



P026 - Diseño de un modelo in vitro de estrés mecánico y evaluación sobre las respuestas inmunes innatas de los condrocitos

M. López Fagúndez¹, E. Franco-Trepat¹, A. Alonso-Pérez¹, M. Guillán-Fresco¹, A. Pazos-Pérez¹, A. Lois-Iglesias¹, A. Jorge-Mora¹, O. Gualillo² y R. Gómez¹

¹Musculoskeletal Pathology Group. Institute IDIS. Santiago University Clinical Hospital. Santiago de Compostela.

²Research laboratory 9 (NEIRID LAB). Institute of Medical Research. SERGAS. Santiago University Clinical Hospital. Santiago de Compostela.

Resumen

Introducción: La artrosis, OA en inglés, es la enfermedad reumática más común. Se caracteriza por el estrechamiento del espacio intraarticular debido a la progresiva degradación del cartílago. La carga mecánica ejerce un papel vital en el mantenimiento de los tejidos articulares. No obstante, una carga mecánica excesiva se ha asociado a la degradación del cartílago, creando un escenario patológico caracterizado por el desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz del cartílago. A nivel celular, este estímulo mecánico se transduce en una hiperactivación de múltiples rutas de señalización, entre ellas, la vía WNT. A pesar de que la OA es una enfermedad eminentemente mecánica, está descrita la presencia de un componente inflamatorio que contribuye al inicio y desarrollo de la OA. La progresiva degradación del cartílago produce patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que desatan respuestas inmunes a través de la activación de los receptores *toll-like* (TLR4).

Objetivos: 1. Aplicar una fuerza compresiva a una línea celular de condrocitos para determinar la expresión de genes marcadores de la activación de la vía WNT. 2. Estudiar el rol de la carga mecánica sobre las respuestas inflamatorias en los condrocitos. 3. Estudiar el rol de la activación de la vía WNT en los efectos de la carga mecánica sobre las respuestas inflamatorias de los condrocitos.

Métodos: El modelo de carga mecánica se diseñó empleando una centrífuga termostatazada y se aplicó sobre una línea condrogénica de ratón (ATDC5). Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio óptico. La expresión de genes (AXIN2, LCN2 e IL6) fue determinada mediante RT-PCR.

Resultados: La exposición de las células a estímulos cortos de centrifugación (7 y 15min) indujo la expresión de AXIN2 (ARNm) un marcador crítico de la activación de la vía WNT y nos permitió validar el modelo *in vitro* de carga mecánica. A continuación, establecimos el modelo para que mimetizase el ambiente del condrocito artrósico (0,2 Pa durante 2h). El vínculo entre el estrés mecánico y las respuestas inmunes innatas se comprobó al observar el estrés mecánico por sí solo indujo un aumento significativo, pero discreto, de la expresión de genes inflamatorios (LCN2 e IL6). No obstante, en combinación con un estímulo inflamatorio LPS [100 ng/ml], la expresión génica de LCN2 e IL6 se redujo por el estímulo mecánico. Al sustituir la estimulación mecánica por el tratamiento con Bio (6-bromoindirubin-3'-oxime), un conocido inductor de la vía WNT, se observó el

aumento significativo de la expresión de AXIN2. Sin embargo, el tratamiento o co-tratamiento con LPS, inhibió la expresión de AXIN2, lo que validó el vínculo negativo entre la inflamación y la carga mecánica. Además, el tratamiento con Bio potenció, aunque no de manera significativa, la expresión de LCN2 e IL6. Esto permitió demostrar que el efecto del estrés mecánico sobre la inflamación podría ser independiente de la vía WNT.

Conclusiones: Se demuestra que los estímulos mecánicos provocan una respuesta a nivel celular que activa la vía de señalización mecanosensibles WNT. Determinar la activación de la vía WNT nos permitió diseñar un modelo de estrés mecánico *in vitro* que nos facilitó el estudio del vínculo entre la carga mecánica y la inflamación. El estrés mecánico, independientemente de la vía WNT, es capaz de inducir una respuesta inflamatoria, a la vez que es capaz de reducirla en presencia de un ambiente inflamatorio mediado por el receptor TLR4.