



Universidad de Santiago de Compostela

Trabajo de fin de
grado

Estudio del papel
de WNT5A en el
fenotipo agresivo
de los sinoviocitos
reumatoides

Grado en Biología

Curso 2017-2018

Zalvide Rodríguez, María

ÍNDICE:

1. RESUMEN:	1
2. INTRODUCCION:	2
3. OBJETIVO:	4
4. MATERIAL Y METODOS:	5
4.1. Cultivo celular de sinoviocitos tipo fibroblasto.	5
4.2. Silenciamiento de <i>WNT5A</i> y <i>RYK</i> :.....	5
4.3. Aislamiento de ARN	6
4.4. PCR en tiempo real con transcriptasa inversa (qRT-PCR)	6
4.5. Ensayo de migración celular.....	7
4.6. Análisis estadístico	8
5. RESULTADOS:.....	8
6. DISCUSIÓN:	14
7. CONCLUSIONES:	15
8. BIBLIOGRAFÍA:.....	16

1. RESUMEN:

La artritis reumatoide (AR) es una de las enfermedades crónicas más prevalentes a nivel mundial. Es una enfermedad autoinmune y sistémica que se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial. En muchos casos lleva a la destrucción de las articulaciones, produciendo graves deformidades y un deterioro de la calidad de vida.

En los últimos años el tratamiento de la artritis reumatoide ha avanzado mucho debido al desarrollo de nuevas terapias que han mejorado el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, en un número significativo de pacientes no se consigue un adecuado control de la enfermedad. Por ello, todavía es necesario la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Numerosos trabajos han mostrado la importancia del fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides en la patogenia de la AR. Sin embargo, todavía no se han desarrollado terapias frente a estas células.

El objetivo de este trabajo es analizar el papel de WNT5A en la migración de los sinoviocitos de pacientes con AR. Para ello, se trataron las células con WNT5A recombinante, se silenciaron los genes *WNT5A* y *RYK* y se analizó la migración mediante ensayos de “cierre de herida”.

Los resultados mostraron que WNT5A contribuye al incremento de la migración de los sinoviocitos reumatoides, aunque no se ha podido demostrar la implicación del receptor RYK en este efecto.

2. INTRODUCCION:

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, autoinmune e inflamatoria que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas, con distribución simétrica. Es una de las enfermedades crónicas más prevalentes, afectando hasta al 1% de la población mundial. Es más frecuente en mujeres que en hombres, con una relación 3:1 (Rauner et al., 2012). En el inicio de la enfermedad los pacientes presentan dolor e inflamación de las articulaciones con rigidez articular matutina, como consecuencia de la inflamación de la membrana sinovial o sinovitis. En primer lugar, afecta a una o unas pocas articulaciones y progresa, posteriormente, hacia una poliartritis simétrica. Como es una enfermedad sistémica, los pacientes presentan síntomas generales como fatiga, mialgias, pérdida de peso, depresión y manifestaciones extraarticulares, como aparición de nódulos reumatoides o afectaciones a nivel cardiaco, pulmonar, ocular o disminución de la masa ósea, entre otros. En consecuencia, esta enfermedad se asocia a un elevado grado de discapacidad, deterioro de la calidad de vida y aumento de la mortalidad (Aguirre et al., 2018).

En la etiología de la AR están implicados tanto factores epigenéticos como genéticos y ambientales (Sen, 2005). En la patogenia de la enfermedad se distinguen dos fases bien diferenciadas, la AR preclínica, en la que se produce la interacción de los factores de riesgo genéticos y ambientales para iniciar y propagar la respuesta autoinmune frente a antígenos desconocidos, con la producción de autoanticuerpos. Entre ellos, cabe destacar el factor reumatoide (FR) que es un anticuerpo frente a la fracción constante de las inmunoglobulinas y los anticuerpos anti-péptidos citrulinados, descritos más recientemente y que son específicos de la enfermedad.

La segunda fase de la AR es la efectora, que se caracteriza por la afectación de la membrana sinovial y la aparición de las manifestaciones clínicas. La membrana sinovial es una capa fina de tejido conectivo con dos tipos celulares, sinoviocitos A, tipo fibroblasto (FLS), y sinoviocitos B, tipo macrófago. Esta membrana recubre la cavidad articular de las articulaciones sinoviales (Klareskog, Catrina y Paget, 2009; McInnes, y Schett, 2011).

En esta fase, las células del sistema inmune activadas (monocitos/macrófagos, células T y B), los autoanticuerpos y los complejos inmunes infiltran el compartimento sinovial. En la membrana sinovial también proliferan y se activan las células residentes, FLS y macrófagos. Las células inmunes activadas y los FLS producen citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento que contribuyen a la hiperplasia de la membrana sinovial, característica de la AR. Los FLS migran y mediante la expresión de moléculas de adhesión, se adhieren al cartílago y llevan a la destrucción del mismo a través de la secreción de metaloproteasas y catepsinas (Firestein, 2014; Huber, 2006; McInnes y Schett, 2011). Además, los FLS contribuyen al daño óseo mediante la producción de RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa-B), que junto a las citoquinas inflamatorias llevan a la diferenciación de osteoclastos (Griffith, 2011; Pettit, Walsh, Manning, Goldring, y Gravallesse, 2006).

Por lo tanto, los FLS no son meros espectadores si no agresores activos, claves en la cronicidad y en el daño de la AR. Sin embargo, un aspecto del fenotipo agresivo de los FLS que no ha sido suficientemente estudiado es su capacidad de migración e invasión, así como las vías moleculares que regulan estos procesos. Un área inexplorada en estas células es la vía no canónica de WNT5A.

WNT5A es una glicoproteína secretada rica en cisteínas que pertenece a la familia *Wingless/integrase 1* (WNT). Los ligandos WNT juegan un papel esencial en el desarrollo y procesos fisiológicos mediante la regulación de varias funciones celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, apoptosis, supervivencia, adhesión, migración y polaridad. (Kikuchi, Yamamoto, Sato, y Matsumoto, 2012).

La señalización intracelular de WNT se divide en dos grandes vías, la β -catenina dependiente y la β -catenina independiente, también conocidas como vía canónica y no canónica, respectivamente. La más estudiada es la vía canónica, en la que WNT se une a un receptor FZD (*Frizzled*) y a un coreceptor LRP5/6 (receptor relacionado con proteínas LDL), dando lugar a un complejo multimérico, que lleva a la estabilización y translocación nuclear de la β -catenina, donde estimula la transcripción de genes diana. (Usami, Gunawardena, Iwamoto, y Enomoto-Iwamoto, 2016).

La ruta no canónica, sin embargo, está mucho menos estudiada y es muy compleja. Dependiendo del tipo celular y de la unión del tipo de receptor, se activan diferentes cascadas de señalización. Hasta ahora se conocen al menos 2 vías diferentes: WNT/ Ca^{2+} , WNT/PCP (polaridad celular planar), que participan en la regulación de la migración y polaridad celular (Kumawat y Gosens, 2016).

Trabajos recientes han implicado la vía no canónica de WNT, WNT5A/ROR2 (*Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor*) y WNT5A/RYK, en los procesos de migración, invasión y metástasis en distintos tumores (Henry et al., 2015; Kim et al., 2010; Morioka et al., 2009). Además, la vía de WNT5A se ha implicado también en la regulación de la inflamación (Catalán et al., 2014; Halleskog et al., 2012; Kim et al., 2010), así como de la masa ósea (Maeda et al., 2012). Por lo tanto, el exceso de señalización a través de WNT5A podría contribuir al fenotipo agresivo de los sinoviocitos reumatoides mediante la regulación de su capacidad de migración e invasión, la cronificación de la inflamación y la inducción de pérdida ósea.

3. OBJETIVO:

Los avances en el conocimiento de la artritis reumatoide han permitido el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a controlar la autoinmunidad y la respuesta inflamatoria. Estos tratamientos han mejorado mucho el pronóstico, sin embargo, un porcentaje significativo de los pacientes no responde o lo hace parcialmente. Por lo tanto, sigue siendo necesario encontrar nuevas dianas terapéuticas.

El objetivo general del proyecto en el que se enmarca este trabajo es la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas en la artritis reumatoide investigando la vía no canónica de WNT5A

En concreto, el objetivo de este trabajo de fin de grado es analizar el papel de WNT5A en la capacidad de migración de sinoviocitos de pacientes con AR y los mecanismos moleculares implicados.

4. MATERIAL Y METODOS:

4.1. Cultivo celular de sinoviocitos tipo fibroblasto.

Los FLS se obtuvieron a partir de tejido sinovial de pacientes con AR sometidos a sinovectomía o a reemplazamiento articular. Estos pacientes cumplieron los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1987 (Arnett et al., 1988) para la clasificación de la AR. Para este experimento se siguieron las recomendaciones de la Declaración de Helsinki 2008 (Gómez, 2010) y la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal (Jefatura del Estado, 1999), tras la aprobación por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Xunta de Galicia.

Este tejido sinovial se trituró e incubó con 100 µg/ml de colagenasa en medio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM, Lonza, Suiza) sin suero fetal bobino (FBS), durante 3 horas a 37°C. Tras esta digestión, se recogieron los FLS y se mezclaron con 5mL de DMEM con 10% FBS (HyClone, GE Healthcare Life Sciences, UK), 1% penicilina/estreptomicina y 1% glutamina (ambos de Lonza, Suiza) y se centrifugaron durante 10 minutos a 1400 rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet para sembrar los FLS en 3 pocillos de placas P6 a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Se dejaron crecer estas células hasta obtener una confluencia de un 80-90%. En este momento, se congelaron.

Para la realización de los experimentos de este trabajo, se descongelaron sinoviocitos procedentes de 5 pacientes distintos con AR. Se mantuvieron en cultivo en placas P100 en medio DMEM con 10% de FBS, 1% de penicilina y 1% de glutamina, en una incubadora a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂. El medio se cambiaba cada 3 días y las células se utilizaron entre los pases 3 y 8 para la realización de todos los experimentos.

4.2. Silenciamiento de *WNT5A* y *RYK*:

Se suprimió la expresión de *WNT5A* o *RYK* en FLS de 5 pacientes con AR, mediante la técnica de transfección de ARN de interferencia (siARN, ácido ribonucleico pequeño de interferencia). Para

ello, los FLS se tripsinizaron, se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron 15×10^4 células/pocillo en placas P6, en medio DMEM con 10% FBS y 1% glutamina. Siguiendo el protocolo, las células se transfectaron con 50nM de siARN específico de *WNT5A* (*ON-TARGET plus Human WNT5A siRNA-SMART pool*), *RYK* (*ON-TARGET plus Human RYK siRNA-SMART pool*), o siARN control inespecífico de la transfección, todos de Dharmacon (*GE Healthcare Life Sciences*). La transfección se realizó con Dharmafect (Dharmacon) en medio Opti-MEM (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, MA, EEUU*). A las 6h se cambió el medio a DMEM 10% FBS, 1% penicilina/estreptomicina y 1% glutamina.

La eficacia del silenciamiento se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa cuantitativa (qRT-PCR) a las 24h de la transfección. En un ensayo previo se analizó la eficacia del silenciamiento utilizando dosis de 20nM o de 50nM siRNA. Los resultados mostraron un mayor silenciamiento con la dosis de 50nM, que fue la utilizada en los experimentos.

4.3. Aislamiento de ARN

El ARN total de los FLS transfectados se obtuvo mediante purificación en columna, utilizando el kit de extracción *Speedtools Total RNA Extraction kit 250 rxns* (Biotools, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones del ARN obtenido se determinaron en el espectrofotómetro *NanoDrop* (*Life Technologies, Thermo Fisher Scientific*).

4.4. PCR a tiempo real con transcriptasa reversa (qRT-PCR)

Esta técnica se utilizó para analizar los niveles de expresión de ARNm de *WNT5A* y *RYK* en FLS tras el silenciamiento. Mediante la enzima transcriptasa reversa, se retrotranscribe una hebra de ARN en ADNc (ácido desoxirribonucleico complementario). Para la PCR a tiempo real se utilizó SYBR Green I, que permite cuantificar la cantidad de ADN que hay para un determinado gen. El SYBR Green se une a dobles moléculas de ADN aumentando su fluorescencia, por lo que la fluorescencia incrementa proporcionalmente a la concentración de ADN.

La RT-qPCR se realizó en el termociclador *Rotor Gene 6000* (*Corbett Research, Sydney, Australia*) a partir de 50ng de ARN por muestra y por reacción, en duplicado, usando los reactivos One-Step Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qRT-PCR (*Agilent Technologies, CA, USA*).

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 10 minutos de 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 cebadores para *RYK*, *WNT5A* y actina fueron adquiridos en Quiagen (Hilden, Alemania).

Los niveles de expresión del ARN mensajero de los genes se cuantificaron mediante el método comparativo, utilizando como control de normalización el gen de la β -actina, donde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen}} - Ct_{\beta\text{-actina}}$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\beta\text{-actina}})_{\text{NT}} - (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\beta\text{-actina}})_{\text{siARN}}$$

En los sinoviocitos silenciados, el valor $2^{-\Delta Ct}$ indica la expresión del gen relativa a la expresión de la β -actina y el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica el incremento o disminución de la expresión del gen respecto al no transfectado (NT). El valor de $\Delta\Delta Ct$ en no transfectado (NT) se consideró igual a 0, y $2^0 = 1$.

4.5. Ensayo de migración celular.

Con el fin de analizar el efecto de WNT5A recombinante y del silenciamiento de *WNT5A* y *RYK* sobre la migración de los FLS de pacientes con AR, se utilizó un ensayo de migración con la ayuda de Insertos de Cultivo Ibidi (Ibidi®, Martinsried, Alemania). Cuando estos insertos de silicona se colocan sobre una superficie de cultivo celular, dan lugar a dos depósitos separados por una pared de 500 μm de espesor. En cada depósito se cultivaron 7500 células y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia. Después, el inserto de silicona se retiró de la superficie, dando lugar a dos regiones de células separadas por una zona de 500 μm de superficie. Después se trataron por triplicado con 400ng/ml de WNT5A recombinante, 10ng/ml de TNF o TNF+WNT5A en medio DMEM, 1%FBS, 1%penicilina/estreptomina y 1%glutamina. Se realizaron fotos en el microscopio Axio Ver.A1 (ZEISS, EEUU, California) a 0 y 96h tras el tratamiento, y se cuantificó el área restante entre los dos depósitos, utilizando el software *Image J* (*National Institutes of Health, EEUU*). En la figura 1B se observa un esquema representativo de la técnica. Sólo se consideraron los valores obtenidos en cada tratamiento con un coeficiente de variación menor del 20%.

4.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism*, donde las variables obtenidas se compararon mediante un test estadístico no paramétrico U de *Wilcoxon matched pairs test*, con un intervalo de confianza del 95%. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos.

5. RESULTADOS:

Con el fin de analizar el papel de WNT5A sobre la capacidad de migración de FLS de pacientes con AR, se utilizó un ensayo de migración con insertos de cultivo de Ibidi®, como se detalla en el apartado de material y métodos. Para ello, los sinoviocitos reumatoides se sembraron en los insertos y una vez alcanzada la confluencia, éstos se retiraron y las células se trataron con 400 ng/mL de WNT5A recombinante. Se fotografió el canal central inicial y a las 96h y se cuantificó el espacio ocupado por los FLS mediante *software Image J*.

Como se observa en la figura 1A, el tratamiento con WNT5A recombinante aumentó en un 48,5% la migración de los FLS en comparación con los controles no tratados ($p=0,0391$). Puesto que se ha descrito que el TNF induce migración en sinoviocitos reumatoides, (Zhang, Qian y Zhu, 2015), se analizó también el efecto de WNT5A sobre la migración inducida por TNF. Con este fin, se trataron las células con 10ng/ml de TNF o con el tratamiento combinado WNT5A+TNF. Los resultados mostraron que el TNF incrementó la migración de los sinoviocitos en un 93,5% cuando se comparó con los controles no tratados ($p= 0,039$), pero no potenció el efecto de WNT5A recombinante ($p= 0,1563$). Además, WNT5A tampoco potenció la migración inducida por TNF (Figura 1A).

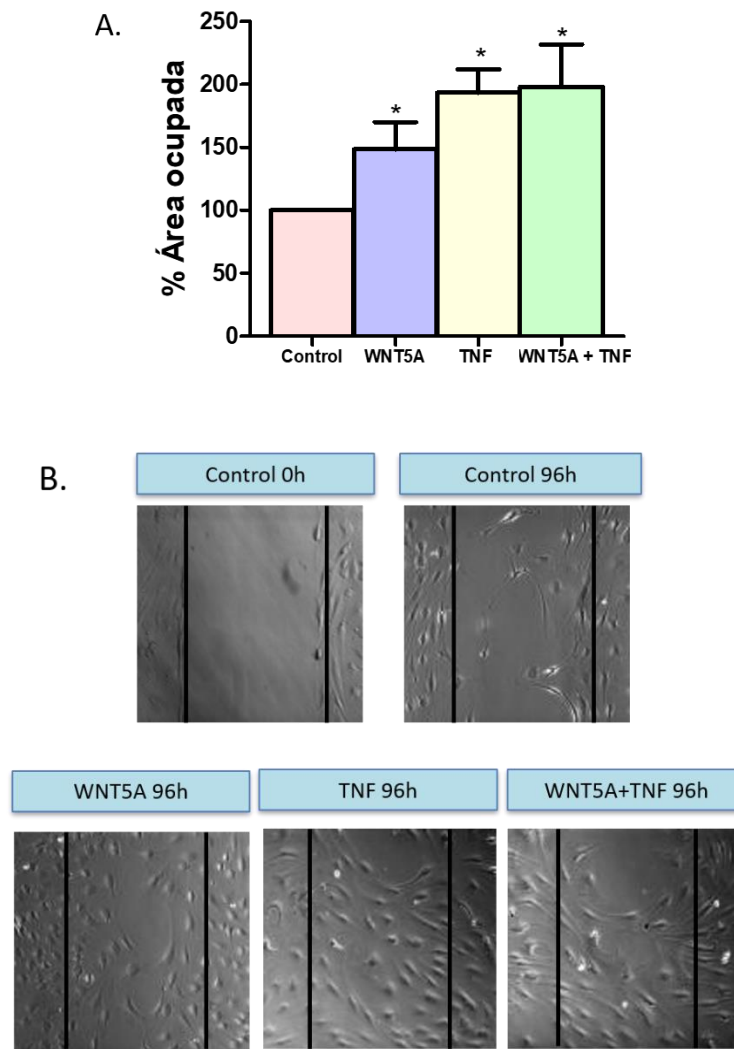


Figura 1. *El tratamiento con WNT5A recombinante incrementa la migración de los sinoviocitos reumatoides.* A. *Porcentaje del área ocupada por FLS de pacientes con AR tras 96h de tratamiento con 400ng/ml de WNT5A, 10ng/ml de TNF o WNT5A+TNF, con respecto al control, no tratado que se consideró el 100%. Los valores corresponden a la media±ESM (error estándar de la media) de 5 pacientes con AR. * indica $p < 0,05$ frente al control (test de Wilcoxon de datos pareados).* B. *Imágenes representativas a tiempos 0 y 96h.*

Con el fin de comprobar el efecto de WNT5A sobre la capacidad de migración de los FLS reumatoides, se analizó la migración tras el silenciamiento de WNT5A endógeno. Para ello, las células se

transfectaron con siARN específico para *WNT5A*, y se utilizaron como controles las células no transfectadas y transfectadas con siARN control. La eficiencia del silenciamiento se analizó determinando la expresión de ARNm de *WNT5A* mediante RT-PCR en tiempo real. La transfección con siARN de *WNT5A* redujo más de un 75% la transcripción del gen ($p=0,0071$) (Figura 2)

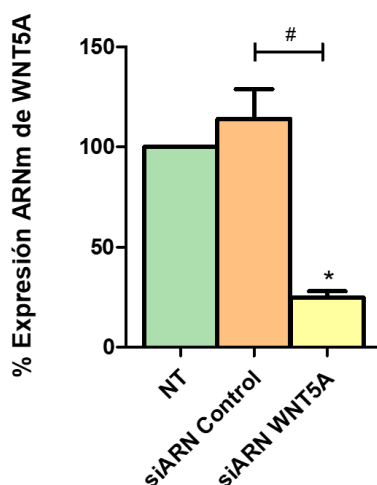


Figura 2. Análisis de la eficacia del silenciamiento. Porcentaje de expresión de ARNm de *WNT5A* en FLS con siARN *WNT5A* en relación con la expresión en FLS no transfectados. Los valores representan la media \pm ESM de FLS de 5 pacientes con AR. # indican $p<0,05$ (Wilcoxon matched paired test). Programa estadístico GraphPad Prism.

Posteriormente, se analizó el efecto del silenciamiento sobre la migración basal y la inducida por el tratamiento con 10ng/ml de TNF. Como se observa en la Figura 3A, la reducción de la expresión de *WNT5A* disminuyó la migración basal de los sinoviocitos reumatoides en un 28% cuando se comparó con el silenciamiento control ($p=0,0313$) y redujo un 17% la migración inducida por TNF, en comparación con el silenciamiento control tras el estímulo inflamatorio ($p= 0,0313$).

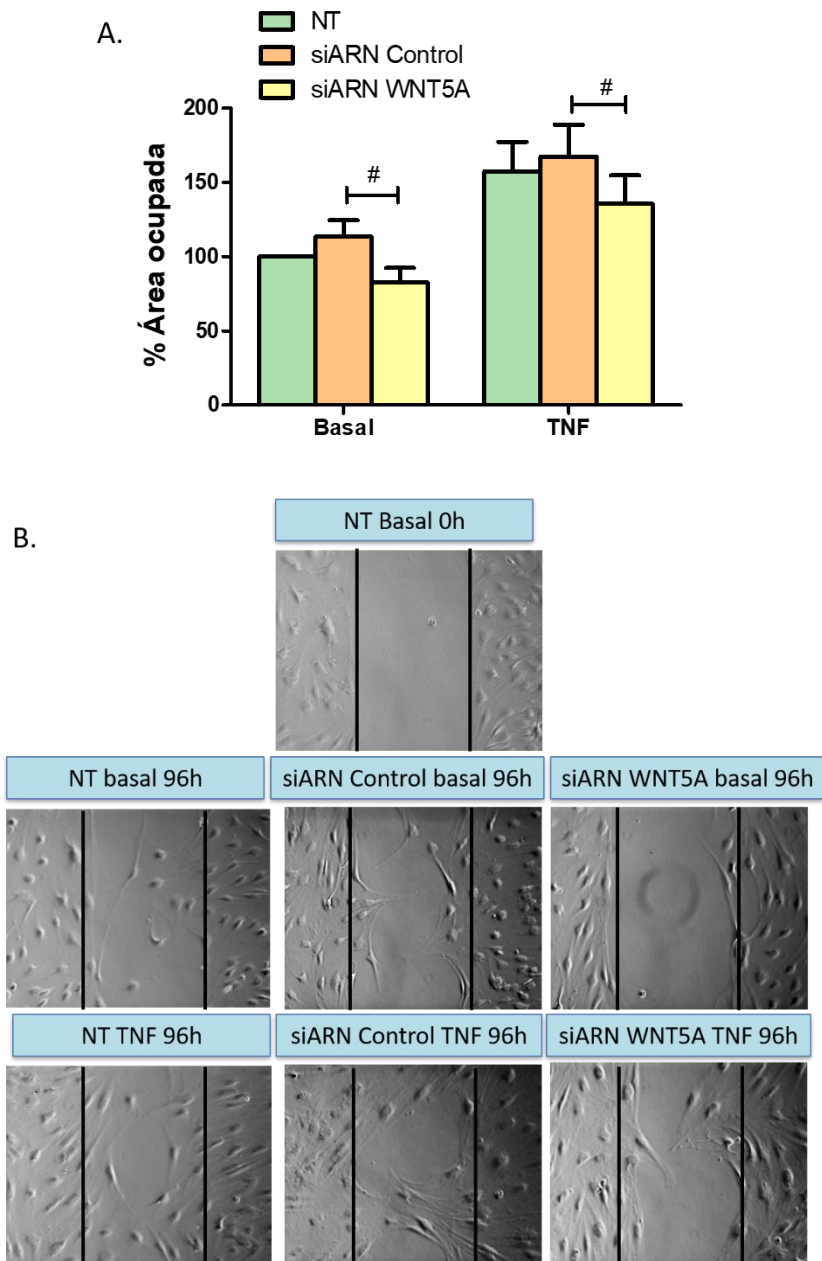


Figura 3 El silenciamiento de WNT5A reduce la capacidad de migración de los sinoviocitos reumatoides. A. Porcentaje del área ocupada por sinoviocitos reumatoides no transfectados o transfectados con siARN WNT5A o siARN control, en condiciones basales o tras 96h de tratamiento con 10ng/ml de TNF con respecto al no transfectado, sin tratar, que se consideró el 100%. Los valores se expresan como la media \pm ESM de FLS de 5 pacientes con AR. B. Imágenes representativas a tiempos 0 y 96h.

Con el fin de analizar los mecanismos moleculares implicados en el efecto de WNT5A sobre la migración de los sinoviocitos reumatoides y basándonos en datos previos obtenidos en el laboratorio, se analizó la contribución del receptor similar a tirosina quinasa (RYK). Los análisis de expresión de receptores de la vía WNT5A habían mostrado que los sinoviocitos reumatoides expresan FZD2, FZD5, FZD7, ROR1, ROR2 y RYK, con predominio de la expresión de ROR1 y RYK.

En este trabajo se analizó el papel del receptor RYK en la señalización de WNT5A en FLS de pacientes con AR mediante la disminución de su expresión. Para ello, las células se transfectaron con siARN específico para *RYK* o siARN control y se analizó la eficiencia del silenciamiento mediante RT-PCR en tiempo real. La transfección con siARN de *RYK* redujo la expresión del gen en un 71,5% ($p=0,0313$, Figura 4).

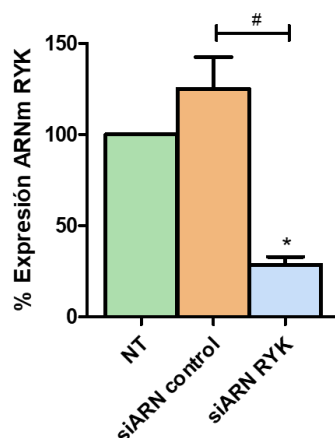


Figura 4. Eficacia del silenciamiento. Porcentaje de expresión de ARNm de *RYK* en sinoviocitos transfectados con siARN *RYK* en relación con la expresión en no transfectados, que se consideró 100%. Los valores representan la media \pm ESM de FLS de 5 pacientes con AR.

Posteriormente, se analizó el efecto de la disminución de la expresión de *RYK* sobre la migración espontánea y la inducida por WNT5A en FLS reumatoides. Para ello, FLS no transfectados o transfectados con siARN control o siARN *RYK* fueron tratados o no con 400ng/ml de WNT5A recombinante. Los resultados mostraron que la reducción de la expresión de *RYK* no modificó la migración espontánea, ni la inducida por WNT5A, puesto que no se observaron diferencias significativas entre los FLS no transfectados y los transfectados con siARN control o siARN *RYK* (Figura 5A).

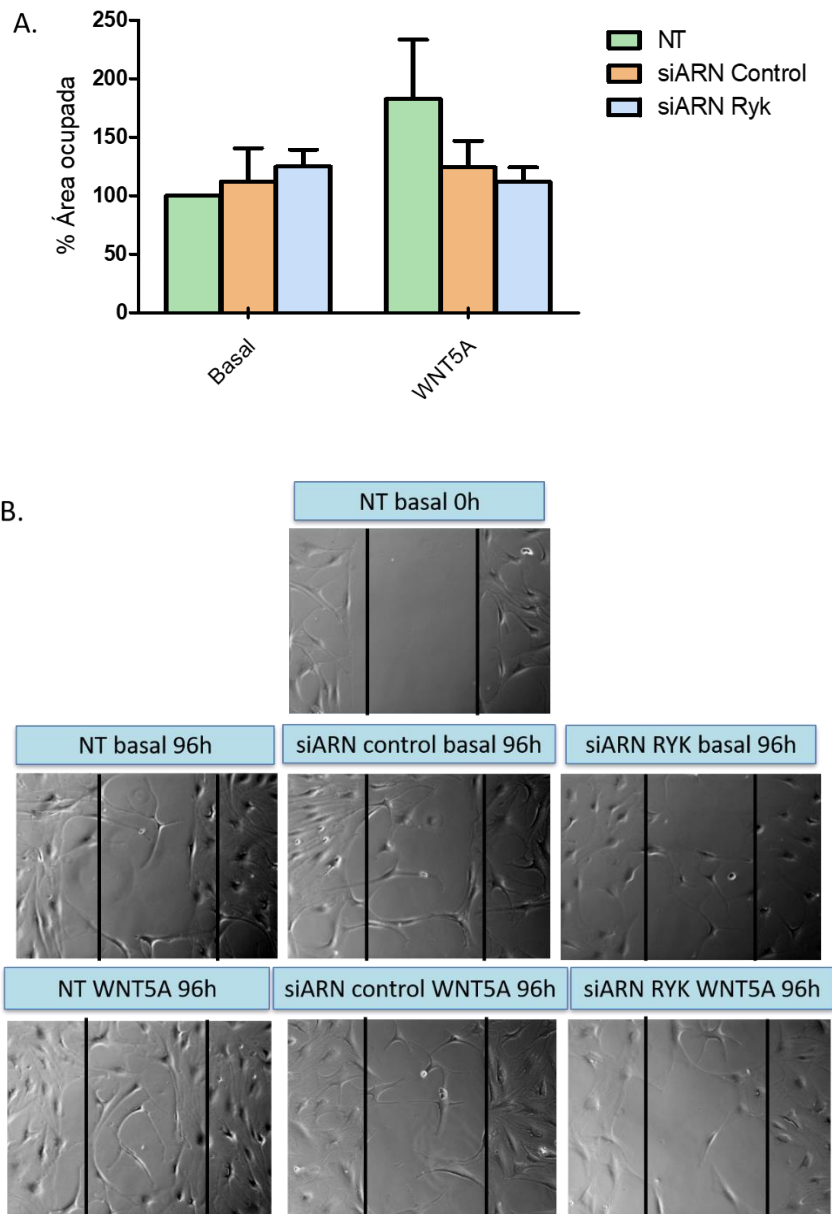


Figura 5. La supresión de RYK no modifica la migración basal ni la inducida por WNT5A de FLS reumatoides. A. Porcentaje del área ocupada por sinoviocitos reumatoides no transfectados o transfectados con siARN RYK o siARN control, en condiciones iniciales o tras 96h de tratamiento con 400ng/ml de WNT5A con respecto al no transfectado, sin tratar, que se consideró el 100%. Los valores se expresan como la media \pm ESM de FLS de 5 pacientes con AR. B. Imágenes representativas a tiempos 0 y 96h.

6. DISCUSIÓN:

En la patogenia de la AR, los FLS tienen un papel esencial. Como se ha comentado en la introducción, con la evolución de la enfermedad se producen cambios en los sinoviocitos reumatoides adquiriendo un fenotipo agresivo. En este fenotipo destaca la capacidad de migración e invasión de los FLS, que provoca finalmente la destrucción del cartílago y hueso. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos que regulan esta transformación puede ser clave para encontrar nuevos tratamientos que permitan un mejor control de la enfermedad

En este trabajo hemos analizado el papel de WNT5A en la capacidad de migración de sinoviocitos de pacientes con AR y los resultados han mostrado que WNT5A contribuye al aumento de la migración de estas células. En efecto, el tratamiento con WNT5A recombinante aumentó la migración espontánea de los sinoviocitos reumatoides y, más importante, la reducción de la expresión de WNT5A endógeno en estas células disminuyó significativamente la migración espontánea y la inducida por un estímulo inflamatorio.

En nuestro conocimiento, es la primera vez que se implica la vía no canónica de WNT5A en la migración de los FLS, aunque ya había indicios de que podía ser así, pues estudios de Marwa S. Asem et al. (2016), recientemente asociaron la formación de elementos esenciales en la migración celular con la ruta no canónica de WNT/PCP (Asem, Buechler, Wates, Miller, y Stack, 2016). Además, este efecto ya ha sido descrito en distintos tipos de cáncer. Así, en el cáncer nasofaríngeo, el silenciamiento de *WNT5A* disminuyó notablemente la migración e invasión de las células tumorales (Qin et al., 2015). Un efecto similar se observó con un anticuerpo anti-WNT5A, en un modelo de cáncer gástrico. En este trabajo, el tratamiento con el anticuerpo inhibió la capacidad de migración e invasión de células de cáncer gástrico en un ensayo *in vitro*. Además, en este mismo estudio se observó que el tratamiento con el anticuerpo inhibió la capacidad metastásica de las células de cáncer gástrico, en un ensayo experimental de metástasis hepáticas (Hanaki et al., 2012).

Para estudiar los mecanismos de señalización implicados en este aumento de la capacidad de migración, se analizó el papel del receptor RYK, ya que es uno de los receptores de mayor expresión en

los sinoviocitos reumatoides. Los resultados mostraron que la disminución de la expresión de RYK no redujo significativamente la migración espontánea, ni la inducida por el tratamiento con WNT5A. Estos resultados no se pueden considerar definitivos puesto que el tratamiento con WNT5A mostró una tendencia a disminuir la migración en los sinoviocitos transfectados con siARN control, en comparación con los no transfectados. Por lo tanto, este resultado indica que el propio proceso de transfección en combinación con el tratamiento con WNT5A parece afectar la capacidad funcional de estas células. Para descartar esta posibilidad, en el laboratorio se van a realizar nuevos experimentos en los que se analizará el efecto de un anticuerpo anti-RYK (Kessenbrock et al., 2017) sobre la migración espontánea e inducida por WNT5A de los sinoviocitos reumatoides.

Sin embargo, es posible que, a pesar de la nueva aproximación experimental, no se observe cambio en la migración, lo que podría indicar que RYK no estuviera implicado o que otro receptor como ROR1 participara también en la señalización y compensara la ausencia del primero. En esta línea, próximamente en el laboratorio se va a estudiar el efecto de la ausencia del receptor ROR1.

7. CONCLUSIONES:

- Los resultados de este trabajo muestran que WNT5A contribuye al aumento de la capacidad de migración observada en los sinoviocitos reumatoides.
- Estos datos, sin embargo, no han permitido establecer la implicación de RYK en la vía de señalización molecular implicada en este efecto.

8. BIBLIOGRAFÍA:

- Aguirre, M.A., Alegre, J.J., Alperi, M., Álvaro-García, J.M., Andréu, J.L., Aringer, M., ... Vela, C.P. (2018). Artritis reumatoide. En Álvaro-García, J.M., y Ortiz, A. (Ed.), *Tratado SER de Diagnóstico y Tratamiento de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas*. (pp.311-327). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Arnett, F. C., Edworthy, S. M., Bloch, D. A., Mcshane, D. J., Fries, J. F., Cooper, N. S., ... Hunder, G. G. (1988). The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 31, 315-324.
- Asem, M. S., Buechler, S., Wates, R. B., Miller, D. L., y Stack, M. S. (2016). Wnt5a signaling in cancer. *Cancers*, 8(9).
- Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J., Rodríguez, A., Pérez-Hernández, A. I., Gurbindo, J., Ramírez, B., ... Frühbeck, G. (2014). Activation of noncanonical wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(8), 1407–1417.
- Firestein, G. S. (2014). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 9(1), 24–33.
- Griffith, R. (2011). Consent to examination and treatment. *British Journal of Midwifery*, 19(1), 44–46.
- Gómez, A. (2010). Nuevos criterios de clasificación de artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 6, 33–37.
- Halleskog, C., Dijksterhuis, J. P., Kilander, M. B. C., Becerril-Ortega, J., Villaescusa, J. C., Lindgren, E., ... Schulte, G. (2012). Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 1–15

- Hanaki, H., Yamamoto, H., Sakane, H., Matsumoto, S., Ohdan, H., Sato, A., y Kikuchi, A. (2012). An Anti-Wnt5a Antibody Suppresses Metastasis of Gastric Cancer Cells In Vivo by Inhibiting Receptor-Mediated Endocytosis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(2), 298–307.
- Henry, C., Llamosas, E., Knipprath-Meszaros, A., Schoetzau, A., Obermann, E., Fuenfschilling, M., ... Ford, C. (2015). Targeting the ROR1 and ROR2 receptors in epithelial ovarian cancer inhibits cell migration and invasion. *Oncotarget*, 6(37), 40310–40326.
- Huber, L. C. (2006). Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 45(6), 669–675.
- Jefatura del Estado. (1999). 23750 LEY ORGÁNICA 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. *Boe*, 298, 43088–43099.
- Kessenbrock, K., Smith, P., Steenbeek, S. C., Pervolarakis, N., Kumar, R., Minami, Y., ... Werb, Z. (2017). Diverse regulation of mammary epithelial growth and branching morphogenesis through noncanonical Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), 3121–3126.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., y Matsumoto, S. (2012). Wnt5a: Its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiologica*, 204(1), 17–33.
- Kim, J., Kim, J., Kim, D. W., Ha, Y., Ihm, M. H., Kim, H., ... Lee, I. (2010). Wnt5a Induces Endothelial Inflammation via β -Catenin-Independent Signaling. *The Journal of Immunology*, 185(2), 1274–1282.
- Klareskog, L., Catrina, A. I., y Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 373(9664), 659–672.
- Kumawat, K., y Gosens, R. (2016). WNT-5A: signaling and functions in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(3), 567–587.

- Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., Uehara, S., Ishihara, A., Mizoguchi, T., ... Takahashi, N. (2012). Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nature Medicine*, *18*(3), 405–412.
- McInnes, I. B., y Schett, G. (2011). The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Nejm*, *365*(23), 2205–2219.
- Morioka, K., Tanikawa, C., Ochi, K., Daigo, Y., Katagiri, T., Kawano, H., ... Matsuda, K. (2009). Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Science*, *100*(7), 1227–1233.
- Pettit, A. R., Walsh, N. C., Manning, C., Goldring, S. R., y Gravalles, E. M. (2006). RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, *45*(9), 1068–1076.
- Qin, L., Yin, Y.T., Zheng, F.J., Peng, L.X., Yang, C.F., Bao, Y.N., ... Qian, C.-N. (2015). WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget*, *6*(12), 10239–10252.
- Rauner, M., Stein, N., Winzer, M., Goettsch, C., Zwerina, J., Schett, G., ... Hofbauer, L. C. (2012). WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production. *Journal of Bone and Mineral Research*, *27*(3), 575–585.
- Sen, M. (2005). Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, *44*(6), 708–713.
- Usami, Y., Gunawardena, A. T., Iwamoto, M., y Enomoto-iwamoto, M. (2016). Wnt Signaling in Cartilage Development and Diseases: Lessons from Animal Studies. *Lab. Invest.*, *96*(2), 186–196.
- Zhang, Q. G., Qian, J., y Zhu, Y. C. (2015). Targeting bromodomain-containing protein 4 (BRD4) benefits rheumatoid arthritis. *Immunology Letters*. *166*(2), 103–108.