</sup>, la inhibición de ROCK *in vitro* disminuyó la producción de

TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 por PBMCs y FLS en pacientes con AR. Además, se ha descrito que la inhibición de ROCK también redujo la producción de Il17 e Il21 en células T de ratones con artritis espontánea.<sup>233</sup>

En otras patologías también se ha señalado la contribución de ROCK en la inflamación. Así, el trabajo de Wang y col.<sup>234</sup>, en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico, mostró que la expresión sérica de Il6, Il1 $\beta$  y Tnf $\alpha$  se redujo tras la inhibición de ROCK cuando se comparó con los controles no tratados. En el mismo sentido, en un estudio con fibroblastos gingivales de periodontitis, el inhibidor Y-27632 disminuyó la expresión de IL6 e IL8 inducida por LPS mediante el bloqueo de la vía NF-kB y de la MAPK p38.<sup>235</sup>

Otro hallazgo de gran relevancia en este trabajo de tesis es la marcada reducción de la erosión ósea que se observó en los ratones artríticos tratados con Y-27632 en comparación con los ratones del grupo control. Algunos trabajos previos ya han sugerido el papel de la vía de señalización RhoA-ROCK en la osteoclastogénesis. Así, se ha descrito el papel crítico de RhoA en la formación de fibras de actina, organización de podosomas (estructura de adhesión a la matriz), motilidad y capacidad de resorción ósea de los osteoclastos.<sup>236,237</sup>

La reducción del número de células multinucleadas TRAP positivas y de las áreas de resorción ósea que observamos en el estudio histológico fue debido a que la inhibición de ROCK redujo la diferenciación hacia osteoclastos, así como su capacidad funcional, como se observó en los experimentos *in vitro*.

Puesto que la inhibición de ROCK modula la diferenciación de los osteoclastos analizamos si este tratamiento podría afectar a los osteoblastos y su actividad, por su papel en el remodelado óseo. Sin embargo, los experimentos *in vitro* que se realizaron para analizar este aspecto mostraron que el tratamiento con el inhibidor de ROCK no afectó la osteoblastogénesis ni la capacidad de mineralización ósea. Por lo tanto, parece que la disminución de las erosiones óseas observadas en ratones artríticos tratados con Y-27632 se debe a la inhibición de la osteoclastogénesis en ausencia de un incremento de la capacidad de reparación ósea.

Sin embargo, nuestros resultados contrastan con el trabajo de Nakata y col.<sup>238</sup> en el que la inhibición de ROCK con Y-27632 y Fasudil incrementó el número de osteoclastos derivados de la línea celular RAW264.7 y de precursores de médula ósea murina. Además, ambos tratamientos activaron la diferenciación de células MC3T3-E1 hacia osteoblastos.<sup>238</sup>

Aunque no hay una explicación clara para entender estas diferencias, hay que señalar que las diferencias en las condiciones experimentales, en el uso de líneas celulares y, lo más importante, las diferencias en el estado inflamatorio de las células en ambos trabajos pueden ser determinantes. Es posible que, en un contexto inflamatorio como la artritis los inhibidores de ROCK reduzcan la osteoclastogénesis mientras que en ausencia de inflamación la favorezcan y potencien también la osteoblastogénesis. Aunque será necesario realizar nuevos experimentos para confirmar esta hipótesis, en la literatura se pueden encontrar estudios que muestran diferencias en los efectos de los tratamientos en función del contexto celular. Así, en un trabajo previo de nuestro grupo se observó que el tratamiento con el antagonista del receptor del ácido lisofosfatídico LPA1, Ki16425, no mejoró la pérdida ósea en un modelo murino de osteoporosis menopáusica.<sup>239</sup> Por el contrario, este tratamiento redujo la erosión ósea en un modelo de artritis murina<sup>240</sup> y redujo las metástasis óseas de cáncer de mama.<sup>241,242</sup>

En el mismo sentido, hay que señalar el trabajo de Simfia y col.<sup>243</sup> en el que estudiando los mecanismos de la osteoporosis postmenopáusica observaron que ROCK no reguló las respuestas mecanobiológicas de los osteocitos que impulsan la osteoclastogénesis en condiciones premenopáusicas, en presencia de estrógenos, pero si lo hizo en condiciones postmenopáusicas, cuando la concentración de estrógenos disminuyó. Por lo tanto, podemos especular que el efecto modulador de ROCK en el metabolismo óseo es dependiente del contexto celular.

Las erosiones óseas en la AR predicen un curso más severo de la enfermedad con un mayor grado de discapacidad e incremento de la mortalidad. Estudios radiográficos longitudinales han mostrado que las erosiones óseas surgen pronto en la patogenia de la AR, afectando aproximadamente a la mitad de los pacientes no tratados aproximadamente a los 6 meses del inicio de la enfermedad.<sup>84</sup> La pérdida ósea focal en la AR es mediada por osteoclastos localizados en la interfase pannus-hueso y en localizaciones subcondrales.<sup>244,245</sup> Estas erosiones son producidas por osteoclastos derivados de monocitos de la circulación que se infiltran en la membrana sinovial reumatoide.<sup>246</sup> Los resultados obtenidos en el modelo murino indican que la inhibición de ROCK puede ser un tratamiento prometedor para reducir la inflamación sinovial y el daño estructural.

Con el fin de analizar si el efecto de la inhibición de ROCK sobre la osteoclastogénesis observado en el modelo murino es extensible a la AR, se diferenciaron osteoclastos a partir de

PBMCs de pacientes con artritis inflamatoria que no habían recibido tratamiento con FAMES, en presencia o no del inhibidor Y-27632. Se eligió este tipo de pacientes para evitar la posible influencia de los fármacos modificadores de la enfermedad sobre la idiosincrasia de los precursores de osteoclastos en pacientes tratados.

Los resultados mostraron que el tratamiento en estos pacientes redujo drásticamente la diferenciación y capacidad osteolítica de los osteoclastos, confirmando los hallazgos del modelo murino. Por lo tanto, la inhibición de ROCK puede ser una buena estrategia terapéutica en el control del daño óseo. En la actualidad, el tratamiento más efectivo para la prevención y progresión de las erosiones óseas es el inicio precoz del tratamiento, con el fin de reducir la sinovitis. Se ha visto que un control incompleto de la sinovitis lleva a la progresión del daño estructural. Sin embargo, se ha observado que en algunos pacientes con AR de baja actividad e incluso en otros en remisión clínica, el daño óseo progresa, aunque reciban tratamiento.<sup>247-249</sup> Es posible que en este tipo de pacientes la presencia de sinovitis y osteítis residual permitan la actividad osteoclástica, No obstante, algunos autores consideran la posibilidad de que, en algunos pacientes, la inflamación y el daño estructural estén disociados y aunque la inflamación remita, la erosión continúe.

Por lo tanto, la inhibición de la vía de señalización WNT5A/Ryk/ROCK puede ser una estrategia terapéutica prometedora porque actúa sobre distintos aspectos de la patogenia de la AR que podría completar o sustituir los tratamientos actuales.



## **CONCLUSIONES**



1. WNT5A contribuye al fenotipo agresivo de los FLS en pacientes con AR promoviendo su capacidad de migración e invasión y la expresión de mediadores inflamatorios y metaloproteasas.
2. La vía específica activada por WNT5A en los sinoviocitos reumatoides requiere el receptor RYK.
3. La interacción WNT5A/RYK en sinoviocitos reumatoides activa las vías de señalización WNT/Ca<sup>2+</sup> y la rama de la vía PCP que involucra a ROCK.
4. En los sinoviocitos reumatoides, la señalización de la vía WNT5A/RYK conduce, a través de ROCK, a la activación de las MAP quinasa p38 y ERK y de la vía PI3K/AKT.
5. El inhibidor de ROCK reduce la severidad de la artritis en el modelo murino de artritis por transferencia de suero K/BxN.
6. La inhibición de ROCK disminuye la inflamación sinovial, el daño del cartílago y la erosión ósea.
7. El tratamiento de ratones artríticos con el inhibidor de ROCK, Y-27632, reduce la expresión en el tejido articular de mediadores inflamatorios, como Il1 $\beta$ , Il6, Cxcl1 y de las metaloproteasas, Mmp3, Mmp9 y Mmp13. Además, se observa una disminución no significativa de Tnf $\alpha$  y Nos2.
8. La inhibición de ROCK reduce la diferenciación hacia osteoclastos a partir de células de MO de ratones artríticos, así como su capacidad funcional.
9. El tratamiento con Y-27632 no afecta la osteoblastogénesis ni la mineralización ósea en ratones artríticos.
10. La inhibición de ROCK reduce la diferenciación y función de los osteoclastos derivados de PBMCs de pacientes con AR.





# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4:18002.
2. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023–38.
3. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423(6937):356–61.
4. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376(9746):1094–108.
5. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The prevalence of rheumatoid arthritis in Spain. *Rheumatology*. 2002;41:88–95.
6. Shelef MA. New Relationships for Old Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2019;71(9):1396–9.
7. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):30–7.
8. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: Predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(10):573–86.
9. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506(7488):376–81.
10. Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1976;57(5):1148–57.
11. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The Shared Epitope Hypothesis. *Arthritis Rheum*. 1987;30(11):1205–12.
12. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22(3):293–8.
13. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*.

2017;46(2):183–96.

14. Hall FC, Weeks DE, Camilleri JP, Williams LA, Amos N, Darke C, et al. Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis. *QJM - Mon J Assoc Physicians*. 1996;89(11):821–9.
15. Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LTH, Goronzy JJ, Petersson IF, et al. The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(6): R1386-93.
16. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology*. 2008;47(4):399–402.
17. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2009;4:417–34.
18. Tanaka Y. Rheumatoid arthritis. *Inflamm Regen*. 2020;40:20.
19. Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2004;75:330–7.
20. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet*. 2005;37(12):1317–9.
21. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus . *N Engl J Med*. 2007;357(10):977–86.
22. Zervou M, Sidiropoulos P, Petraki E, Vazgiourakis V, Krasoudaki E, Raptopoulou A, et al. Association of a TRAF1 and a SAT4 gene polymorphism with increased risk for rheumatoid arthritis in a genetically homogeneous population. *Hum Immunol*. 2008;69(9):567–71.
23. Ueda H, Howson JMM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al.

- Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003;423(6939):506–11.
24. Iwamoto T, Ikari K, Nakamura T, Kuwahara M, Toyama Y, Tomatsu T, et al. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Rheumatology*. 2006;45(7):804–7.
  25. Bottini N, Firestein GS. Epigenetics in rheumatoid arthritis: A primer for rheumatologists. *Curr Rheumatol Rep*. 2013;15(11).
  26. Trenkmann M, Brock M, Ospelt C, Gay S. Epigenetics in Rheumatoid Arthritis. *Clin Rev allergy Immunol*. 2010;39(1):10–9.
  27. Klein K, Ospelt C, Gay S. Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):227.
  28. Klein K, Gay S. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27(1):76–82.
  29. Liu Y, Aryee MJ, Padyukov L, Fallin MD, Runarsson A, Reinius L, et al. Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat biotechnol*. 2013;31(2):142–7.
  30. Ospelt C, Gay S, Klein K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):409–19.
  31. Whitaker JW, Shoemaker R, Boyle DL, Hillman J, Anderson D, Wang W, et al. An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype. *Genome Med*. 2013;5(4):40.
  32. Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(1):110–7.
  33. Karami J, Aslani S, Tahmasebi MN, Mousavi MJ, Sharafat Vaziri A, Jamshidi A, et al. Epigenetics in rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes as an emerging paradigm in the pathogenesis of the disease. *Immunol Cell Biol*. 2020;98(3):171–86.
  34. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.

35. Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(11):1008–16.
36. Hawtree S, Muthana M, Wilson AG. The role of histone deacetylases in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(3):783–8.
37. Baxter D, McInnes IB, Kurowska-Stolarska M. Novel regulatory mechanisms in inflammatory arthritis: A role for microRNA. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(3):288–92.
38. Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Yeates D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception.* 1987;35(5):457–64.
39. Källberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Rönnelid J, Klareskog L, et al. Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: Estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):508–11.
40. Karlson EW, Chang SC, Cui J, Chibnik LB, Fraser PA, De Vivo I, et al. Gene-environment interaction between HLA-DRB1 shared epitope and heavy cigarette smoking in predicting incident rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):54–60.
41. Lee HS, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, et al. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: A mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum.* 2007;56(6):1745–53.
42. Padyukov L, Suva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(10):3085–92.
43. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJW, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(10):1488–92.
44. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):38–46.

- 
45. Bongartz T, Cantaert T, Atkins SR, Harle P, Myers JL, Turesson C, et al. Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2007;46(1):70–5.
  46. Lugli EB, Correia RESM, Fischer R, Lundberg K, Bracke KR, Montgomery AB, et al. Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):9.
  47. Wilson TM, Trent B, Kuhn KA, Demoruelle MK. Microbial Influences of Mucosal Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2020;22(11):83.
  48. Eriksson K, Fei G, Lundmark A, Benchimol D, Lee L, Hu YOO, et al. Periodontal Health and Oral Microbiota in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med*. 2019;8(5):630.
  49. Vural M, Gilbert B, Üstün I, Caglar S, Finckh A. Mini-Review: Human Microbiome and Rheumatic Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:491160.
  50. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(12):727–30.
  51. Scher JU, Szczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 2013;2:e01202.
  52. Stolt P, Yahya A, Bengtsson C, Källberg H, Rönnelid J, Lundberg I, et al. Silica exposure among male current smokers is associated with a high risk of developing ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(6):1072–6.
  53. Salliot C, Nguyen Y, Boutron-Ruault M-C, Seror R. Environment and Lifestyle: Their Influence on the Risk of RA. *J Clin Med*. 2020;9(10):3109.
  54. Gerlag DM, Raza K, Baarsen LGM Van, Brouwer E, Buckley CD, Burmester GR, et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis : report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:638–41.

55. Martins P, Fonseca JE. How to investigate: Pre-clinical rheumatoid arthritis. *Best Pr Res Clin Rheumatol.* 2019;33(4):101438.
56. Doyle HA, Mamula MJ. Autoantigenesis: the evolution of protein modifications in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(1):112–8.
57. de Brito Rocha S, Baldo DC, Andrade LEC. Clinical and pathophysiologic relevance of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol.* 2019;59(1):2.
58. Nielen MMJ, Schaardenburg D Van, Reesink HW, Stadt RJ Van De, Horst-bruinsma IE Van Der, Koning MHMT De, et al. Specific Autoantibodies Precede the Symptoms of Rheumatoid Arthritis: A Study of Serial Measurements in Blood Donors. *Arthritis Rheumatol.* 2004;50(2):380–6.
59. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: From triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(1):60–75.
60. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010;233(1):233–55.
61. D. Smith M. The Normal Synovium. *Open Rheumatol J.* 2011;5(1):100–6.
62. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365:2205–19.
63. Khandpur R, Carmona-rivera C, Vivekanandan-giri A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2013;5(178):178ra40.
64. Szekanecz Z, Koch AE. Vasculogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):110–1.
65. Mousaad Eleman N, Hannawi S, Maghazachi AA. Role of chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Immunotargets Ther.* 2020;9(9):43–56.
66. Choy E. Understanding the dynamics: Pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol (Oxford).* 2012;51(SUPPL.5):3–11.

67. Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2016;455:161–71.
68. Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Aizaki Y, Tanaka S, Sekikawa M, et al. Characterization and Function of Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin-6-Induced Osteoclasts in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2021;Epub ahead.
69. O' Gradaigh D, Ireland D, Bord S, Compston JE. Joint erosion in rheumatoid arthritis: Interactions between tumour necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) regulate osteoclasts. *Ann Rheum Dis*. 2004;63(4):354–9.
70. Brzustewicz E, Bryl E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis - Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. *Cytokine*. 2015;76(2):527–36.
71. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205–19.
72. Hernández-Flórez D, Valor L. IL-6: su papel en la patogenia de la artritis reumatoide. Consecuencias clínicas. *Reumatol Clínica*. 2018;14(Supl.2):7–10.
73. Miyabe Y, Miyabe C, Iwai Y, Luster AD. Targeting the Chemokine System in Rheumatoid Arthritis and Vasculitis. *JMA J*. 2020;3(3):182–92.
74. Rump L, Matthey DL, Kehoe O MJ. An initial investigation into endothelial CC chemokine expression in the human rheumatoid synovium. *Cytokine*. 2017;97:133–40.
75. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: a passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(1):24–33.
76. Xue M, McKelvey K, Shen K, Minhas N, March L, Park SY, et al. Endogenous MMP-9 and not MMP-2 promotes rheumatoid synovial fibroblast survival, inflammation and cartilage degradation. *Rheumatology*. 2014;53(12):2270–9.
77. Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R. The Role of Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 in Antibody-Induced Arthritis. *J*

- Immunol. 2002;169(5):2643–7.
78. Vyas SP, Hansda AK, Goswami R. Rheumatoid arthritis: ‘melting pot’ of T helper subsets. *Int Rev Immunol.* 2019;38(5):212–31.
  79. Chen Z, Bozec A, Ramming A, Schett G. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(1):9–17.
  80. O’Neil LJ, Kaplan MJ. Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance and Fueling Disease. *Trends Mol Med.* 2019;25(3):215–27.
  81. Cecchi I, Arias de la Rosa I, Menegatti E, Roccatello D, Collantes-Estevez E, Lopez-Pedraza C, et al. Neutrophils: Novel key players in Rheumatoid Arthritis. Current and future therapeutic targets. *Autoimmun Rev.* 2018;17(11):1138–49.
  82. Siouti E, Andreakos E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys.* 2019;165:152–69.
  83. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:1–13.
  84. Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: Mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(11):656–64.
  85. Arboleya L, Castañeda S. Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso. *Rev Osteoporos y Metab Miner.* 2014;6(4):109–21.
  86. Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y. Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med.* 2013;91(1):15–23.
  87. Panagopoulos PK, Lambrou GI. Bone erosions in rheumatoid arthritis: recent developments in pathogenesis and therapeutic implications. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2018;18(3):304–19.
  88. Boyle W, Simonet W, Lacey D. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337–42.
  89. Masoumi M, Bashiri H, Khorramdelazad H, Barzaman K, Hashemi N, Sereshki HA, et

- al. Destructive Roles of Fibroblast-like Synoviocytes in Chronic Inflammation and Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. 2021;44(2):466–79.
90. Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: Key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2006;45(6):669–75.
91. Korb-Pap A, Bertrand J, Sherwood J, Pap T. Stable activation of fibroblasts in rheumatic arthritis-causes and consequences. *Rheumatology*. 2016;55:ii64–7.
92. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: A key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*. 2005;115(2):118–28.
93. Pap T, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000;2(5):361–7.
94. Hardy R, Juarez M, Naylor A, Tu J, Rabbitt EH, Filer A, et al. Synovial DKK1 expression is regulated by local glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R226.
95. Massalska M, Maslinski W, Ciecchomska M. Small Molecule Inhibitors in the Treatment of Rheumatoid Arthritis and Beyond: Latest Updates and Potential Strategy for Fighting COVID-19. *Cells*. 2020;9(8):1876–97.
96. Harrington R, Al Nokhatha SA, Conway R. Jak inhibitors in rheumatoid arthritis: An evidence-based review on the emerging clinical data. *J Inflamm Res*. 2020;13:519–31.
97. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology*. 2008;47(4):409–14.
98. Schett G, Zweina J and Firestein G. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(7):909–16.
99. David JP, Sabapathy K, Hoffman O, Idarraga MH, Wagner EF. JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci*. 2002;115(22):4317–25.
100. Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, et al. c-Jun N-terminal kinase

- is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 2001;108(1):73–81.
101. Marone R, Cmiljanovic V, Giese B, Wymann MP. Targeting phosphoinositide 3-kinase- Moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2008;1784(1):159–85.
  102. Camps M, Rückle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, et al. Blockade of PI3K $\gamma$  suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med.* 2005;11(9):936–43.
  103. Tak P, Gerlag DM, Aupperle KR, van de Geest DA, Overbeek M, Bennett BL, et al. Inhibitor of nuclear factor kB kinase  $\beta$  is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1897–907.
  104. Ciobanu D, Poenariu I, Crînguș L-I, Vreju F, Turcu-Stiolica A, Tica A, et al. JAK/STAT pathway in pathology of rheumatoid arthritis (Review). *Exp Ther Med.* 2020;20(4):3498–503.
  105. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(3):315–24.
  106. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2001;358:903–11.
  107. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569–81.
  108. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(6):S685–99.
  109. Nell VPK, Machold KP, Eberl G, Stamm TA, Uffmann M, Smolen JS. Benefit of very early referral and very early therapy with disease-modifying anti-rheumatic drugs in

- patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004;43(7):906–14.
110. Korpela M, Laasonen L, Hannonen P, Kautiainen H, Leirisalo-Repo M, Hakala M, et al. Retardation of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis by initial aggressive treatment with disease-modifying antirheumatic drugs: Five-year experience from the FIN-RACo study. *Arthritis Rheum*. 2004;50(7):2072–81.
  111. Raza K, Filer A. The therapeutic window of opportunity in rheumatoid arthritis: Does it ever close? *Ann Rheum Dis*. 2015;74(5):793–4.
  112. Van Nies JAB, Tsonaka R, Gaujoux-Viala C, Fautrel B, Van Der Helm-Van Mil AHM. Evaluating relationships between symptom duration and persistence of rheumatoid arthritis: Does a window of opportunity exist? Results on the Leiden Early Arthritis Clinic and ESPOIR cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(5):806–12.
  113. Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2018;320(13):1360–72.
  114. Nakayamada S, Kubo S, Iwata S, Tanaka Y. Recent Progress in JAK Inhibitors for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *BioDrugs*. 2016;30(5):407–19.
  115. Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2016;68(1):1–25.
  116. Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: Strategies, opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(5):276–89.
  117. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68–75.
  118. Kumawat K, Gosens R. WNT-5A: Signaling and functions in health and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(3):567–87.
  119. Ochoa-Hernández AB, Juárez-Vázquez CI, Rosales-Reynoso MA, Barros-Núñez P. La vía de señalización Wnt- $\beta$ -catenina y su relación con cáncer. Vol. 80, *Cirugía y Cirujanos*. 2012. p. 389–98.

120. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 2001;3(1):reviews3001.1-3001.15.
121. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: Processing, secretion and reception. *Oncogene.* 2006;25(57):7461–8.
122. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature.* 2003;423(6938):448–52.
123. Ching W, Nusse R. A Dedicated Wnt Secretion Factor. *Cell.* 2006;125(3):432–3.
124. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation. 1st ed. Vol. 291, *International Review of Cell and Molecular Biology.* Elsevier Inc.; 2011. 21–71 p.
125. Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012;149(6):1192–205.
126. Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, Kikuchi A. Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem J.* 2007;402(3):515–23.
127. Bauer M, Bénard J, Gaasterland T, Willert K, Cappellen D. WNT5A encodes two isoforms with distinct functions in cancers. *PLoS One.* 2013;8(11):1–14.
128. Schulte G. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):632–67.
129. Huang H, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* 2004;5(7):234.
130. Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, Sharma D, Nathans J, Leahy DJ. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature.* 2001;412(6842):86–90.
131. Umbhauer M, Djiane A, Goisset C, Penzo-Méndez A, Riou J-F, Boucaut J-C, et al. The C-terminal cytoplasmic Lys-Thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *EMBO J.* 2000;19(18):4944–54.

132. Wang HY, Liu T, Malbon CC. Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal*. 2006;18(7):934–41.
133. Dijksterhuis JP, Petersen J, Schulte G. WNT/Frizzled signalling: Receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *Br J Pharmacol*. 2014;171(5):1195–209.
134. Bradshaw RA, Chalkley RJ, Biarc J, Burlingame AL. Receptor tyrosine kinase signaling mechanisms: devolving TrkA responses with phosphoproteomics. *Adv Biol Regul*. 2013;53(1):87–96.
135. Roy JP, Halford MM, Stacker SA. The biochemistry, signalling and disease relevance of RYK and other WNT-binding receptor tyrosine kinases. *Growth Factors*. 2018;36(1–2):15–40.
136. Forrester WC. The Ror receptor tyrosine kinase family. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(1):83–96.
137. Liu Y, Rubin B, Bodine PVN, Billiard J. Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *J Cell Biochem*. 2008;105(2):497–502.
138. Fradkin LG, Dura JM, Noordermeer JN. Ryks: new partners for Wnts in the developing and regenerating nervous system. *Trends Neurosci*. 2010;33(2):84–92.
139. Green J, Nusse R, van Amerongen R. The role of Ryk and Ror receptor tyrosine kinases in wnt signal transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(2):a009175.
140. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res*. 2005;15(1):28–32.
141. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781–810.
142. Blagodatski A, Klimenko A, Jia L, Katanaev VL. Small Molecule Wnt Pathway Modulators from Natural Sources: History, State of the Art and Perspectives. *Cells*. 2020;9(3):589.
143. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits  $\beta$ -catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*. 2006;4(4):570–82.

144. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. Vol. 17, *Developmental Cell*. 2009. p. 9–26.
145. Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017;169(6):985–99.
146. Hendrickx M, Leyns L. Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. *Dev Growth Differ*. 2008;50(4):229–43.
147. Miao CG, Yang YY, He X, Li XF, Huang C, Huang Y, et al. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal*. 2013;25(10):2069–78.
148. Semenov M V., Habas R, MacDonald BT, He X. SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell*. 2007;131(7):1378.e1-1378.e2.
149. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. Wnt5a: Its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol*. 2012;204(1):17–33.
150. Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: An enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*. 2005;132(20):4421–36.
151. Habas R, Kato Y, He X. Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel formin homology protein Daam1. *Cell*. 2001;107(7):843–54.
152. Marlow F, Topczewski J, Sepich D, Solnica-Krezel L. Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol*. 2002;12(11):876–84.
153. Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation and functions. *Small GTPases*. 2014;5:e29846.
154. Pernis AB, Ricker E, Weng CH, Roza C, Yi W. Rho kinases in autoimmune diseases. *Annu Rev Med*. 2016;67:355–74.
155. Tönges L, Koch J-C, Bähr M, Lingor P. ROCKing regeneration: Rho kinase inhibition as molecular target for neurorestoration. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:39.

156. Chae WJ, Bothwell ALM. Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling in Immune Cells. *Trends Immunol.* 2018;39(10):830–47.
157. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature.* 1997;390(6658):410–3.
158. Chae WJ, Bothwell ALM. Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling in Immune Cells. *Trends Immunol.* 2018;39(10):830–47.
159. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium.* 2005;38(3–4):439–46.
160. Endo M, Nishita M, Fujii M, Minami Y. Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells.pdf. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015;314:117–48.
161. Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development.* 1999;126(6):1211–23.
162. Clark CEJ, Nourse CC, Cooper HM. The tangled web of non-canonical wnt signalling in neural migration. *NeuroSignals.* 2012;20(3):202–20.
163. Matsumoto S, Fumoto K, Okamoto T, Kaibuchi K, Kikuchi A. Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. *EMBO J.* 2010;29(7):1192–204.
164. Kawasaki A, Torii K, Yamashita Y, Nishizawa K, Kanekura K, Katada M, et al. Wnt5a promotes adhesion of human dermal fibroblasts by triggering a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signal. *Cell Signal.* 2007;19(12):2498–506.
165. Nishita M, Sa KY, Nomachi A, Kani S, Sougawa N, Ohta Y, et al. Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *J Cell Biol.* 2006;175(4):555–62.
166. Ishida-Takagishi M, Enomoto A, Asai N, Ushida K, Watanabe T, Hashimoto T, et al. The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway

- and cell motility. *Nat Commun.* 2012;3:859.
167. Zhu Y, Tian Y, Du J, Hu Z, Yang L, Liu J, et al. Dvl2-dependent activation of Daam1 and RhoA regulates Wnt5a-induced breast cancer cell migration. *PLoS One.* 2012;7(5):e37823.
168. Liu J, Zhang Y, Xu R, Du J, Hu Z, Yang L, et al. PI3KAkt-dependent phosphorylation of GSK3 $\beta$  and activation of RhoA regulate wnt5a-induced gastric cancer cell migration. *Cell Signal.* 2013;25(2):447–56.
169. Grossmann AH, Yoo JH, Clancy J, Sorensen LK, Sedgwick A, Tong Z, et al. The small GTPase ARF6 stimulates  $\beta$ -catenin transcriptional activity during WNT5A-mediated melanoma invasion and metastasis. Vol. 6, *Science Signaling.* 2013. p. ra14.
170. Qin L, Yin YT, Zheng FJ, Peng LX, Yang CF, Bao YN, et al. WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget.* 2015;6(12):10239–52.
171. Henry C, Llamosas E, Knipprath-Meszáros A, Schoetzau A, Obermann E, Fuenfschilling M, et al. Targeting the ROR1 and ROR2 receptors in epithelial ovarian cancer inhibits cell migration and invasion. *Oncotarget.* 2015;6(37):40310–26.
172. Morioka K, Tanikawa C, Ochi K, Daigo Y, Katagiri T, Kawano H, et al. Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Sci.* 2009;100(7):1227–33.
173. Cheng C wen, Yeh J ching, Fan TP, Smith SK, Charnock-Jones DS. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;365(2):285–90.
174. Enomoto M, Hayakawa S, Itsukushima S, Ren DY, Matsuo M, Tamada K, et al. Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. *Oncogene.* 2009;28(36):3197–208.
175. Habu M, Koyama H, Kishida M, Kamino M, Iijima M, Fuchigami T, et al. Ryk is essential for Wnt-5a-dependent invasiveness in human glioma. *J Biochem.* 2014;156(1):29–38.

- 
176. Kremenevskaja N, Von Wasielewski R, Rao AS, Schöfl C, Andersson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma. *Oncogene*. 2005;24(13):2144–54.
177. Dejmek J, Dejmek A, Säfholm A, Sjölander A, Andersson T. Wnt-5a protein expression in primary Dukes B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. *Cancer Res*. 2005;65(20):9142–6.
178. Bhatt PM, Malgor R. Wnt5a: a player in the pathogenesis of atherosclerosis and other inflammatory disorders. *Atherosclerosis*. 2014;237(1):155–62.
179. Halleskog C, Dijksterhuis JP, Kilander MBC, Becerril-Ortega J, Villaescusa JC, Lindgren E, et al. Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. *J Neuroinflammation*. 2012;39(9):111–26.
180. Kim J, Kim J, Kim DW, Ha Y, Ihm MH, Kim H, et al. Wnt5a Induces Endothelial Inflammation via  $\beta$ -Catenin-Independent Signaling. *J Immunol*. 2010;185(2):1274–82.
181. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Pérez-Hernández AI, Gurbindo J, Ramírez B, et al. Activation of noncanonical wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(8):1407–17.
182. Maekawa T, Kulwattanaporn P, Hosur K, Domon H, Oda M, Terao Y, et al. Differential Expression and Roles of Secreted Frizzled-Related Protein 5 and the Wingless Homolog Wnt5a in Periodontitis. *J Dent Res*. 2017;96(5):571–7.
183. Jung YS, Lee HY, Kim SD, Park JS, Kim JK, Suh PG, et al. Wnt5a stimulates chemotactic migration and chemokine production in human neutrophils. *Exp Mol Med*. 2013;45(6):e27.
184. Pashirzad M, Shafiee M, Rahmani F, Behnam-Rassouli R, Hoseinkhani F, Ryzhikov M, et al. Role of Wnt5a in the Pathogenesis of Inflammatory Diseases. *J Cell Physiol*. 2017;232(7):1611–6.
185. Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA. Expression

- and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *PNAS*. 2000;97(6):2791–6.
186. Sen M, Chamorro M, Reifert J, Corr M, Carson DA. Blockade of Wnt-5A/Frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum*. 2001;44(4):772–81.
187. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, et al. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med*. 2012;18(3):405–12.
188. MacLauchlan S, Zuriaga MA, Fuster JJ, Cuda CM, Jonason J, Behzadi F, et al. Genetic deficiency of Wnt5a diminishes disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):166.
189. Ocampo J, Vásquez B, Sandoval C, Navarrete J, Haidar ZS, Olate S. Características Morfofocuantitativas de la Glándula Submandibular de Ratón (*Mus musculus*). *Int J Morphol*. 2020;38(3):570–7.
190. Kouskoff V, Korganow A-S, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D, et al. Organ-Specific Disease Provoked by systemic autoimmunity. *Cell*. 1996;87(5):811–22.
191. Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf G, Shen Z, Wu R, et al. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest*. 2015;126(2):585–98.
192. Asem MS, Buechler S, Wates RB, Miller DL, Stack MS. Wnt5a signaling in cancer. *Cancers (Basel)*. 2016;8(9):79–97.
193. Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO, Schoedon G. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):504–10.
194. Naskar D, Maiti G, Chakraborty A, Roy A, Chattopadhyay D, Sen M. Wnt5a–Rac1–NF- $\kappa$ B Homeostatic Circuitry Sustains Innate Immune Functions in Macrophages. *J Immunol*. 2014;192(9):4386–97.

- 
195. Edris B, Espinosa I, Mühlenberg T, Mikels A, Lee CH, Steigen SE, et al. ROR2 is a novel prognostic biomarker and a potential therapeutic target in leiomyosarcoma and gastrointestinal stromal tumour. *J Pathol.* 2012;227(2):223–33.
  196. Bayerlová M, Menck K, Klemm F, Wolff A, Pukrop T, Binder C, et al. Ror2 signaling and its relevance in breast cancer progression. *Front Oncol.* 2017;7:135.
  197. Henry CE, Llamosas E, Djordjevic A, Hacker NF, Ford CE. Migration and invasion is inhibited by silencing ROR1 and ROR2 in chemoresistant ovarian cancer. *Oncogenesis.* 2016;5(5):e226.
  198. Liu F, Feng XX, Zhu SL, Huang HY, Chen Y Di, Pan YF, et al. Sonic Hedgehog Signaling Pathway Mediates Proliferation and Migration of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis via MAPK/ERK Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2018;9:2847.
  199. Volin M V., Huynh N, Klosowska K, Chong KK, Woods JM. Fractalkine is a novel chemoattractant for rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte signaling through MAP kinases and Akt. *Arthritis Rheum.* 2007;56(8):2512–22.
  200. Ha YS, Kim YY, Yu NH, Chun SY, Choi SH, Lee JN, et al. Down-regulation of transient receptor potential melastatin member 7 prevents migration and invasion of renal cell carcinoma cells via inactivation of the Src and Akt pathway. *Investig Clin Urol.* 2018;59(4):263–73.
  201. Noss EH, Brenner MB. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2008;223(1):252–70.
  202. Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H, Matsumoto S, Ohdan H, Sato A, et al. An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(2):298–307.
  203. Kaucká M, Plevová K, Pavlová Š, Janovská P, Mishra A, Verner J, et al. The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of b-lymphocyte migration. *Cancer Res.* 2013;73(5):1491–501.

204. Dissanayake SK, Olkhanud PB, Connell MPO, Carter A, French AD, Camilli TC, et al. Wnt5A Regulates Expression of Tumor Associated Antigens in Melanoma Via Changes in STAT3 Phosphorylation. *Cancer Res.* 2009;68(24):10205–14.
205. Dai B, Shen Y, Yan T, Zhang A. Wnt5a/ROR1 activates DAAM1 and promotes the migration in osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2020;43(2):601–8.
206. Khaja AS, Helczynski L, Edsjö A, Ehrnström R, Lindgren A, Ulmert D, et al. Elevated level of wnt5a protein in localized prostate cancer tissue is associated with better outcome. *PLoS One.* 2011;6(10):e26539.
207. Khaja ASS, Egevad L, Helczynski L, Wiklund P, Andersson T, Bjartell A. Emphasizing the role of Wnt5a protein expression to predict favorable outcome after radical prostatectomy in patients with low-grade prostate cancer. *Cancer Med.* 2012;1(1):96–104.
208. Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(9):1–13.
209. Ai R, Laragione T, Hammaker D, Boyle DL, Wildberg A, Maeshima K, et al. Comprehensive epigenetic landscape of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Nat Commun.* 2018;9(1):1921.
210. Devauchelle V, Marion S, Cagnard N, Mistou S, Falgarone G, Breban M, et al. DNA microarray allows molecular profiling of rheumatoid arthritis and identification of pathophysiological targets. *Genes Immun.* 2004;5(8):597–608.
211. Bartok B, Hammaker D, Firestein GS. Phosphoinositide 3-Kinase  $\delta$  Regulates Migration and Invasion of Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol.* 2014;192(5):2063–70.
212. García-Vicuña R, Gómez-Gavero MV, Domínguez-Luis MJ, Pec MK, González-Alvaro I, Alvaro-Gracia JM, et al. CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3866–77.
213. Li G, Zhang Y, Qian Y, Zhang H, Guo S, Sunagawa M, et al. Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing

- MMP2 and MMP9 expression through NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  pathway. *Mol Immunol.* 2013;53(3):227–36.
214. Tong B, Wan B, Wei Z, Wang T, Zhao P, Dou Y, et al. Role of cathepsin B in regulating migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes into inflamed tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2014;177(3):586–97.
215. Hasan MK, Ghia EM, Rassenti LZ, Widhopf GF, Kipps TJ. Wnt5a enhances proliferation of chronic lymphocytic leukemia and ERK1/2 phosphorylation via a ROR1/DOCK2-dependent mechanism. *Leukemia.* 2020;Epub ahead of print.
216. Ge X, Shi R, Ma X. The secreted protein WNT5A regulates condylar chondrocyte proliferation, hypertrophy and migration. *Arch Oral Biol.* 2017;82:171–9.
217. Sen M, Chamorro M, Reifert J, Corr M, Carson DA. Blockade of Wnt-5A/Frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum.* 2001;44(4):772–81.
218. Moadab F, Khorramdelazad H, Abbasifard M. Role of CCL2/CCR2 axis in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: Latest evidence and therapeutic approaches. *Life Sci.* 2021;269(119034).
219. Huang G, Chubinskaya S, Liao W, Loeser R. Wnt5a induces catabolic signaling and matrix metalloproteinase production in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartil.* 2017;25(9):1505–15.
220. Hong J-S, Greenlee KJ, Pitchumani R, Lee S-H, Song L, Shan M, et al. Dual protective mechanisms of matrix metalloproteinases 2 and 9 in immune defense against *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2011;186(11):6427–36.
221. Ren D, Minami Y, Nishita M. Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genes to Cells.* 2011;16(3):304–15.
222. Sakamoto T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, et al. Critical roles of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma and production of matrix metalloproteinase-2 via  $\Delta$ Np63 $\beta$ -mediated epithelial-

- mesenchymal transition. *Oral Oncol.* 2017;69(2017):15–25.
223. Cao Y, Wang X, Xu C, Gao Z, Zhou H, Wang Y, et al. 4-HPR impairs bladder cancer cell migration and invasion by interfering with the Wnt5a/JNK and Wnt5a/MMP-2 signaling pathways. *Oncol Lett.* 2016;12(3):1833–9.
224. Halford M, Macheda M, Stacker S. The RYK Receptor Family. In: Wheeler D, Yarden Y, editors. *Receptor Tyrosine Kinases: Family and subfamilies.* Totowa, NJ USA: Human Press; 2015. p. 699–755.
225. Skaria T, Bachli E, Schoedon G. Wnt5A/Ryk signaling critically affects barrier function in human vascular endothelial cells. *Cell Adhes Migr.* 2017;11(1):24–38.
226. Povinelli BJ, Nemeth MJ. Wnt5a Regulates Hematopoietic Stem Cell Proliferation and Repopulation Through the Ryk Receptor. *Stem Cells.* 2014;32(1):105–15.
227. Anastas JN, Kulikauskas RM, Tamir T, Rizos H, Long G V., Von Euw EM, et al. WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *J Clin Invest.* 2014;124(7):2877–90.
228. Foulquier S, Daskalopoulos EP, Lluri G, Hermans KCM, Deb A, Blankesteyn WM. WNT signaling in cardiac and vascular disease. *Pharmacol Rev.* 2018;70(1):68–141.
229. Wang Y, Chang H, Rattner A, Nathans J. Frizzled receptors in development and disease. *Curr Top Dev Biol.* 2016;117:113–39.
230. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac Take Center Stage. *Cell.* 2004;116(2):167–79.
231. Okamoto H, Yoshio T, Kaneko H, Yamanaka H. Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling by fasudil as a potential therapeutic strategy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):82–92.
232. He Y, Xu H, Liang L, Zhan Z, Yang X, Yu X, et al. Antiinflammatory effect of Rho kinase blockade via inhibition of NF- $\kappa$ B activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(11):3366–76.
233. Biswas PS, Gupta S, Chang E, Song L, Stirzaker RA, Liao JK, et al. Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of

- autoimmunity in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3280–95.
234. Wang Y, Lu Y, Chai J, Sun M, Hu X, He W, et al. Y-27632, a Rho-associated protein kinase inhibitor, inhibits systemic lupus erythematosus. *Biomed Pharmacother*. 2017;88(2017):359–66.
235. Kang W, Shang L, Wang T, Liu H, Ge S. Rho-kinase inhibitor Y-27632 downregulates LPS-induced IL-6 and IL-8 production via blocking p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in human gingival fibroblasts. *J Periodontol*. 2018;89(7):883–93.
236. Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, McAllister S, Alvarez U, Wang D, et al. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem*. 2000;275(16):11993–2002.
237. Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A. Rho GTPases in osteoclasts: Orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol*. 2008;87(8–9):469–77.
238. Nakata J, Akiba Y, Nihara J, Thant L, Eguchi K, Kato H, et al. ROCK inhibitors enhance bone healing by promoting osteoclastic and osteoblastic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;526(3):547–52.
239. Orosa B, Martínez P, González A, Guede D, Caeiro JR, Gómez-Reino JJ, et al. Effect of lysophosphatidic acid receptor inhibition on bone changes in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*. 2015;33(4):383–91.
240. Orosa B, García S, Martínez P, González A, Gómez-Reino JJ, Conde C. Lysophosphatidic acid receptor inhibition as a new multipronged treatment for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):298–305.
241. Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clézardin P, Peyruchaud O. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(25):9643–8.
242. Boucharaba A, Serre CM, Grès S, Saulnier-Blache JS, Bordet JC, Guglielmi J, et al. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1714–25.

243. Simfia I, Schiavi J, McNamara LM. Alterations in osteocyte mediated osteoclastogenesis during estrogen deficiency and under ROCK-II inhibition: An in vitro study using a novel postmenopausal multicellular niche model. *Exp Cell Res.* 2020;392(1):112005.
244. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.* 2000;43(2):250–8.
245. McGonagle D, Tan AL, Døhn UM, Østergaard M, Benjamin M. Microanatomic studies to define predictive factors for the topography of Periarticular erosion formation in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1042–51.
246. Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, Matsuura Y, Matsui T, Simmons S, et al. Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. *Nat Immunol.* 2019;20(12):1631–43.
247. Cohen G, Gossec L, Dougados M, Cantagrel A, Goupille P, Daures JP, et al. Radiological damage in patients with rheumatoid arthritis on sustained remission. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(3):358–63.
248. Molenaar ETH, Voskuyl AE, Dinant HJ, Bezemer PD, Boers M, Dijkmans BAC. Progression of Radiologic Damage in Patients with Rheumatoid Arthritis in Clinical Remission. *Arthritis Rheum.* 2004;50(1):36–42.
249. Brown AK, Conaghan PG, Karim Z, Quinn MA, Ikeda K, Peterfy CG, et al. An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(10):2958–67.



## **ANEXOS**



1. **ANEXO 1.** Rodriguez-Trillo A, Mosquera N, Pena C, Rivas-Tobío F, Mera-Varela A, Gonzalez A, Conde C. Non-Canonical WNT5A Signaling Through RYK Contributes to Aggressive Phenotype of the Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes. *Front Immunol.* 2020;11: 555245. doi: 10.3389/fimmu.2020.555245. Factor de impacto: 5,085. Posición de la publicación en la categoría (Inmunología): 39/159 (1<sup>er</sup> cuartil).
2. **ANEXO 2.** Copia del dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo. Código de registro 2017/521.
3. **ANEXO 3.** Copia de la autorización de proyecto de experimentación animal. Número de autorización 15014/14/004.
4. **ANEXO 4.** Copia de la autorización de proyecto de experimentación animal. Número de autorización 15012/2020/009.
5. **ANEXO 5.** Copia del certificado de la capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.



# Non-Canonical WNT5A Signaling Through RYK Contributes to Aggressive Phenotype of the Rheumatoid Fibroblast-Like Synoviocytes

Angela Rodriguez-Trillo<sup>1</sup>, Nerea Mosquera<sup>1</sup>, Carmen Pena<sup>1</sup>, Fatima Rivas-Tobío<sup>2</sup>, Antonio Mera-Varela<sup>3</sup>, Antonio Gonzalez<sup>1</sup> and Carmen Conde<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Attila Mócsai,  
Semmelweis University, Hungary

### Reviewed by:

Chie Miyabe,  
Tohoku Medical and Pharmaceutical  
University, Japan

Hanshi Xu,  
First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen  
University, China  
Maripat Corr,  
University of California, San Diego,  
United States

### \*Correspondence:

Carmen Conde  
carmen.conde.muro@sergas.es

### Specialty section:

This article was submitted  
Autoimmune and  
Autoinflammatory Disorders,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 24 April 2020

**Accepted:** 29 September 2020

**Published:** 15 October 2020

### Citation:

Rodriguez-Trillo A, Mosquera N,  
Pena C, Rivas-Tobío F, Mera-Varela A,  
Gonzalez A and Conde C (2020) Non-  
Canonical WNT5A Signaling Through  
RYK Contributes to Aggressive  
Phenotype of the Rheumatoid  
Fibroblast-Like Synoviocytes.  
*Front. Immunol.* 11:555245.  
doi: 10.3389/fimmu.2020.555245

<sup>1</sup> Laboratorio de Reumatología Experimental y Observacional, y Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), Servizo Galego de Saude (SERGAS), Santiago de Compostela, Spain, <sup>2</sup> Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Hospital Virxe da Xunqueira, A Coruña, Spain, <sup>3</sup> Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), Servizo Galego de Saude (SERGAS), Santiago de Compostela, Spain

We hypothesized that WNT5A could contribute to the enhanced migration and invasiveness of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes (RA FLS), which is one of the incompletely understood aspects of the RA FLS aggressive phenotype. This hypothesis is based on the previous evidence of a WNT5A role in both, RA and cell migration. Migration and invasion of RA FLS were assessed after incubation with recombinant Wnt5a (rWnt5a) or silencing of the endogenous WNT5A expression. The expression of WNT5A, WNT receptors, cytokines, chemokines, and metalloproteinases was quantified with RT-PCR. The WNT pathway was explored with gene silencing, antibody and pharmacological inhibition followed by migration assays and phosphoprotein western blots. Here, we reported that rWnt5a promoted migration and invasion of RA FLS, whereas knockdown of the endogenous WNT5A reduced them. These effects were specific to the RA FLS since they were not observed in FLS from osteoarthritis (OA) patients. Also, rWnt5a induced the expression of IL6, IL8, CCL2, CXCL5, MMP1, MMP3, MMP9, and MMP13 from baseline or potentiating the TNF induction, WNT5A signaling required the RYK receptor and was mediated through the WNT/Ca<sup>2+</sup> and the ROCK pathway. These pathways involved the RYK and ROCK dependent activation of the p38, ERK, AKT, and GSK3β kinases, but not the activation of JNK. Together these findings indicate that WNT5A contributes to the enhanced migration and invasiveness of RA FLS through RYK and the specific activation of ROCK and downstream kinases.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, fibroblast-like synoviocytes, migration, invasion, inflammatory response, WNT5A, RYK, MAPK

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammation and progressive destruction of the peripheral joints (1, 2), in which the resident fibroblast-like synoviocytes (FLS) are pivotal. These cells contribute to joint inflammation and damage by secreting inflammatory mediators, metalloproteinases, and cathepsins and by invading periarticular cartilage and bone. These actions are manifestations of the transformed-like phenotype the RA FLS show, which is also characterized by over-expression of proto-oncogenes, mutations of several tumor suppressor genes, increased proliferation, resistance to apoptosis and to contact-inhibition (3–5). This aggressive phenotype is maintained over time even in the absence of external inflammatory stimulation (6). Although recent research has been focused on the study of this phenotype (7–10), the mechanisms of many aspects of the RA FLS transformation, as their increased migration and invasiveness, are far from being completely known.

We have hypothesized that WNT5A, a member of the secreted glycoproteins family Wingless/integrase 1, will have a major role because it is known to participate in similar migration or invasion processes in health and disease and to be overexpressed in the RA FLS. In effect, WNT5A is involved in cytoskeleton remodeling, tissue polarization, cell migration and axon guidance in healthy tissues (11–16) and promotes migration and invasion in cancer cells (17–19). These actions are mediated through the non-canonical or  $\beta$ -catenin independent WNT pathways, which are the specific pathways transmitting WNT5A signals. Specifically, WNT5A binds a variety of receptors on the cell surface. They include the FDZ receptors that are shared with the WNT canonical pathway, but also other receptors, ROR1, ROR2, and RYK, which are specific of the non-canonical WNTs and WNT5A does not bind the canonical pathway coreceptors, LRP5/6 (20–24). In addition, the non-canonical pathways do not mediate their signals through the stabilization and nuclear translocation of  $\beta$ -catenin as the canonical pathway does (21). In contrast, the non-canonical signals follow either the WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  or the PCP (planar cell polarity) pathways (13, 14, 20). In the WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  signaling, the Wnt ligand-receptor interaction leads to the release of intracellular calcium, which activates protein kinase C (PKC), calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII), or calcineurin (CaN). The alternative PCP pathway involves the downstream activation of Rho family small GTPases, including Cdc42, Rac, and RhoA. In turn, activated Rac and Cdc42 initiate downstream c-Jun N-terminal kinase (JNK)/activating protein-1 (AP-1) signal transduction, whereas activated RhoA leads to Rho-Kinase (ROCK) activation. In this way, the PCP pathway regulates the cytoskeleton remodeling, tissue polarity, coordinated cell migration and axon guidance, and the WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway regulates cell migration, fate determination, and axon guidance and cooperates with the PCP pathway in controlling tissue polarity (13, 14, 20). Dysregulation of the WNT5A signaling has been implicated in the increased migration and invasiveness of cancer cell lines (17–19) and

the metastatic potential of gastric, breast and nasopharyngeal cancers (19, 25, 26).

Apart from the WNT5A effects related to migration and invasion, which have not been studied in RA yet, there are some pieces of evidence indicating the involvement of WNT5A in inflammatory diseases, and specifically in RA. For example, expression of WNT5A is increased in synovial tissue from RA patients, both in synoviocytes and endothelial cells (27), and WNT5A overexpression in normal fibroblast induces the expression of IL6, IL8, and IL15 (28). A result that was complemented by the demonstration that blockade of WNT5A in RA FLS reduces the expression of IL6 and IL15 (29). The stimulation of pro-inflammatory cytokines by WNT5A seems to result from NF $\kappa$ B activation through Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ /protein kinase C pathway in endothelial cells (27) or CaMKII in macrophages (30), or through the PCP pathway also in macrophages (31) and microglia (32). Also, the inducible *Wnt5a* deficiency in mice reduced the severity of arthritis in the K/BxN serum-transfer model, an effect that has been attributed to decreased inflammation and osteoclastogenesis (33). The latter interpretation is supported by the role of WNT5A in inducing osteoclastogenesis by a pathway requiring the presence of ROR2 and leading to the activation of JNK in mice (34). Therefore, accumulating evidence shows the involvement of WNT5A in RA through a variety of mechanisms and pathways but without addressing FLS migration and invasion.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients and Cell Culture

FLS were obtained from the synovial tissue of 11 RA patients undergoing synovectomy and 5 patients with osteoarthritis (OA) at the time of total joint replacement. The patients fulfilled the ACR/EULAR criteria for the classification of RA (35, 35) and all patients provided informed written consent. The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the Comité de Ética de Investigación de Santiago-Lugo.

FLS were obtained by digestion of synovial tissue as previously described (36). Adherent cells at 80% to 90% confluence were trypsinized and diluted at a split ratio of 1:3. Only FLS at passages 3 and 8 were used for experiments. Cells were treated when indicated with TNF (10 ng/ml, Sigma Aldrich), recombinant Wnt5a (400 ng/ml, R&D, Biotechne, Minneapolis, USA), anti-tyrosine-protein kinase RYK antibody (1  $\mu$ g/ml, Abgent, Inc. San Diego, USA), anti-tyrosine-protein kinase ROR2 antibody (4  $\mu$ g/ml; OriGene), normal rabbit IgG (1  $\mu$ g/ml; Cell Signaling) and the following inhibitors: Y-27632 2HCl (ROCK inhibitor, 20  $\mu$ M, Selleckchem), PD 98059 (MAPK-ERK inhibitor, 20  $\mu$ M, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), SB 203580 (MAPK p38 inhibitor, 10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich), LY 294002 (PI3K inhibitor, Merckmillipore, 10  $\mu$ M, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), BAPTA-AM ( $\text{Ca}^{2+}$ chelator, 10  $\mu$ M, Enzo Life Sciences, Inc. Farmingdale, NY).

No reduction in cell viability was observed in any treatment at the doses used.

### Small Interfering RNA (siRNA) Transfection

We purchased ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs for WNT5A, FZD1, FZD2, FZD4, FZD5, FZD7, ROR1, ROR2, RYK, and control siRNAs from Dharmacon (Horizon Discovery Group, Cambridge, UK). RA FLS were cultured in six-well plates ( $15 \times 10^4$  cells/well) and transiently transfected with 50 nM of siRNA in Opti-MEM I (Gibco, ThermoFisher, MA, USA) using DharmaFECT 1 (Dharmacon). The degree of suppression was determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) or western blot.

### Proliferation Assay

RA FLS were cultured in 96-well plates ( $2 \times 10^3$  cells/well) in DMEM, 5% FBS, 1% glutamine and 1% penicillin/streptomycin. Cells were treated with 400 ng/ml of rWnt5a for 24, 48, 72, and 96 h and proliferation was determined with the CellTiter-Glo luminescent viability assay (Promega, Wisconsin, USA) following the manufacturer's instructions.

### Migration Assay

RA FLS migration was analyzed by a wound closure motility assay using Ibidi Culture Inserts (Ibidi, Martinsried, Germany) placed into a 24-well plate. FLS were seeded ( $15 \times 10^3$  cells/well) in DMEM, 10% FBS, 1% Glutamine and 1% penicillin/streptomycin and treated with 400 ng/ml rWnt5a or other treatments when indicate. Microphotographs were taken 0 and 96 h after the treatment, and the areas of the remaining gaps were measured with the Image J software (National Institutes of Health, USA).

### Transwell Invasion Assay

The invasion assay was performed in 24-Well Millicell® Hanging Cell Culture Inserts that include a polyethylene terephthalate filter of 8.0  $\mu\text{m}$  pore size (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The filter was coated with 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the basement membrane Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). On the upper chamber, a total of  $5 \times 10^4$  FLS were plated in 200  $\mu\text{l}$  of DMEM, containing 1% FBS with or without 400 ng/ml rWnt5a. As chemoattractant, 750  $\mu\text{l}$  of DMEM containing 10% FBS was placed on the lower chamber. The plates were then incubated for 48 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Invading cells were fixed with paraformaldehyde and stained with Giemsa. Microphotographs of 10 random fields were taken in an Axio Vert.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) microscope at 20 $\times$  magnification. The number of the cells was determined using the Image J software (National Institutes of Health, USA).

### Real-Time qPCR

Real-time qPCR was performed in duplicates using 1-Step QRT-PCR-Brilliant III SYBR Green (Agilent Technologies, CA, USA) in a RotorGen (Corbett, Thermo Fisher Scientific) thermocycler, according to the manufacturer's protocol. Relative levels of gene expression were normalized to the beta-actin gene using the comparative C<sub>t</sub> method, where C<sub>t</sub> is the cycle at which the amplification is initially detected. The relative

amount of mRNA was calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, where:  $\Delta C_t = C_{t \text{ target}} - C_{t \text{ Actin}}$  and  $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ target}} - C_{t \text{ Actin}})_{\text{Basal}} - (C_{t \text{ target}} - C_{t \text{ Actin}})_{\text{Treatment}}$ . For the RA FLS treated as basal,  $\Delta\Delta C_t = 0$ , and  $2^0 = 1$ . For the experimental treatments, the value  $2^{-\Delta C_t}$  indicates gene expression relative to the beta-actin and the value  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  indicates the fold change in gene expression relative to the basal situation. The specific primers were from Qiagen (Hilden, Germany).

### Western Blot Analysis

After the indicated treatments, the proteins from the RA FLS were extracted using a cell lysis buffer. The protein concentration was determined with the Bradford assay (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad, CA, USA). Protein samples (10–20  $\mu\text{g}$ ) were resolved in 8% gradient SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and probed with primary antibodies directed against WNT5A (R&D), p44/42, SAPK/JNK, and p38 MAPK (MAPK Family antibody sampler kit, #9926), AKT (#9272), GSK3 $\beta$ (#9315), phospho-p44/42, phospho-SAPK/JNK, and phospho-p38 MAPK (Phospho-MAPK Family antibody sampler kit, #9910), phospho AKT (#9271), phospho GSK-3 $\beta$  (#9322), all from Cell Signaling Technology, Danvers, USA; and GAPDH antibody (Sigma-Aldrich). Bound antibodies were revealed with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Cell Signaling and Santa Cruz Biotechnology), and blots were developed using the ECL Plus detection system (ChemiDoc™ MD Imaging System (Bio-Rad, California, EEUU)).

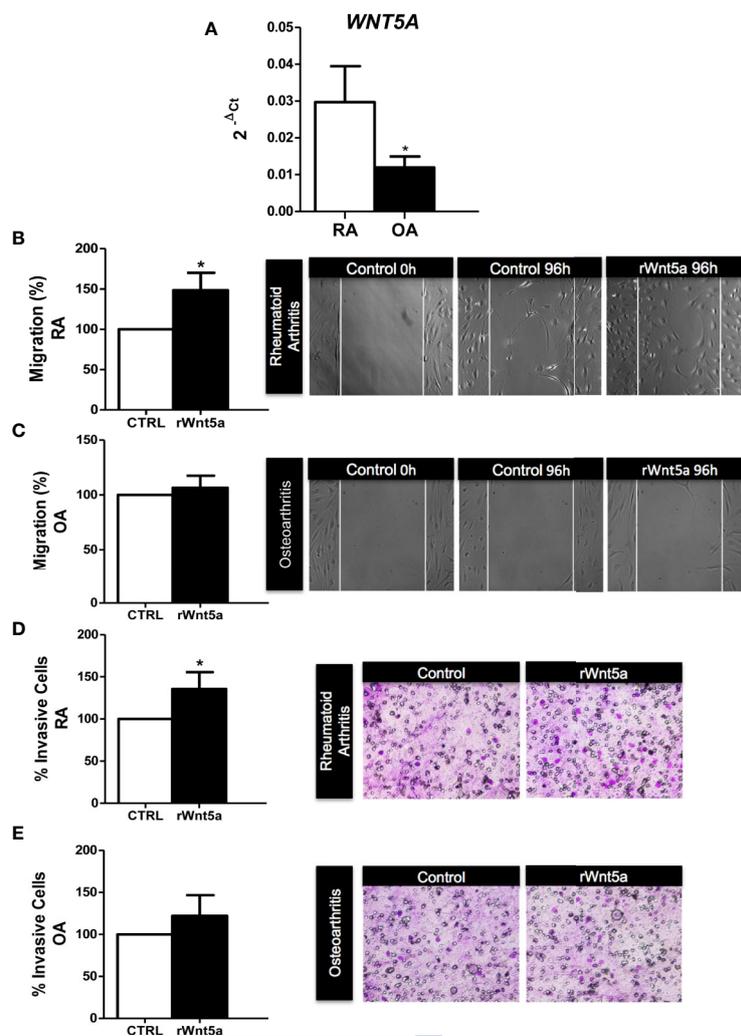
### Statistical Analysis

Differences between experimental groups were assessed with the Wilcoxon matched-pairs test or Mann Whitney U test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. Analyses were performed with the GraphPad Prism software. (Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU)).

## RESULTS

### WNT5A Promotes Migration and Invasiveness of RA FLS

We analyzed the mRNA expression of WNT5A in FLS from 7 RA and 5 OA patients by real-time PCR. As shown in **Figure 1A**, WNT5A mRNA was higher in RA FLS than in OA FLS ( $p < 0.05$ ). Next, we investigated the role of WNT5A on FLS migration using recombinant Wnt5a (rWnt5a) and a cell wound-healing assay. The preliminary experiments indicated that 400 ng/ml was the most effective rWnt5a dose (not shown), which is in accordance with previous studies (37, 38). FLS from 7 different RA patients and 5 OA patients were treated with 400 ng/ml rWnt5a for 96 h and the healed area was quantified. The migration of RA FLS treated with rWnt5a was significantly higher (48%) than without treatment (**Figure 1B**). However, this increase in migration was not observed in the OA FLS, as the healed area with OA FLS was similar with rWnt5a and without treatment (**Figure 1C**). Next, we investigated whether WNT5A



**FIGURE 1** | The migration and invasion of RA FLS are promoted by WNT5A. **(A)** Expression of *WNT5A* mRNA relative to that for  $\beta$ -actin in RA and OA patients was determined. **(B, C)** The FLS from RA **(B)** and OA **(C)** patients were stimulated with 400 ng/ml rWnt5a and the migration rate as percentage of the control was measured by wound-healing assays at 96 h **(D, E)** Percentage of RA FLS **(D)** and OA FLS **(E)** stimulated or not with 400 ng/ml rWnt5a, invading the Matrigel coated inserts at 48 h compared with the controls without rWnt5a. Values are the Mean  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) of FLS from 5 to 8 RA and OA patients obtained from a total of 9 and 8 independent experiments in migration and invasion assays, respectively. \* $P < 0.05$ , by Mann Whitney U test **(A)** and Wilcoxon matched-pairs test **(B–E)**.

could modify the invasiveness of the RA FLS. To this end, the transwell invasion assay through Matrigel was used. The results showed the RA FLS treated with rWnt5a were significantly more invasive (35% higher) than the non-treated RA FLS (**Figure 1D**). In contrast, addition of rWnt5a did not significantly increase the invasion ability of OA FLS (**Figure 1E**).

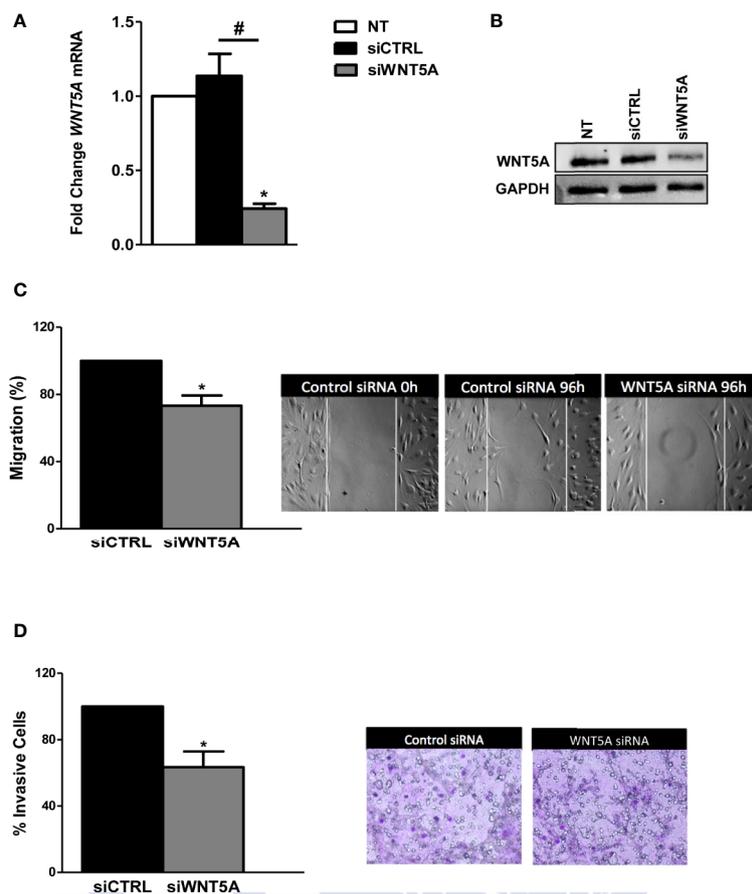
In the next experiments, we analyzed whether endogenous WNT5A modulates the migration and invasion of the RA FLS. These experiments were conducted after the knockdown of *WNT5A* by siRNA transfection, which reduced *WNT5A* expression by more than 75% at the RNA and protein levels (**Figures 2A, B**). The migration assay showed a significantly reduced healed area with the knocked FLS compared with the siControl transfected RA FLS (**Figure 2C**) that confirmed the

migration-promoting role of WNT5A. Also, the RA FLS transfected with siWNT5A were significantly less invasive (37% lesser) than the siControl transfected FLS (**Figure 2D**).

Finally, we also analyzed the effect of WNT5A on the proliferation of the RA FLS. In this case, neither stimulation with rWnt5a nor silencing of the endogenous gene expression significantly modified the cells' proliferation for up to 96 h compared with the controls (data not shown).

### WNT5A Promotes the Expression of Inflammatory Mediators and Metalloproteinases in RA FLS

We investigated the role of WNT5A in the spontaneous and TNF-induced inflammatory response of RA FLS. Then, we analyzed the



**FIGURE 2 |** *WNT5A* suppression reduces migration and invasion in RA FLS. **(A, B)**, FLS were transfected with *WNT5A* or control siRNA and the efficiency of silencing was determined by real-time PCR **(A)** and western blot **(B)**. A representative blot is shown. **(C, D)** Analysis of migration **(C)** and invasion **(D)** in RA FLS transfected with *WNT5A* or control siRNA. Representative images are shown. Values are the Mean  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) of FLS from 6 patients obtained from 5 independent experiments in each assay. \* and # indicates  $P < 0.05$ , by Wilcoxon matched-pairs test.

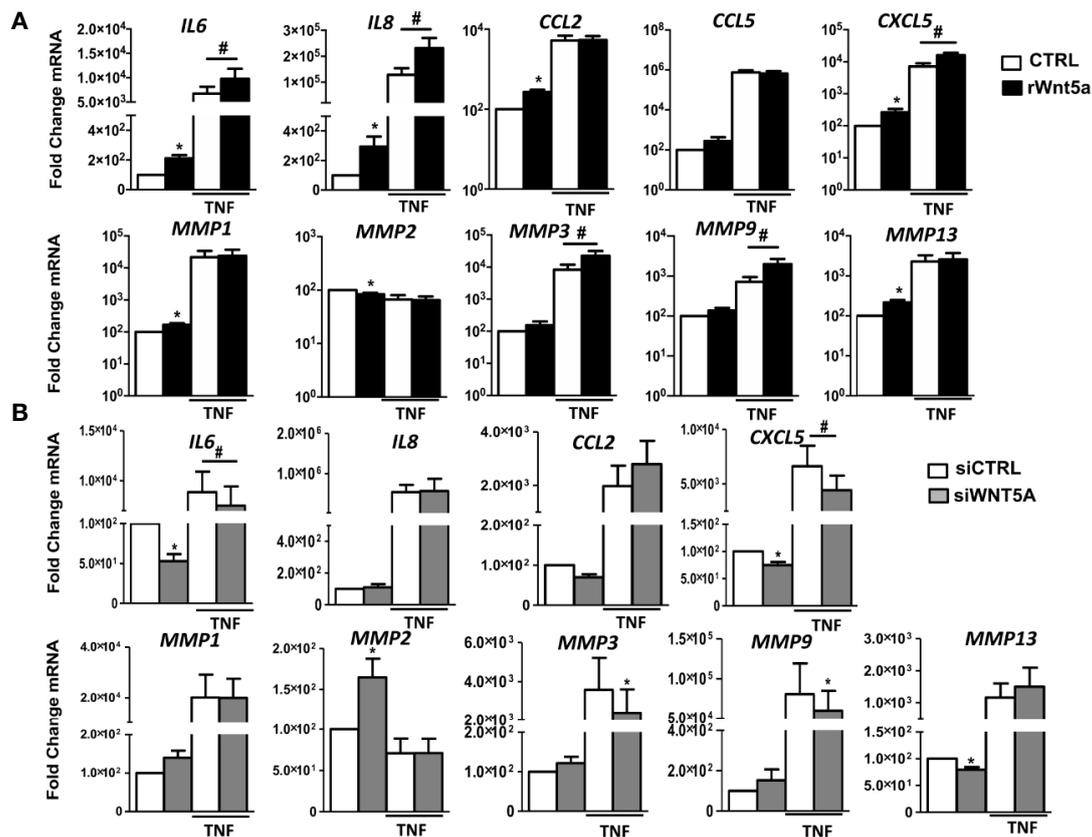
mRNA expression of several chemokines, cytokines, and metalloproteinases in the FLS from 7 RA patients. As shown in **Figure 3A**, rWnt5a induced the expression of *IL6*, *IL8*, *CCL2*, *CXCL5*, *MMP1*, and *MMP13*. The attained levels with rWnt5a were lower than those reached after TNF stimulation. However, the addition of rWnt5a to TNF further increased the expression of *IL6*, *IL8*, and *CXCL5* over the induced by TNF alone (**Figure 3A**). In addition, rWnt5a potentiated the TNF induction of *MMP3* and *MMP9* by 2.3-fold and 2.7-fold, respectively, although it did not stimulate significantly their basal expression. The *MMP2* metalloproteinase showed a contrasting pattern because it was significantly decreased, by rWnt5a (**Figure 3A**).

To further evaluate the effect of *WNT5A* on the inflammatory response of RA FLS, we analyzed whether suppression of endogenous *WNT5A* modulates the expression of inflammatory mediators and metalloproteinases that were induced by rWnt5a. As shown in **Figure 3B**, *WNT5A* suppression induced changes in expression that were almost completely opposite to the observed with the addition of rWnt5a. In detail, the basal mRNA expression

of *IL6*, *CXCL5*, and *MMP13* was reduced, and the expression of *MMP2* was increased. In addition, *WNT5A* knockdown reduced the TNF-induced expression of *IL6*, *CXCL5*, *MMP3*, and *MMP9* (**Figure 3B**). Therefore, the two sets of experiments were widely concordant in their support of *WNT5A* as an inducer of inflammatory mediators.

### **WNT5A Signaling in RA FLS Is Dependent on the RYK Receptor**

To explore the mechanisms underlying the effects of *WNT5A* on RA FLS, we first analyzed the mRNA expression of the *WNT5A* receptors. The real-time PCR showed that six of the eight receptors were expressed at easily detectable levels. *FZD1* was the most highly expressed receptor followed by *RYK*, and at a lower level by *ROR1*, *FZD2*, *FZD4* and *FZD7* (**Figure 4A**). The *ROR2* and *FZD5* receptors were much lower. Then, we decided not to continue investigating *FZD5* given the difficulties to achieve an adequate silencing due to its low expression and the absence of specific anti-*FZD5* blocking antibodies or inhibitors.



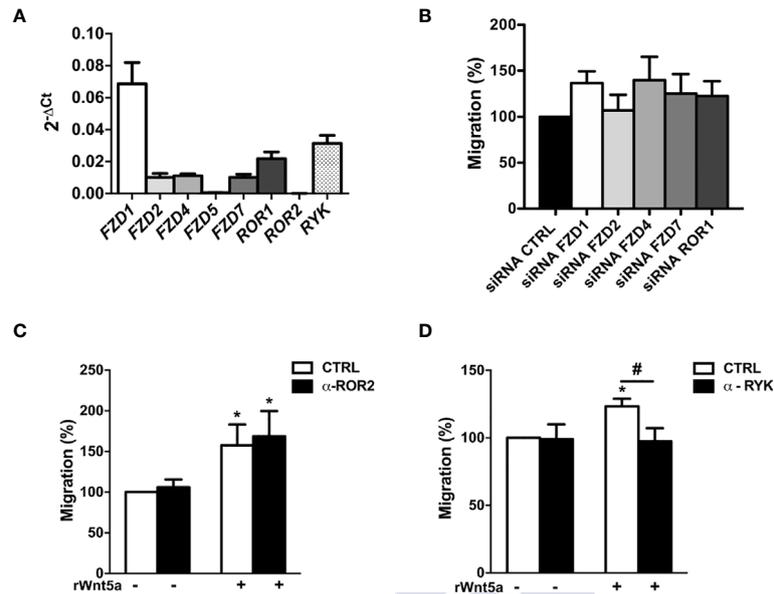
**FIGURE 3** | The gene expression of inflammatory mediators and metalloproteinases in RA FLS are promoted by WNT5A in RA FLS. **(A, B)** Fold change of *IL6*, *IL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CXCL5*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, and *MMP13* mRNA expression in RA FLS stimulated with 400 ng/ml rWnt5a alone or in combination with 10 ng/ml TNF **(A)**, or by transfection with WNT5A or control siRNA (*CCL5* was not included) **(B)**. Values are the Mean  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) of FLS from 7 patients with RA obtained from 7 independent experiments. \* and # indicates  $P < 0.05$ , by Wilcoxon matched-pairs test.

However, we considered worth pursuing ROR2 investigation given the reagent availability and that it has been previously involved in proliferation, migration and invasion of several cancer cells (39–41). Next, we analyzed the effect of the remaining receptors knockdown on the rWnt5a-induced migration (**Figure 4B**). We obtained efficient silencing of five of the seven genes as assessed by real-time PCR (data not shown). However, the knockdown of none of them, *FZD1*, *FZD2*, *FZD4*, *FZD7* and *ROR1*, modified the rWnt5a induction of FLS migration, as similar healed areas were observed in cells transfected with targeted siRNA and with siControl (**Figure 4B**). Therefore, our investigation proceeded with the two receptors without acceptable silencing, *ROR2* and *RYK*. They were targeted with blocking antibodies (42, 43). The anti-ROR2 antibody did not modify the basal or rWnt5a stimulated migration (**Figure 4C**). Only the treatment with anti-*RYK* antibody reverted the migration of FLS induced by rWnt5a (**Figure 4D**). Overall, these findings indicated that WNT5A promotes RA FLS migration by activating *RYK*-dependent non-canonical WNT signaling.

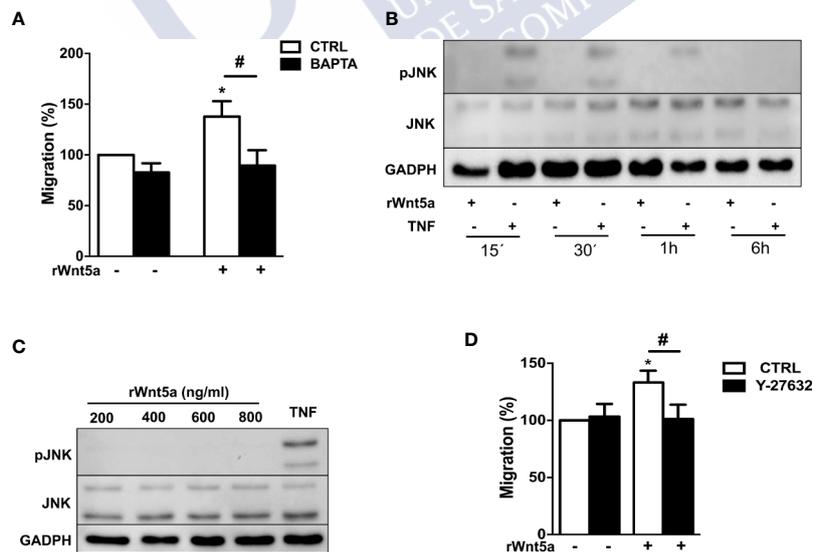
### WNT5A Stimulates RA FLS Migration via WNT/ $Ca^{+2}$ and RhoA/ROCK Pathways

We examined which non-canonical WNT5A pathway, WNT/ $Ca^{+2}$  or WNT/PCP, is activated by WNT5A in the RA FLS. First, we addressed  $Ca^{+2}$  mobilization by treating the FLS from 7 RA patients with 10  $\mu$ M of the selective calcium chelator 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (BAPTA). This chelator significantly reduced the rWnt5a stimulated FLS migration (**Figure 5A**). Therefore, the WNT/ $Ca^{+2}$  pathway may contribute to WNT5A-induced migration of RA FLS. Next, we analyzed the JNK activation after rWnt5a treatment. As shown in **Figure 5B**, JNK phosphorylation was not detected in the rWnt5a stimulated FLS, at any time from 15' to 6 h, whereas it was observed at 15', 30' and 1 h after TNF stimulation. Also, rWnt5a did not induce JNK activation in RA FLS at any of the doses from 200 to 800 ng/ml for 1 h (**Figure 5C**).

Therefore, we analyzed the other branch of the PCP pathway by using the specific ROCK inhibitor, Y-27632. This inhibitor significantly reduced the migration rate of the rWnt5a stimulated FLS (**Figure 5D**). Overall these data indicated that WNT5A induces



**FIGURE 4** | Identification of the receptors involved in WNT5A signaling in RA FLS. **(A)** Expression of the WNT receptors in FLS from 6 RA patients as assessed by real-time PCR. **(B)** Effect of silencing RA FLS *FZD1*, *FZD2*, *FZD4*, *FZD7* and *ROR1* by siRNA transfection on the RA FLS migration stimulated with 400 ng/ml rWnt5a in comparison with the siRNA control transfection as measured by wound-healing assays at 96 h. **(C, D)** Effect of the anti ROR2 antibody ( $\alpha$ -ROR2), 4  $\mu$ g/ml **(C)**, or the anti-RYK antibody ( $\alpha$ -RYK), 1  $\mu$ g/ml **(D)** on the basal and rWnt5a-induced migration (400 ng/ml) of RA FLS. Migration of RA FLS without treatment was the 100% **(C, D)**. Values are the Mean  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) of FLS from 6 to 8 patients with RA obtained from four to seven independent experiments. \* and # indicate  $P < 0.05$ , by Wilcoxon matched-pairs test.



**FIGURE 5** | Identification of the pathways involved in WNT5A signaling in RA FLS. **(A)** Effect of the BAPTA  $\text{Ca}^{2+}$  chelator, 10  $\mu$ M on the basal and rWnt5a-induced migration (400 ng/ml) of RA FLS. **(B)** Representative blot of the time-course analysis of the changes in JNK phosphorylation induced by incubation with 400 ng/ml rWnt5a in comparison with 10 ng/ml TNF as determined by western blot. **(C)** Representative blot of the activation status of the JNK MAPK in RA FLS treated with the indicated doses of rWnt5a for 1 h in comparison with 10 ng/ml TNF. **(D)** Impact of the Y-27632 ROCK inhibitor (20  $\mu$ M) on the rWnt5a-induced migration of the RA FLS. Migration of RA FLS without treatment was the 100% **(A, C)**. Values are the Mean  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) of FLS from six to eight patients with RA obtained from 6 independent experiments. \* and # indicate  $P < 0.05$ , by Wilcoxon matched-pairs test.

RA FLS migration by activation of WNT/Ca<sup>2+</sup> pathway and the RhoA/ROCK branch of the WNT/PCP pathway.

## WNT5A Activates the p38, ERK MAPK, and PI3K/AKT Pathways in RA FLS Through the RYK Receptor and ROCK Signaling

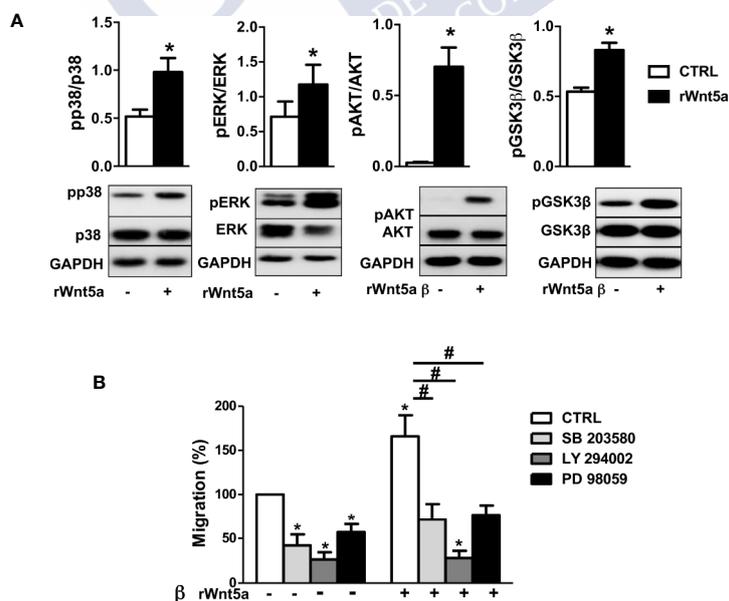
The MAPK and PI3K/AKT signaling pathways have been previously involved in the migration of RA FLS (44, 45) and other cells (46). Therefore, we analyzed the effect of WNT5A on the activation of p38 and ERK MAPK, and of AKT and GSK3 $\beta$  of inhibiting the two pathways on RA FLS migration. The first part of the analysis consisted of the western-blot assessment of the kinases' phosphorylation in the FLS from 6 RA patients after stimulation with rWnt5a for 1 h. The results showed evidence of the activation of the four analyzed kinases. Specifically, significantly higher phospho-p38, phospho-ERK, phospho-AKT and phospho GSK3 $\beta$  were observed in the rWnt5a-stimulated FLS than in the FLS without treatment (**Figure 6A**). The second part of the analysis consisted of preincubating the RA FLS with specific inhibitors of the MAPK-p38 (SB 203580), MAPK-ERK (PD 98059) or PI3K (LY 294002) before measuring migration in the wound healing assay. The three inhibitors significantly reduced the migration of the RA FLS, both in basal conditions and after induction with rWnt5a, confirming the involvement of the two kinase pathways (**Figure 6B**).

Given that our results indicate WNT5A promotes RA FLS migration via the RYK receptor, we treated FLS from 6 RA patients with the anti-RYK antibody or IgG control and rWnt5a for 1 h. The western blot showed significant reductions of pp38,

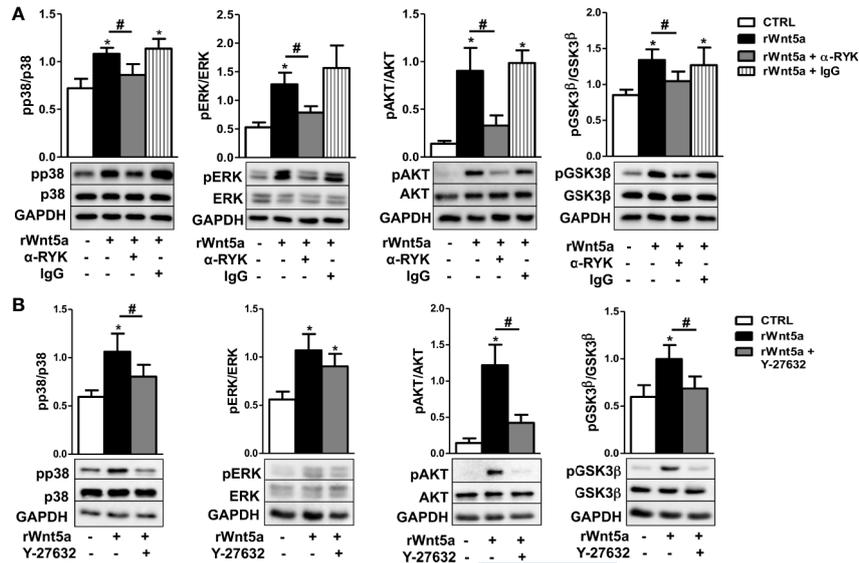
pERK, pAKT, and pGSK3 $\beta$  that were not observed with the IgG control (**Figure 7A**). In addition, we analyzed the effect of the ROCK inhibitor, Y-27632, given the dependence on ROCK activation of the rWnt5a-induced RA FLS migration. The experiments were conducted as with the anti-RYK antibody but replacing the antibody by the Y-27632 inhibitor. In this case, the Western blot showed a significant reduction of the phosphorylated p38, AKT, and GSK3 $\beta$  and a non-significant trend for diminution of the ERK activation (**Figure 7B**). These results are a confirmation of the involvement of the multiple pathways downstream of the RYK receptor that we have identified.

## DISCUSSION

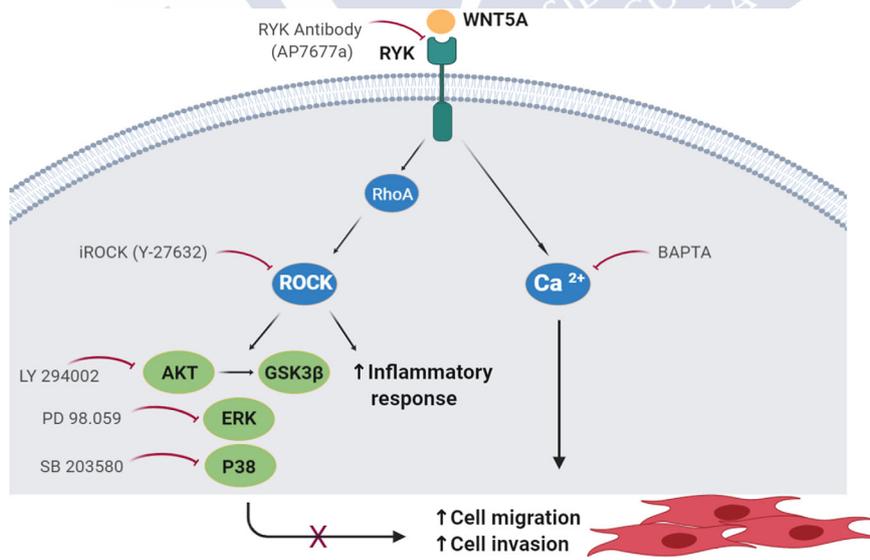
Our results indicate that WNT5A contributes to the aggressive phenotype of the FLS in RA patients because it promotes their enhanced migration and invasion, and the expression of inflammatory mediators via the WNT/Ca<sup>2+</sup> and RYK/RhoA/ROCK signaling pathways (**Figure 8**). The regulation of RA FLS migration and invasion by WNT5A was demonstrated not only with the addition of rWnt5a, but most notably with the silencing of endogenous WNT5A expression. This modulation was specific of RA FLS since the migration and invasion of FLS from OA patients were not induced. This novel contribution of WNT5A to migration and invasion complements the already known participation of WNT5A to the induction of inflammatory mediators by these cells. In this respect, our study confirms the induction of IL6 and IL8, and shows that also CCL2, CXCL5, MMP1, MMP3, MMP9,



**FIGURE 6** | Downstream kinases activated by rWnt5a promote migration in RA FLS. **(A)** Analysis of the activation of p38, ERK MAPK, PI3K/AKT, and GSK3 $\beta$  by western blot in RA FLS treated with 400 ng/ml rWnt5a. **(B)** Effect of the MAPK-p38 inhibitor (SB 203580), PI3K inhibitor (LY 294002) or MAPK-ERK inhibitor (PD 98059) on the basal and rWnt5a-induced migration in RA FLS at 96 h. Values are the Mean  $\pm$  Standard error of the mean (SEM) of FLS from six to eight patients with RA obtained from three to four independent experiments. \* and # indicate  $P < 0.05$ , by Wilcoxon matched-pairs test.



**FIGURE 7** | Contribution of RYK/ROCK pathway to the activation of p38, ERK MAPK, PI3K/AKT, and GSK3β kinases. **(A)** Representative western blot showing the effect of the anti-RYK antibody (α-RYK) on the rWnt5a-induced activation of p38, ERK MAPK, PI3K/AKT, and GSK3β in RA FLS. **(B)** Effect of the Y-27632 ROCK inhibitor (20 μM) on the rWnt5a-induced activation of p38, ERK MAPK, PI3K/AKT, and GSK3β kinases determined by Western blot in RA FLS. Values are the Mean ± Standard error of the mean (SEM) of FLS from six to eight patients with RA obtained from three to four independent experiments. \* and # indicate P < 0.05, by Wilcoxon matched-pairs test.



**FIGURE 8** | Schematic representation of the WNT5A signaling pathways involved in the migration of RA FLS. The participating molecules are shown together with the reagent used to demonstrate their respective involvement.

and MMP13 are induced by rWnt5a in the RA FLS. Also, our results indicate that some mediators are more sensitive to WNT5A than others. The first group includes IL6 and CXCL5, which were modulated by WNT5A in RA FLS under the four analyzed conditions. In contrast, MMP13 was only responsive to WNT5A in the absence of TNF, whereas MMP3 and MMP9 were sensitive to

WNT5A only in the presence of TNF, which could be a more relevant context for RA pathogenesis. Finally, IL8 and MMP1 were induced by rWnt5a, but they did not decrease after WNT5A silencing. This heterogeneity likely reflects the participation of a variety of pathways in the regulation of each of these mediators in the RA FLS. Our experiments also show that the promotion of

migration requires  $\text{Ca}^{2+}$ , RYK and ROCK, indicating the WNT5A signal could follow the WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  and RYK/RhoA/ROCK signaling pathways. The latter led to the activation of p38, ERK MAPK and PI3K/AKT. In this way, the identification of WNT5A role is an unexplored aspect of the RA FLS phenotype, and delimitation of the implicated signaling pathway enriches our knowledge of RA pathogenesis and provides new targets for treatment.

Our results are consistent with the previously reported effect of WNT5A in embryonic development and several cancer types. In general, WNT5A regulates embryonic tissue morphogenesis through control of cell migration and polarization, rather than proliferation or fate specification (13). This behavior is manifest in embryonic processes as elongation of the body axis, growth of long bones, digits, ribs and sternum, craniofacial morphogenesis, eyelid development and neuronal convergent extension and axon guidance (13, 15, 16). Regarding the involvement in cancer, overexpression of WNT5A significantly induced migration and invasion whereas WNT5A knockdown decreased them in cell lines from nasopharyngeal cancer (25). WNT5A also induced gastric cancer migration and invasion by binding to FZD2 and ROR2, and treatment *in vivo* with anti-WNT5A antibody inhibited liver metastasis of gastric cancer cells (47). In the same way, WNT5A induced migration in chronic lymphocytic leukemia cells (48) and melanomas (49). However, the role of WNT5A is complex and depending on other cell characteristics. This could be the reason explaining that opposite effects have been described in other cancer cells (50–52). This is a common feature of WNTs where a major determinant of the effects is the cellular context concerning factors such as the expressed repertoire of receptors and signal transducers (13). The lack of response to rWnt5a of the FLS from OA patients we have found represents another example of the importance of the cellular context. A context that differs in a broad range of epigenetic marks and gene expression patterns between RA and OA FLS (53, 54).

The cellular context could explain also the MMP2 expression changes in response to WNT5A. Only MMP2 among the explored inflammatory mediators was downregulated by rWnt5a (and upregulated by silencing WNT5A). This downregulation contrast with the decreased Mmp2 expression observed in Wnt5a cKO arthritic mice (33), although the two results are not fully comparable because of the complex mixture of tissues from the paw analyzed in the mouse. There are no other sources of information on the MMP2 regulation by WNT5A in arthritis, but in cancer cells the two types of results can be found. Several cells show induction of MMP2 by WNT5A (55, 56), but others show inhibition (57). The cancer studies are also of interest because they show that WNT5A stimulates MMP2 expression through ROR2 (55, 56), a receptor that was expressed at low levels in the RA FLS and that was not involved in the WNT5A modulation of migration suggesting a possible mechanism of the differential MMP2 regulation. The context-dependency is also a major determinant of the specific signaling pathway activated by the WNT ligand. The specific pathway activated by WNT5A in the RA FLS required the RYK receptor. RYK is an atypical receptor tyrosine kinase due to its inactive tyrosine kinase domain (58). It has been extensively studied

in the development of nervous systems where it is important for establishing planar polarity during neural tube development and neuronal migration into the expanding cortical plate (16). However, it participates in many other systems as revealed in the Ryk loss-of-function mice with skeletal, craniofacial and cardiac abnormalities many of them overlapping with the observed in the Wnt5a null mice (58). This pathway of WNT5A migration promotion was in contrast with the followed by some other systems that require ROR2. Our results showed that ROR2 was both, expressed at very low levels and not required for migration of the RA FLS. These findings are of interest because ROR2 is known to recruit the actin binding protein filamin A leading to cytoskeleton remodeling and filopodial extension through JNK activation (59), which was also not observed in the RA FLS.

The two intracellular signaling pathways that were activated in our experiments were WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  and the branch of the PCP pathway involving ROCK and the downstream p38/ERK/AKT/GSK3 $\beta$  kinases. The two are known to show a great deal of crosstalk and to cooperate in some processes leading to a significant overlap between their functions. As an example, the two overlap during development: PCP is important for cell migration, axon growth and pathfinding, synaptogenesis and ciliogenesis through modulation of the actin and microtubule cytoskeletons, and the WNT/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway is important in cell fate determination, cell migration, embryonic convergent extension and axon guidance (16). Therefore, it is not surprising that the two pathways cooperate to potentiate FLS migration. The participation of ROCK is also very congruent with the best-known function of this member of the serine/threonine kinases, which is facilitating actomyosin cytoskeleton contractility. Specifically, ROCK is involved in the formation of stress fibers and focal adhesions (60).

The magnitude of the changes in migration and invasion was about a third of the baseline level. These changes are modest in comparison with the induced by some cytokines and chemokines (7, 61, 62), but similar to the observed in other studies (44, 63–65), including the study blocking the sonic hedgehog pathway (44) or suppressing cathepsin B (65). These examples and the reduced severity of arthritis in the Wnt5a cKO mice (33) support the relevance of the WNT5A modulation. In any case, the clinical benefit of inhibiting the WNT5A pathway will depend on its global contribution to RA, not only on the decreased migration and invasion. Indeed, blocking WNT5A signaling would have multiple therapeutic benefits, acting on the two aspects of RA pathogenesis, chronic inflammation and joint damage. Specifically, WNT5A is involved in the production of inflammatory mediators and metalloproteinases, in osteoclastogenesis and in FLS migration and invasion. Some of these benefits will be obtained by blocking downstream factors in the pathway. Accordingly, we showed here that treatment with the ROCK specific inhibitor, Y-27632, completely inhibited the migration of RA FLS induced by rWnt5a. In this regard, a previous study has shown that treatment with Fasudil, a less specific ROCK inhibitor approved for human use in Japan, suppressed cytokine expression in RA FLS and reduced the severity of arthritis in rats with adjuvant-induced arthritis (66).

A limitation of our study is the lack of distinction between ROCK1 and ROCK2. However, this is the commonest approach

in current research because of the high degree of homology between the two, the many commonalities in their regulation, pattern of expression, and functions, and the fact that most inhibitors do not distinguish between them (including Y-27632 and Fasudil) (60). Another limitation is the impossibility to completely exclude signaling through FZD receptors due to the absence of specific reagents and the high degree of redundancy between them (67). Therefore, silencing the FZD one by one will not disclose their involvement, as happened with the individual FZD knockout mice that showed incomplete phenotypes due to signaling through alternative FZD (68). A circumstance that was only disclosed in the double knockout animals. This scenario should be considered because the role of RYK in some systems acts as a co-receptor associated with FZD receptors (16, 58, 67).

In summary, our discovery of the WNT5A/RYK/ROCK signaling pathway as a promoter of the enhanced migration and invasion of RA FLS and the definition of other components of the aggressive phenotype of the RA FLS has led to the identification of molecular targets that might be therapeutically beneficial in the RA patients.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de Ética de Investigación de Santiago-Lugo

## REFERENCES

- Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* (2018) 4:18001. doi: 10.1038/nrdp.2018.1
- Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* (2016) 388(10055):2023–38. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8
- Niedermeier M, Pap T, Adelheid K. Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* (2010) 24:527–40. doi: 10.1016/j.berh.2010.02.002
- Pap T, Nawrath M, Heinrich J, Bosse M, Baier A, Hummel KM, et al. Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2004) 50:2794–802. doi: 10.1002/art.20461
- Baier A, Meineckel I, Gay S, Pap T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* (2003) 15:274–79. doi: 10.1097/00002281-200305000-00015
- Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* (1996) 149:1607–15.
- Bartok B, Hammaker D, Firestein GS. Phosphoinositide 3-kinase regulates migration and invasion of synoviocytes in rheumatoid arthritis. *J Immunol* (2014) 192:2063–70. doi: 10.4049/jimmunol.1300950
- Charbonneau M, Lavoie RR, Lauzier A, Harper K, McDonald PP, Dubois CM. Platelet-derived growth factor receptor activation promotes the prodestructive invadosome-forming phenotype of synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* (2016) 196:3264–75. doi: 10.4049/jimmunol.1500502
- Stanford SM, Aleman Muench GR, Bartok B, Sacchetti C, Kiosses WB, Sharma J, et al. TGF responsive tyrosine phosphatase promotes rheumatoid synovial fibroblast invasiveness. *Ann Rheum Dis* (2016) 75(1):295–302. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205790
- Tang MW, Malvar Fernández B, Newsom SP, van Buul JD, Radstake TRDJ, Baeten DL, et al. Class 3 semaphorins modulate the invasive capacity of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* (2018) 57(5):909–20. doi: 10.1093/rheumatology/kex511
- Cohen ED, Miller MF, Wang Z, Moon RT, Morrisey EE. Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. *Development* (2012) 139:1931–40. doi: 10.1242/dev.069377
- Roarty K, Serra R. Wnt5a is required for proper mammary gland development and TGF-beta-mediated inhibition of ductal growth. *Development* (2007) 134:3929–39. doi: 10.1242/dev.008250
- Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2012) 4(9):a007864. doi: 10.1101/cshperspect.a007864
- Kumawat K, Gosens R. WNT5A: signaling and functions in health and disease. *Cell Mol Life Sci* (2016) 73:567–87. doi: 10.1007/s00018-015-2076-y
- Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* (1999) 126(6):1211–23.
- Clark CE, Nourse CC, Cooper HM. The tangled web of non-canonical Wnt signalling in neural migration. *Neurosignals* (2012) 20(3):202–20. doi: 10.1159/00032153

(2017/521). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AR-T performed the experiments and participated in the analysis of data and in drafting the manuscript. NM performed the experiments and participated in the analysis of data. CP performed the experiments. FR-T obtained the fibroblast-like synoviocytes from OA patients and participated in the experiments with these cells and in analysis of data. AM-V obtained the fibroblast-like synoviocytes from RA patients and participated in the analysis of data. AG participated in the analysis of data and wrote the manuscript. CC planned and managed the project, analyzed data and wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, with participation of European Regional Development Fund (FEDER) funds (European Union) [Grant PI1701660 and by Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS) Program, RD16/0012/0014].

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the patients for their contributions.

17. Lingskog R, Mohapatra P, Moradi F, Prasad CP, Andersson T. Demonstration of a WNT-5A-IL-6 positive feedback loop in melanoma cells: Dual interference of this loop more effectively impairs melanoma cell invasion. *Oncogene* (2016) 7(25):37790–02. doi: 10.18632/oncotarget.9332
18. Linke F, Zaunig S, Nietert NM, von Bonin F, Lutz S, Dullin C, et al. WNT5A: a motility-promoting factor in Hodgkin lymphoma. *Oncogene* (2017) 36(1):13–23. doi: 10.1038/ncr.2016.183
19. Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, et al. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res* (2006) 66:10439–48. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2359
20. Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Bio* (2009) 10:468–77. doi: 10.1038/nrm2717
21. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* (2006) 127:469–80. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.018
22. Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro JE, et al. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(8):3047–52. doi: 10.1073/pnas.0712148105
23. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* (2003) 8:645–54. doi: 10.1046/j.1365-2443.2003.00662.x
24. Andre P, Wang Q, Wang N, Gao B, Schilit A, Halford MM, et al. The Wnt Coreceptor Ryk Regulates Wnt/Planar Cell Polarity by Modulating the Degradation of the Core Planar Cell Polarity Component Vangl2. *J Biol Chem* (2012) 287(53):44518–25. doi: 10.1074/jbc.M112.414441
25. Qin L, Yin Y, Zheng F, Peng L, Yang C, Bao Y-N, et al. WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget* (2015) 6:10239–52. doi: 10.18632/oncotarget.3518
26. Klemm F, Bleckmann A, Siam L, Chuang HN, Rietkötter E, Behme D, et al.  $\beta$ -Catenin-independent WNT signaling in basal-like breast cancer and brain metastasis. *Carcinogenesis* (2011) 32:434–42. doi: 10.1093/carcin/bgq269
27. Kim J, Kim J, Kim DW, Ha Y, Ihm MH, Kim H, et al. Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. *J Immunol* (2010) 185(2):1274–82. doi: 10.1055/s-0030-1258793
28. Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97(6):2791–6. doi: 10.1073/pnas.050574297
29. Sen M, Chamorro M, Reifert J, Corr M, Carson DA. Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis Rheum* (2001) 44(4):772–81. doi: 10.1002/1529-0131(200104)44:4<772::AID-ANR133>3.0.CO;2-L
30. Pereira C, Schaer DJ, Bachli EB, Kurrer MO, Schoedon G. Wnt5A/CaMKII Signaling Contributes to the Inflammatory Response of Macrophages and Is a Target for the Antiinflammatory Action of Activated Protein C and Interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2008) 28(3):504–10. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.157438
31. Naskar D, Maiti G, Chakraborty A, Roy A, Chattopadhyay D, Sen M. Wnt5a-Rac1-NF- $\kappa$ B homeostatic circuitry sustains innate immune functions in macrophages. *J Immunol* (2014) 192(9):4386–97. doi: 10.4049/jimmunol.1302817
32. Halleskog C, Dijksterhuis JP, Kilander MB, Becerril-Ortega J, Villaseca JC, Lindgren E, et al. Heterotrimeric G protein-dependent WNT5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. *J Neuroinflammation* (2012) 9:111. doi: 10.1186/1742-2094-9-111
33. MacLauchlan S, Zuriaga MA, Fuster JJ, Cuda CM, Jonason J, Behzadi F, et al. Genetic deficiency of Wnt5a diminishes disease severity in a murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* (2017) 19(1):166. doi: 10.1186/s13075-017-1375-0
34. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, et al. Wnt5a-ROR2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* (2012) 18(3):405–12. doi: 10.1038/nm.2653
35. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* (2010) 62:2569–81. doi: 10.1002/art.27584
36. Orosa B, Gonzalez A, Mera A, Gomez-Reino JJ, Conde C. Lysophosphatidic acid receptor 1 suppression sensitizes rheumatoid fibroblast-like synoviocytes to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Arthritis Rheum* (2012) 64(8):2460–70. doi: 10.1002/art.34443
37. Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf II GF, Shen Z, Wu R, et al. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest* (2016) 126(2):585–98. doi: 10.1172/JCI83535
38. Hansen C, Howlin J, Tengholm A, Dyachok O, Vogel WF, Nairn AC, et al. Wnt-5a-induced Phosphorylation of DARPP-32 Inhibits Breast Cancer Cell Migration in a CREB-dependent Manner. *J Biol Chem* (2009) 284:27533–43. doi: 10.1074/jbc.M109.048884
39. Edris B, Espinosa I, Mikels A, Lee C-H, Steigen SE, Zhu S, et al. ROR2 is a novel prognostic biomarker and a potential therapeutic target in leiomyosarcoma and gastrointestinal stromal tumor. *J Pathol* (2012) 227(2):223–33. doi: 10.1002/path.3986
40. Bayerlová M, Menck K, Klemm F, Wolff A, Pukrop T, Binder C, et al. Ror2 signaling and its relevance in breast cancer progression. *Front Oncol* (2017) 7:135. doi: 10.3389/fonc.2017.00135
41. Henry CE, Llamas E, Djordjevic A, Hacker NF, Ford CE. Migration and invasion is inhibited by silencing ROR1 and ROR2 in chemoresistant ovarian cancer. *Oncogenesis* (2016) 5(5):e226. doi: 10.1038/oncs.2016.32
42. Kessenbrock K, Smith P, Steenbeek SC, Pervolarakis N, Kumar R, Minami Y, et al. Diverse regulation of mammary epithelial growth and branching morphogenesis through noncanonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114(12):3121–26. doi: 10.1073/pnas.1701464114
43. Zhong J, Kim HT, Lyu J, Yoshikawa K, Nakafuku M, Lu W. The Wnt receptor Ryk controls specification of GABAergic neurons versus oligodendrocytes during telencephalon development. *Development* (2011) 138(3):409–19. doi: 10.1242/dev.061051
44. Liu F, Feng XX, Zhu SL, Huang HY, Chen YD, Pan YF, et al. Sonic Hedgehog Signaling Pathway Mediates Proliferation and Migration of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis via MAPK/ERK Signaling Pathway. *Front Immunol* (2018) 9:2847. doi: 10.3389/fimmu.2018.02847
45. Volin MV, Huynh N, Klosowska K, Chong KK, Woods JM. Fractalkine Is a Novel Chemoattractant for Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synoviocyte Signaling Through MAP Kinases and Akt. *Arthritis Rheumatol* (2007) 57:2512–22. doi: 10.1002/art.22806
46. Ha Y-S, Kim Y-Y, Yu NH, Chun SY, Choi SH, Lee JN, et al. Down-regulation of transient receptor potential melastatin member 7 prevents migration and invasion of renal cell carcinoma cells via inactivation of the Src and Akt pathway. *Invest Clin Urol* (2018) 59:263–74. doi: 10.4111/icu.2018.59.4.263
47. Hanaki H, Yamamoto H, Sakane H, Matsumoto S, Ohdan H, Sato A, et al. An anti-Wnt5a antibody suppresses metastasis of gastric cancer cells in vivo by inhibiting receptor-mediated endocytosis. *Mol Cancer Ther* (2012) 11:298–307. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0682
48. Kaucka M, Plevova K, Pavlova S, Janovska P, Mishra A, Verner J, et al. The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. *Cancer Res* (2013) 73:1491–501. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1752
49. Dissanayake SK, Olkhanud PB, O'Connell MP, Carter A, French AD, Camilli TC, et al. Wnt5A regulates expression of tumor-associated antigens in melanoma via changes in signal transducers and activators of transcription 3 phosphorylation. *Cancer Res* (2008) 68:10205–14. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2149
50. Dejmeck J, Dejmeck A, Safholm A, Sjolander A, Andersson T. Wnt-5a protein expression in primary duodenal colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. *Cancer Res* (2005) 65:9142–46. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1710
51. Liu XH, Pan MH, Lu ZF, Wu B, Rao Q, Zhou ZY, et al. Expression of Wnt-5a and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* (2018) 40:560–67. doi: 10.1016/j.dld.2007.12.011
52. Thiele S, Zimmer A, Göbel A, Rachner TD, Rother S, Fuessel S, et al. Role of WNT5A receptors FZD5 and RYK in prostate cancer cells. *Oncotarget* (2018) 9(43):27293–304. doi: 10.18632/oncotarget.25551

53. Ai R, Laragione T, Hammaker D, Boyle DL, Wildberg A, Maeshima K, et al. Comprehensive epigenetic landscape of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Nat Commun* (2018) 9:1921. doi: 10.1038/s41467-018-04310-9
54. Devauchelle V, Marion S, Cagnard N, Mistou S, Falgarone G, Breban M, et al. DNA microarray allows molecular profiling of rheumatoid arthritis and identification of pathophysiological targets. *Genes Immun* (2004) 5:597–608. doi: 10.1038/sj.gene.6364132
55. Ren D, Minami Y, Nishita M. Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Genes Cells* (2011) 16(3):304–15. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01487.x
56. Sakamoto T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, et al. Critical roles of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma and production of matrix metalloproteinase-2 via  $\Delta Np63\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition. *Oral Oncol* (2017) 69:15–25. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.03.019
57. Cao Y, Wang X, Xu C, Gao Z, Zhou H, Wang Y, et al. 4-HPR impairs bladder cancer cell migration and invasion by interfering with the Wnt5a/JNK and Wnt5a/MMP-2 signaling pathways. *Oncol Lett* (2016) 12(3):1833–9. doi: 10.3892/ol.2016.4908
58. Halford M, Macheda ML, Stacker SA. “The RYK Receptor Family”. In: DL Wheeler, Y Yarden, editors. *Receptor Tyrosine Kinases: Family and subfamilies*. Totowa, NJ, USA: Humana Press (2015). p. 699–755. doi: 10.1007/978-3-319-11888-8\_15
59. Nomachi A, Nishita M, Inaba D, Enomoto M, Hamasaki M, Minami Y. Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. *J Biol Chem* (2018) 283(41):27973–81. doi: 10.1074/jbc.M802325200
60. Julian L, Olson MF. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* (2014) 5:e29846. doi: 10.4161/sgtp.29846
61. Li G, Zhang Y, Qian Y, Zhang H, Guo S, Sunagawa M, et al. Interleukin-17<sup>a</sup> promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF-kB/HIF-1 $\alpha$  pathway. *Mol Immunol* (2013) 53(3):227–36. doi: 10.1016/j.molimm.2012.08.018
62. García-Vicuña R, Gómez-Gavero MV, Domínguez-Luis MJ, Pec MK, González-Alvaró I, Alvaró-Gracia JM, et al. CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* (2004) 50(12):3866–77. doi: 10.1002/art.20615
63. Lao M, Shi M, Zou Y, Huang M, Ye Y, Qiu Q, et al. Protein Inhibitor of Activated STAT3 Regulates Migration, Invasion, and Activation of Fibroblast-like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* (2016) 196(2):596–606. doi: 10.4049/jimmunol.1403254
64. Mackie SL, DeJaco C, Appenzeller S, Camellino D, Duftner C, Gonzalez-Chiappe S, et al. British Society for Rheumatology guideline on diagnosis and treatment of giant cell arteritis: executive summary. *Rheumatol (Oxford)* (2020) 59(3):487–94. doi: 10.1093/rheumatology/kez664
65. Tong B, Wan B, Wei Z, Wang T, Zhao P, Dou Y, et al. Role of cathepsin B in regulating migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes into inflamed tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* (2014) 177(3):586–97. doi: 10.1111/cei.12357
66. Okamoto H, Yoshio T, Kaneko H, Yamanaka H. Inhibition of NF-kB Signaling by Fasudil as a Potential Therapeutic Strategy for Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* (2010) 62(1):82–92. doi: 10.1002/art.25063
67. Foulquier S, Daskalopoulos EP, Lluri G, Hermans KCM, Deb A, Blankestijn WM. WNT signaling in cardiac and vascular disease. *Pharmacol Rev* (2018) 70(1):68–141. doi: 10.1124/pr.117.013896
68. Wang Y, Chang H, Rattner A, Nathans J. Frizzled receptors in development and disease. *Curr Top Dev Biol* (2016) 117:113–39. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.11.028

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Rodríguez-Trillo, Mosquera, Pena, Rivas-Tobío, Mera-Varela, González and Conde. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



**DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO**

Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

**CERTIFICA:**

Que este Comité evaluó en su reunión del día 18 de enero de 2018 el estudio:

**Título:** Nuevos biomarcadores y tratamientos a partir del fenotipo agresivo de los sinoviocitos en la artritis reumatoide

**Promotor:** Instituto de Salud Carlos III

**Tipo de estudio:** Outros

**Versión:**

**Código del Promotor:**

**Código de Registro:** 2017/521

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humana, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Postautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y la Circular nº 07/2004, de investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos da Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del estudio **por el/la investigador/a del centro:**

Centros	Investigadores Principales
IDIS-CHUS	Carmen Conde Muro

En Santiago de Compostela, a 23 de enero 2018.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



Guillermo José Prada Ramallal



Se emite un dictamen **FAVORABLE CONDICIONADO** a aclarar el punto 3.1 de las primeras aclaraciones solicitadas.

NOTA: Se recuerda que para la valoración de las condiciones por parte del Comité, se debe aportar, junto a la nueva versión del protocolo que incluya las oportunas modificaciones resaltadas e identificadas, un documento dónde se expliciten cada una de las aclaraciones aportadas y la ubicación exacta en el nuevo protocolo.

En Santiago de Compostela, a 23 de enero de 2018.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



Guillermo José Prada Ramallal





Guillermo José Prada Ramallal, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

### HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes (RD 1090/2015 de ensayos clínicos, y la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica).

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

- **Juan Manuel Vázquez Lago (Presidente).** Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta).** Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Guillermo José Prada Ramallal (Secretario).** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Ramón Domínguez.
- **Lorenzo Armenteros del Olmo (Vicesecretario).** Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Francisco Campos Pérez.** Biólogo. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
- **Rosana Castelo Domínguez.** Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Ricardo García Martínez.** Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Jaime Gulín Dávila.** Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **Victor Herrán Carreira.** Paciente. ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
- **María Jesús Lamas Díaz.** Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Carlos Rodríguez Moreno.** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
- **Rafael Carlos Vidal Pérez.** Médico especialista en Cardiología. Área de Gestión Integrada de Lugo.
- **María Jesús Wandosell Picatoste.** Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor/investigador, en Santiago de Compostela, a 23 de enero de 2018.

El Secretario del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,



Guillermo José Prada Ramallal



XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL  
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do  
Medio Rural e do Mar

Edificio administrativo Monelos  
Vicente Ferrer, 2  
15071 A Coruña

galicia

REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA  
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DA CORUÑA  
A CORUÑA

Data: 21/07/2014 09:45:38

SAÍDA 77424 / RX 648373



Carmen Conde Muro  
Centro de Investigación en Medicina  
Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS)  
Avda. Barcelona, 22  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña)

Ref.: JLPV/lld

## NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DUNHA AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

**Expediente núm.:** 15010/14/004

**Data de inicio:** 01-05-2014

**Interesado:** Carmen Conde Muro

**Forma de inicio:** solicitude do interesado

**Procedemento:** resolución de autorización

Notifícolle que con data 17 de xullo de 2014, o xefe territorial da Consellería do Medio Rural e do Mar emitiu unha resolución de autorización de proxectos de experimentación animal, cuxo texto íntegro é o seguinte:

### ANTECEDENTES

O interesado, como representante do centro CIMUS (Universidade de Santiago de Compostela), presentou con data 12-05-2014 e rexistro de entrada 55265 RX 458101, unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal, cuxos datos se detallan a continuación:

**Denominación do proxecto:** Análise do papel de diferentes proteínas sobre a incidencia e severidade da artrite en ratos

**Nome do centro usuario:** CIMUS (USC)

**Persoa responsable do proxecto:** Carmen Conde Muro

**Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo):** CIMUS (USC)

**Clasificación do proxecto :** Tipo I  Tipo II  Tipo III

### CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1. O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE núm. 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
2. O artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común (BOE núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL  
DA CORUÑA

Xefatura Territorial da Consellería do  
Medio Rural e do Mar

Edificio administrativo Monelos  
Vicente Ferrer, 2  
15071 A Coruña

galicia

3. O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto, realizada polo órgano habilitado Sección de Experimentación animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3 de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto 46/2012, de 19 de xaneiro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e do Mar e do Fondo Galego de Garantía Agraria.

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

1. Autorizar o proxecto solicitado.
2. Notificarlle esta resolución ao interesado.

O mencionado proxecto non deberá someterse a unha avaliación retrospectiva.

A autorización deste proxecto terá unha duración de 5 anos, transcorridos os cales, deberá ser renovada esta autorización.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida, no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirada, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor recurso de alzada ante a conselleira de Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia no prazo dun mes contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 30/1992, do 26 de novembro, (BOE núm.: 285, 27 de novembro de 1992), de réxime xurídico das administracións públicas e do procedemento administrativo común na súa redacción dada pola Lei 4/1999, do 13 de xaneiro.

A Coruña, 17 de xullo de 2014  
O xefe do Servizo de Gandaría

  
Eugenio Romero Senande





## RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

**Expediente núm.:** 15012/2020/009  
**Persoa solicitante:** Anxo Vidal Figueroa  
**Forma de inicio:** solicitude da persoa interesada

**Data de inicio do expediente:** 26.10.2020  
**Procedemento:** resolución de autorización

### ANTECEDENTES

Anxo Vidal Figueroa, en representación do Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA), presentou con data 26.10.2020 unha solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal (entrada no Rexistro Electrónico da Xunta de Galicia 2020/2052836), cuxos datos se detallan a continuación:

**Denominación do proxecto:** *Análise do papel de diferentes proteínas (incluídas as da vía de sinalización Wnt5a) sobre a incidencia e severidade da artrite en ratos*

**Nome do centro usuario:** Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA) da Universidade de Santiago de Compostela

**Persoa responsable do proxecto:** Carmen Conde Muro

**Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo):** Centro de Biomedicina Experimental (CEBEGA)

**Clasificación do proxecto :** Tipo I  Tipo II  Tipo III

### CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

1 O Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (BOE 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.

2 O artigo 88 da Lei 39/2015, de 1 de outubro, do procedemento administrativo común das administracións públicas (BOE 236, do 2 de outubro de 2015) establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas deste.





3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O proxecto non precisa someterse a unha avaliación retrospectiva.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo deberá ser renovada.

A citada autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandaría.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícaselle a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.





**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: <b>RODRÍGUEZ TRILLO</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>ÁNGELA</b>		DNI / IDNI / Identity card number: <b>47370902X</b>
1.3. Categoría / Categoría / Category: <b>"a"</b>	1.4. Especies / Especies / Species: <b>ROEDORES LAGOMORFOS PEIXES E ANFIBIOS</b>	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: <b>2.04.2023</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>a167</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e endereço do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:  <b>AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA Rúa do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)</b>		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / Fax / Fax: <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: <b>formacion.cmm@xunta.es</b>
3.5. Data / Fecha / Date: <b>13/02/2019</b>	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature 3.8. Selo / Sello / Stamp  <b>Asdo: Manuel Rodríguez Vázquez Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria</b>		



**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA  
"A" COIDADADO DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

**MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS**

- 1.- Lexislación nacional (1 hora).
- 2.- Ética, benestar animal e as "tres erres", nivel 1 (2 horas).
- 3.- Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).
- 4.- Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).
- 5.- Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia ( 3 horas).
- 6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA "A"**

- 1.-Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)
- 

**MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES**

- 1.- Legislación nacional (1 hora).
- 2.- Ética, bienestar animal y las "tres erres", nivel 1 (2 horas).
- 3.- Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).
- 4.- Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).
- 5.- Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia ( 3 horas).
- 6.- Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)

**MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA "A"**

- 1.-Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)



**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: <b>RODRÍGUEZ TRILLO</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>ÁNGELA</b>		DNI / IDNI / Identity card number: <b>47370902X</b>
1.3. Categoría / Categoría / Category: <b>"b"</b>	1.4. Especies / Especies / Species: <b>ROEDORES, LAGOMORFOS, PEIXES E ANFIBIOS</b>	1.5. Válido ata / válido hasta / expires: <b>2.04.2023</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>b377</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:  <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)</b>		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / Fax / Fax: <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: <b>formacion.cmrm@xunta.es</b>
3.5. Data / Fecha / Date: <b>13/02/2019</b>	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature  <b>Asdo: Manuel Rodríguez Vázquez Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria</b>		



## **MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA “B” EUTANASIA DOS ANIMAIS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

### **MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS**

- 1.- *Lexislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as “tres erres”, nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia ( 3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

### **MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA “B”**

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*

---

### **MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las “tres erres”, nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia ( 3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

### **MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA “B”**

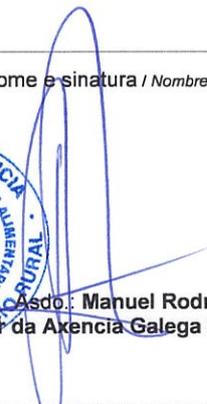
- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 2 (3 horas)*





**Certificado de capacitación en materia de protección de animais utilizados, criados ou subministrados con fins de experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia conforme coa Orde ECC/566/2015 de 20 de marzo.**

*Certificado de capacitación en materia de protección de animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia conforme con la Orden ECC/566/2015 de 20 de marzo.*

<b>1. IDENTIFICACIÓN</b>		
1.1. Apelidos / Apellidos / Surname: <b>RODRÍGUEZ TRILLO</b>		
1.2. Nome / Nombre / First names: <b>ÁNGELA</b>		DNI / DNI / Identity card number: <b>47370902X</b>
1.3. Categoría/Categoría/Category: <b>"C"</b>	1.4. Especies/Especies/Species: <b>ROEDORES, LAGOMORFOS, PEIXES E ANFIBIOS</b>	1.5. Válido ata/ válido hasta/expire: <b>2.04.2023</b>
<b>2. Nº DO CERTIFICADO / Nº DEL CERTIFICADO / CERTIFICATE NUMBER</b>		
<b>c418</b>		
<b>3. ORGANISMO QUE EXPIDE O CERTIFICADO / ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO / BODY ISSUING THE CERTIFICATE:</b>		
3.1. Nome e enderezo do organismo que expide o certificado / Nombre y dirección del organismo que expide el certificado / Name and address of the body issuing the certificate:  <b>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL – XUNTA DE GALICIA AXENCIA GALEGA DA CALIDADE ALIMENTARIA Avda. Do Camiño Francés, 10 baixo 15781 Santiago de Compostela A Coruña (España)</b>		
3.2. Teléfono / Teléfono / Telephone: <b>981 546 654</b>	3.3. Fax / Fax / Fax: <b>981 546 651</b>	3.4. Correo electrónico / Correo electrónico / Email: <b>formacion.cmm@xunta.es</b>
3.5. Data / Fecha / Date: <b>13/02/2019</b>	3.6. Lugar / Lugar / Place: <b>Santiago de Compostela</b>	
3.7. Nome e sinatura / Nombre y firma / Name and signature   <b>Asdo: Manuel Rodríguez Vázquez Director da Axencia Galega da Calidade Alimentaria</b>		





## **MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS E ESPECÍFICOS CORRESPONDENTES Á CATEGORÍA “C” REALIZACIÓN DOS PROCEDEMENTOS – ORDE ECC/566/2015, DE 20 DE MARZO**

### **MÓDULOS FUNDAMENTAIS OU TRONCAIS**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, benestar animal e as “tres erres”, nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Coidado, saúde e manexo dos animais, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Recoñecemento do dolor, o sufrimento e a angustia ( 3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

### **MÓDULOS ESPECÍFICOS DA CATEGORÍA “C”**

- 1.- *Bioloxía básica e adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedementos minimamente invasores sen anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedementos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervencións cirúrxicas ou procedementos prolongados ( 8 horas)*
- 6.- *Principios de cirurxía (5 horas)*

---

### **MÓDULOS FUNDAMENTALES O TRONCALES**

- 1.- *Legislación nacional (1 hora).*
- 2.- *Ética, bienestar animal y las “tres erres”, nivel 1 (2 horas).*
- 3.- *Biología básica y adecuada, nivel 1 (3 horas).*
- 4.- *Cuidado, salud y manejo de los animales, nivel 1 (5 horas).*
- 5.- *Reconocimiento del dolor, el sufrimiento y la angustia ( 3 horas).*
- 6.- *Métodos incruentos de sacrificio, nivel 1 (2 horas)*

### **MÓDULOS ESPECÍFICOS DE LA CATEGORÍA “C”**

- 1.- *Biología básica y adecuada, nivel 2 (3 horas)*
- 2.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 1 (5 horas)*
- 3.- *Procedimientos mínimamente invasivos sin anestesia, nivel 2 (10 horas)*
- 4.- *Anestesia para procedimientos menores (5 horas)*
- 5.- *Anestesia avanzada para intervenciones quirúrgicas o procedimientos prolongados ( 8 horas)*
- 6.- *Principios de cirugía (5 horas)*

