



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACIÓN DE MICRORNAS INVOLUCRADOS EN LA DIFERENCIACIÓN DE  
MONOCITOS A OSTEOCLASTOS Y SU PAPEL EN LA VARIACIÓN DE LA  
DENSIDAD MINERAL ÓSEA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALDO HUGO DE LA CRUZ MONTOYA

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAFAEL VELÁZQUEZ CRUZ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DR. ALFREDO HIDALGO MIRANDA

FACULTAD DE MEDICINA

DR. CARLOS PÉREZ PLASENCIA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. JUNIO, 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de Genómica del Metabolismo Óseo del Instituto Nacional de Medicina Genómica con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Apoyos: CB-2013-1-221628 y INFR-2016-01-270405) y parcialmente del INMEGEN (217-14/2015/I).

## ÍNDICE

<b>RESÚMEN</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
Hueso .....	7
<i>Remodelado óseo.</i> .....	9
<i>Osteoblastos y osteocitos.</i> .....	12
<i>Osteoclastos.</i> .....	14
Osteoporosis .....	16
<i>Osteoporosis en México.</i> .....	19
<i>Factores genéticos</i> .....	22
<i>Factores nutricionales y estilo de vida.</i> .....	25
<i>Factores epigenéticos.</i> .....	28
miRNAs .....	29
<i>miRNAs en la diferenciación de osteoblastos.</i> .....	34
<i>miRNAs en la diferenciación de osteoclastos.</i> .....	37
Monocitos circulantes de sangre periférica como modelo de estudio de osteoclastos. .....	40
<b>OBJETIVOS</b> .....	43
Objetivo General.....	43
Objetivos Particulares .....	43
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44
Población de estudio.....	44
Aislamiento de monocitos circulantes de sangre periférica (CD14 <sup>++</sup> ). .....	46
Comprobación de pureza de células CD14 <sup>++</sup> por citometría de flujo. ....	46
Extracción de RNA total, cuantificación e integridad.....	47
Construcción de librerías de cDNA y secuenciación de RNAs pequeños. ....	47
Procesamiento de datos de secuenciación de RNAs pequeños.....	48
Análisis de expresión diferencial de microRNAs.....	48
Análisis por RT-qPCR.....	49
Predicción de genes blanco y análisis de enriquecimiento funcional. ....	49
Análisis de datos de microarreglos de expresión.....	50
Modelo de diferenciación celular <i>in vitro</i> de osteoclastos a partir de MCSP.....	50
Caracterización bioquímica, celular y molecular de osteoclastos. ....	51
Análisis funcional del miR-708-5p. ....	52
Análisis estadísticos.....	53

<b>RESULTADOS</b> .....	54
Características de la población de estudio. ....	54
Pureza de monocitos circulantes de sangre periférica (CD14 <sup>++</sup> ). ....	55
Análisis de datos de secuenciación de RNAs pequeños.....	56
miRNAs diferencialmente expresados en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis.....	60
Validación de miRNAs diferencialmente expresados por RT-qPCR .....	63
Predicción de genes blanco de miRNAs y análisis de enriquecimiento funcional.....	65
Predicción de genes blanco y validación.....	68
Modelo de diferenciación celular in vitro de la osteoclastogénesis a partir de monocitos circulantes humanos de sangre periférica. ....	70
Análisis funcional del miR-708-5p.....	75
<b>DISCUSIÓN</b> .....	77
<b>CONCLUSIONES</b> .....	87
<b>REFERENCIAS</b> .....	89

## RESÚMEN

La osteoporosis es el desorden esquelético más frecuente del metabolismo óseo debido a una alteración entre la actividad de reabsorción ósea de los osteoclastos y de formación ósea de los osteoblastos que resulta de la interacción de factores genéticos, ambientales y epigenéticos. Los microRNAs son RNAs pequeños no codificantes de cadena sencilla de alrededor de 22 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica mediante la unión a mRNAs blanco, causando su desestabilización postranscripcional. En este trabajo se identificaron microRNAs diferencialmente expresados en monocitos circulantes de sangre periférica entre mujeres postmenopáusicas mexicanas con osteoporosis y sin osteoporosis, mediante secuenciación de RNAs pequeños. Se identificaron seis microRNAs diferencialmente expresados entre los grupos de estudio: cuatro sobre regulados (miR-708-5p, miR-34b-5p, miR-3161 y miR-328-5p) y dos sub regulados (miR-4422 y miR-939-3p) en el grupo de mujeres con osteoporosis. La expresión diferencial fue validada por RT-qPCR y solo la sobre regulación del miR-708-5p fue estadísticamente significativa. Análisis bioinformáticos y de enriquecimiento funcional de genes blanco para miR-708-5p mostraron 15 vías de señalización asociadas al metabolismo óseo. Debido a que los monocitos circulantes de sangre periférica son células precursoras de osteoclastos, fueron identificados 10 genes blanco presentes en estas vías y descritos en la osteoclastogénesis. Adicionalmente, cinco de ellos (*AKT1*, *AKT2*, *PARP1*, *FKBP5* y *MP2K3*) se encontraron sub regulados en un set de datos independiente proveniente de microarreglos de expresión de monocitos circulantes de sangre periférica de 12 mujeres postmenopáusicas con osteoporosis. Esta es la primera vez que miR-708-5p ha sido identificado en monocitos circulantes de sangre periférica y asociado a osteoporosis

postmenopáusica. Estos resultados sugieren que miR-708-5p podría estar regulando la expresión de *AKT1*, *AKT2*, *PARP1*, *FKBP5* y *MP2K3* y participando de esta forma en el desarrollo de la osteoporosis. Adicionalmente, se estableció un modelo de diferenciación *in vitro* de la osteoclastogénesis a partir de monocitos circulantes de sangre periférica, se caracterizó a nivel bioquímico, celular y molecular. Este modelo celular será de gran importancia para futuros estudios, que junto con los resultados obtenidos en este trabajo, nos proporcionarán una visión más detallada de la regulación postranscripcional, la cual puede ser útil para identificar microRNAs y sus genes con potencial como blancos terapéuticos que puedan contribuir al tratamiento de la osteoporosis, así como para el posible uso de microRNAs como potenciales marcadores que posibiliten la detección temprana de esta enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

### Hueso

El hueso es un tejido altamente dinámico, el cual está compuesto por minerales entre un 50 y 70%, una matriz orgánica entre un 20 y 40%, agua entre un 5 a 10% y por lípidos en menos de un 3%. La mayoría del componente mineral del hueso es la hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , seguida por pequeñas cantidades de carbono, magnesio y fosfato. La fracción mineral le otorga al hueso rigidez mecánica y soporte de carga mientras que la matriz orgánica le da elasticidad y flexibilidad<sup>1</sup>. Los huesos se pueden dividir en cuatro categorías generales; huesos largos, cortos, planos e irregulares. Los huesos largos incluyen la clavícula, húmero, radio, cúbito, metacarpo, fémur, tibia, peroné, metatarso y falanges. Los huesos cortos incluyen el carpo, tarso, rotula y sesamoideo. Los huesos planos incluyen el cráneo, la mandíbula, la escápula, el esternón y las costillas. Los huesos irregulares incluyen las vértebras, el sacro, el coxis y el hioides<sup>2</sup>. Dentro del hueso existen dos diferentes tipos; el cortical, el cual cumple con una función mecano-protectora y el trabecular, el cual da fortaleza y tiene una función principalmente metabólica (Figura 1). El esqueleto adulto humano está compuesto por hueso cortical en un 80% y trabecular en un 20%, aunque esta proporción puede variar dependiendo de la zona. Por ejemplo, las vértebras tienen una proporción de hueso cortical y trabecular del 25:75, respectivamente. Sin embargo, esta proporción es del 50:50 en la cabeza del cuello femoral y del 95:5 en la diáfisis radial. El hueso trabecular alberga la mayor zona de remodelado óseo, por lo que es ahí donde se concentran la mayoría de las patologías óseas<sup>3</sup>.



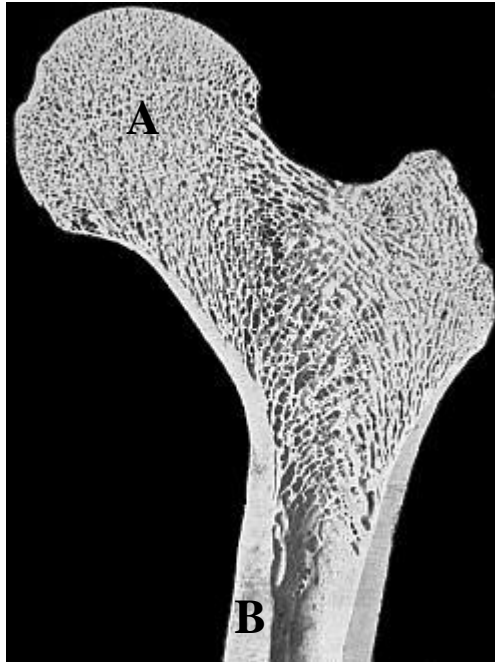


Imagen tomada de: <https://www.ilsb.tuwien.ac.at/~daxner/ictam-projekt/my-femur-section-small.jpg>.

**Figura 1. Tipos de hueso.** Hueso trabecular (A) y hueso cortical (B).

El esqueleto tiene diversas funciones, los huesos del esqueleto proveen un soporte estructural para el resto del cuerpo, permiten el movimiento y la locomoción, protegen estructuras y órganos vitales, regulan y mantienen la homeostasis mineral, sirven como reservorio de factores de crecimiento y citocinas y ofrecen un entorno de hematopoyesis dentro de los espacios medulares. El hueso experimenta crecimiento radial y longitudinal, modelado y remodelado a lo largo de la vida. El crecimiento radial en la etapa de desarrollo ocurre durante la niñez y la adolescencia mientras que el crecimiento longitudinal ocurre en las placas de crecimiento o placas epifisarias, donde el cartílago prolifera en la epífisis y metáfisis de los huesos largos, antes de someterse a la mineralización para formar hueso nuevo primario.

El modelado óseo es el proceso mediante el cual los huesos son moldeados por la acción independiente de los osteoblastos y osteoclastos. Esto quiere decir que las actividades de osteoblastos y osteoclastos no están necesariamente acopladas anatómica o temporalmente como es en el caso del remodelado óseo. Es importante mencionar que el modelado óseo es mucho menos frecuente que el remodelado en personas adultas, aunque el modelado podría verse incrementado en algunas patologías como el hipoparatiroidismo, osteodistrofia renal o tratamiento con anabólicos<sup>4</sup>.

#### *Remodelado óseo.*

El hueso es constantemente renovado durante la vida de cada individuo mediante un proceso denominado remodelado óseo, proceso fisiológico necesario que permite la remoción de hueso dañado, garantiza la homeostasis de calcio y sustituye hueso primario o infantil por hueso secundario, el cual es mecánicamente más competente. Este proceso se basa en la coordinación de tres células óseas principales, los osteoclastos, los osteoblastos y los osteocitos. Los osteoclastos son células hematopoyéticas, gigantes y multinucleadas que reabsorben hueso y los osteoblastos, células mesenquimales que forman hueso nuevo. Los osteocitos que son células que se originan a partir de los osteoblastos también tienen un papel importante en el remodelado óseo ya que cumplen con una función mecano-sensora<sup>5</sup>. Este proceso altamente complejo se puede dividir en cuatro etapas o fases (Figura 2).

*Fase de descanso/activación:* Las células de revestimiento óseas, que son osteoblastos quiescentes, pueden ser activadas por diferentes factores; una microfractura, una alteración mecánica percibida por los osteocitos o la secreción de diversos factores en el microambiente del hueso, como IGFI, TNF- $\alpha$ , PTH e IL-6. Esto lleva a las células de revestimiento a aumentar la expresión de RANKL, el cual interactúa con su receptor RANK, expresado por precursores de osteoblastos. La interacción RANKL/RANK inicia la fusión de células precursoras de y su diferenciación hacia osteoclastos, células multinucleadas con capacidad de reabsorción ósea.

*Fase de reabsorción:* Una vez que se han diferenciado, los osteoclastos se polarizan y se adhieren a la superficie del hueso para comenzar a reabsorberla. Para llevar a cabo esta fase, primero es necesario acidificar la matriz ósea para disolver la fracción inorgánica. Una vez acidificada, enzimas como la CTSK son secretadas y algunas metaloproteasas como la MMP9, ambas son encargadas de degradar la fracción orgánica del hueso. Una vez que cumplen con su función, los osteoclastos se van a apoptosis, esto con el fin de evitar una reabsorción ósea excesiva.

*Fase reversa:* Células macrófagas se encargan de remover los restos producidos durante la degradación de la matriz ósea.

*Fase de formación:* La reabsorción de la matriz mineral ósea lleva a la liberación de diversos factores de crecimiento como BMP, FGF y TGF- $\beta$ , responsables del reclutamiento de osteoblastos. Una vez reclutados, los osteoblastos comienzan a producir una nueva matriz ósea que inicialmente no se encuentra calcificada

denominada osteoide, la cual posteriormente será mineralizada para concluir el proceso de remodelado<sup>6</sup>.

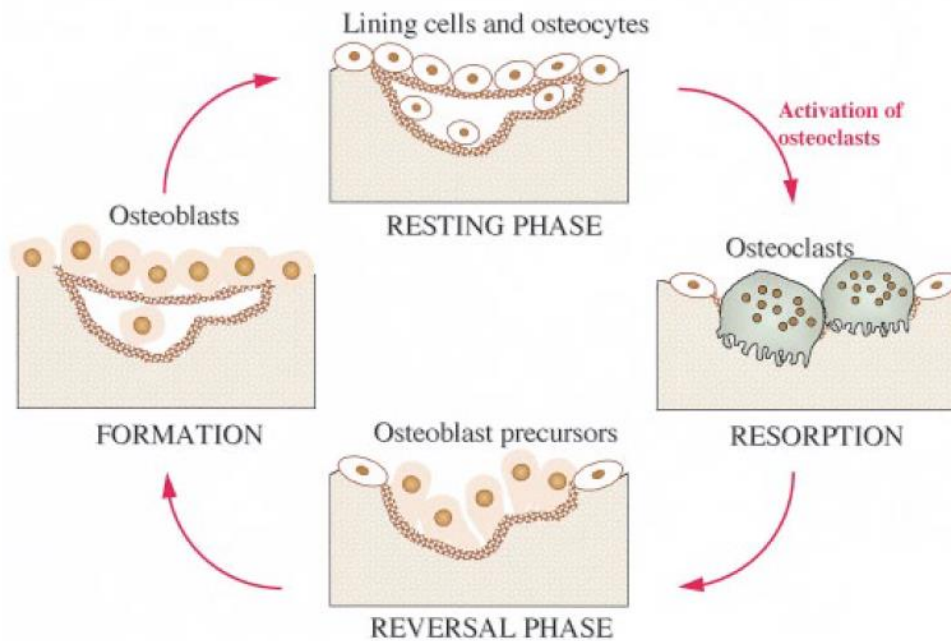


Imagen tomada de Kapinas, K., & Delany, A. M. (2011). MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis research & therapy*, 13(3), 220. doi:10.1186/ar3325.

**Figura 2. Fases del remodelado óseo.** *Fase de reabsorción:* Osteoclastos multinucleados activados provenientes de precursores monocíticos reabsorben un área específica de la matriz mineral ósea. *Fase reversa:* Precursores de osteoblastos, los cuales pueden proliferar y diferenciarse a osteoblastos, migran a la laguna de reabsorción. *Fase de formación:* Los osteoblastos depositan nueva matriz ósea no mineralizada (osteoide) llenando la laguna de reabsorción. *Fase de descanso/activación:* Embebidos en el osteoide, los osteoblastos maduran a osteocitos diferenciados. Los osteoblastos que yacen en la superficie del hueso recién formado son quiescentes hasta su activación.

### *Osteoblastos y osteocitos.*

Los osteoblastos se originan a partir de precursores mesenquimales que también dan origen a condrocitos, mioblastos, y adipocitos, dependiendo de los factores de transcripción por los que los precursores sean regulados. Dos de estos factores, *RUNX2* y *OSX* han sido identificados como controladores del linaje osteoblástico, ya que, en ausencia de ellos, no existe formación de osteoblastos. De la misma forma, las BMPs, miembros de una familia de factores de crecimiento, ofrecen señales específicas que son muy importantes para lograr la diferenciación osteoblástica<sup>7-9</sup>. De hecho, los osteoblastos únicamente tienen dos transcritos específicos, el que codifica para *RUNX2* y el que codifica para osteocalcina, un inhibidor de la función de osteoclastos que solo se expresa cuando las células se han diferenciado por completo<sup>10</sup>. *RUNX2*, *OSF2* y *AML3* son los encargados de dirigir la diferenciación al linaje osteoblástico<sup>7</sup>. Durante el desarrollo embrionario, *RUNX2* se expresa justo antes de la diferenciación de osteoblastos y únicamente en células mesenquimales comprometidas a diferenciarse hacia condrocitos u osteoblastos. Después, la expresión de este factor de transcripción se limita únicamente a osteoblastos y es requerida para la expresión de proteínas específicas de osteoblastos como la osteocalcina. También, a través de la regulación de la osteocalcina, *RUNX2* controla la formación de hueso mediante la diferenciación de osteoblastos. Parte de la importancia de *RUNX2* radica en que sitios de unión para este factor de transcripción, están presentes en las secuencias reguladoras de la mayoría de genes que son requeridos para la síntesis de matriz extracelular<sup>11</sup>. *OSX* es otro factor importante en la diferenciación de osteoblastos, el cual actúa río debajo de *RUNX2* induciendo la diferenciación de osteoblastos. Durante el proceso de diferenciación, los osteoblastos expresan patrones característicos de genes que los

diferencian de otros tipos celulares. COL1A1 se expresa desde el inicio de la diferenciación de osteoblastos y es el componente principal de la estructura de la matriz ósea. Por otro lado, la osteopontina, una proteína no colágena, junto con ALP, tienen un papel de estabilizadoras en la matriz. La osteocalcina es otra proteína no colágena que es casi exclusiva del hueso y se encuentra sobre regulada en las etapas tardías de diferenciación de osteoblastos, coincidiendo con el inicio de la mineralización, por lo que se cree que la osteocalcina tiene un papel importante en la regulación de este proceso<sup>12</sup>. Los osteoblastos tienen un papel muy importante en la formación y mantenimiento de la arquitectura esquelética, ya que no solo son responsables de la deposición de la matriz ósea, sino que también de la regulación de la actividad de los osteoclastos.

Los osteoblastos son células que no han llegado a su estado de diferenciación terminal y a medida que se van diferenciando, van adquiriendo la habilidad de secretar matriz ósea, algunos osteoblastos pueden quedar atrapados en su propia matriz, dando lugar a osteocitos<sup>13</sup> (Figura 3). Los osteocitos son las células más abundantes en el hueso, se comunican entre sí y con el medio que las rodea a través de extensiones de su membrana plasmática. Debido a esto, se cree que los osteocitos actúan como mecanosensores, dando instrucciones a los osteoclastos sobre donde y cuando reabsorber hueso y a los osteoblastos sobre cuándo y dónde formarlo<sup>11,13-16</sup>.

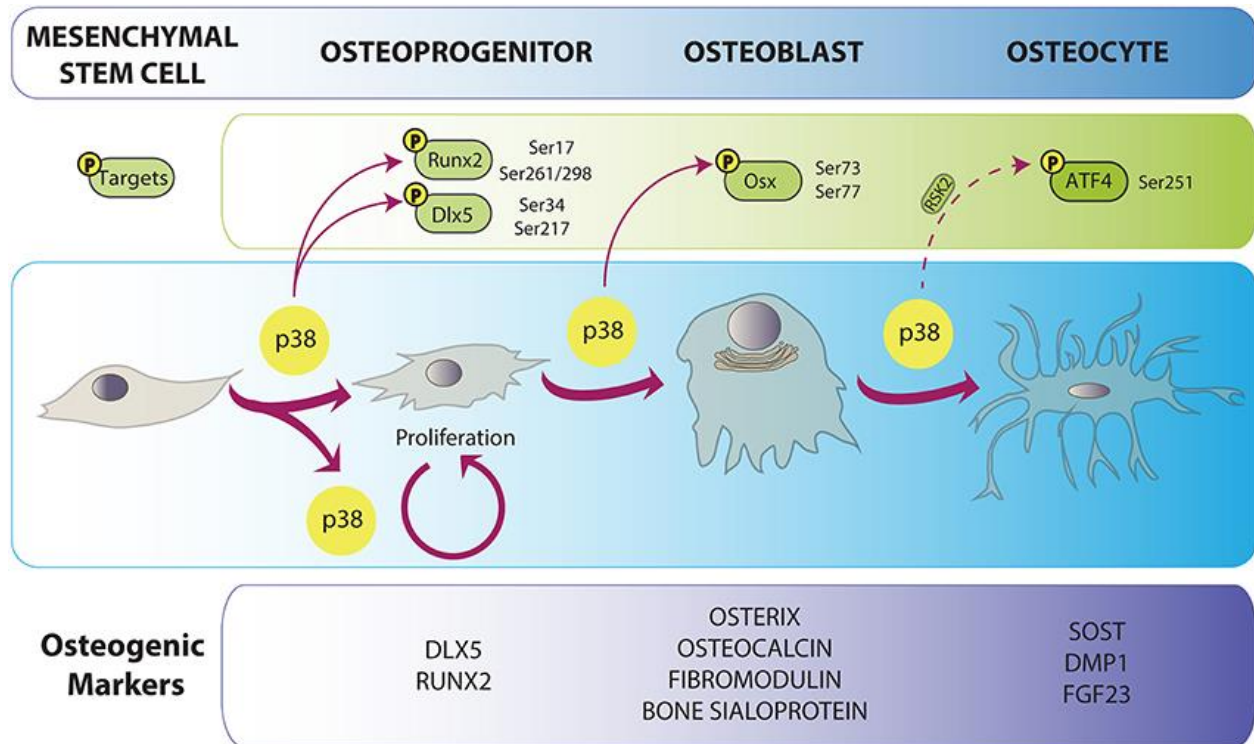


Imagen tomada de Rodríguez-Carballo, E., Gámez, B., & Ventura, F. (2016). p38 MAPK Signaling in Osteoblast Differentiation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 4, 40. doi:10.3389/fcell.2016.00040].

**Figura 3. Osteoblastogénesis.** Mediante la fosforilación de factores de transcripción específicos de osteoblastos (panel superior), precursores mesenquimales se diferencian dando origen a osteoblastos y osteocitos (panel medio). La diferenciación de osteoblastos está caracterizada por la expresión de proteínas específicas dependiendo de la etapa de proliferación y diferenciación, las cuales se muestran en el panel inferior

### Osteoclastos

Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas de origen hematopoyético, las cuales se forman mediante la fusión citoplasmática de células provenientes de precursores mieloides y que circulan en la sangre periférica (Figura 4).

Estos precursores osteoclásticos son atraídos a la superficie del hueso y están destinados para la reabsorción en respuesta a señales que se originan en estos sitios<sup>17</sup>. Existen dos factores hematopoyéticos que son indispensables para la supervivencia y diferenciación de monocitos hacia osteoclastos: M-CSF y RANKL. La unión de RANKL y de M-CSF con sus respectivos receptores en la superficie de los precursores osteoclásticos inducen la expresión de genes que definen el linaje osteoclástico, como TRAP, CTSK, CT y CD29 que conducen al desarrollo de osteoclastos maduros. La OPG es una proteína soluble que tiene la capacidad de unirse a RANKL impidiendo la unión con su receptor, convirtiéndose en un regulador fisiológico negativo de la osteoclastogénesis. La tasa de expresión RANKL/OPG determina el grado de diferenciación de osteoclastos, así como su función. Los osteoclastos maduros multinucleados son activados por señales que conducen a la iniciación del remodelado óseo. El cuerpo celular del osteoclasto es polarizado y en respuesta a la activación de RANK por su ligando, sufre cambios estructurales internos que lo preparan para ser capaz de reabsorber hueso, como el reordenamiento del citoesqueleto de actina y la formación de uniones estrechas entre la superficie del hueso y la membrana basal, con el fin de formar un compartimento sellado. Después, gracias a la exportación de iones de hidrógeno generada por el complejo ATP6i, el microambiente es acidificado y mediante la secreción de enzimas como TRAP y CTSK dentro de la fosa de reabsorción conocida como laguna de Howship, los osteoclastos son capaces de degradar la matriz mineral ósea<sup>13,18-20</sup>.



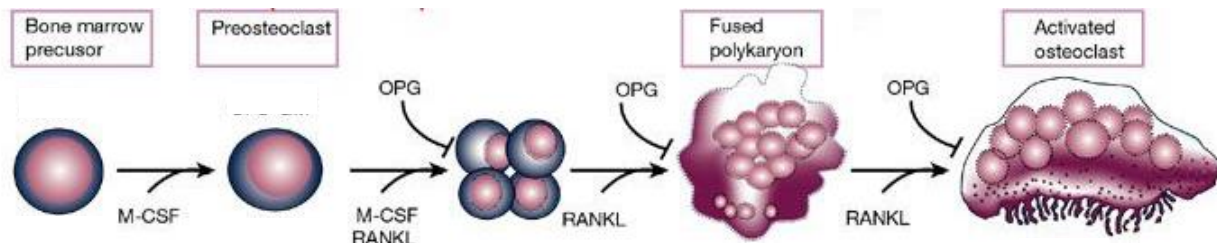


Imagen tomada de Boyle, W.J., Simonet, W.S., & Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature Reviews*, 4(2), 423-434.

**Figura 4. Osteoclastogénesis.** Precursores hematopoyéticos en presencia de M.CSF y RANKL dan origen a precursores monocíticos que al fusionarse se diferencian a osteoclastos activados con capacidad de reabsorción ósea.

Un desequilibrio entre la actividad de reabsorción ósea mediada por los osteoclastos y la de formación ósea mediada por los osteoblastos puede conducir al desarrollo de diferentes enfermedades esqueléticas siendo la más común la osteoporosis<sup>21</sup>.

## Osteoporosis

La osteoporosis se define como un desorden esquelético caracterizado por una baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura del hueso, predisponiendo a una persona a un incremento en el riesgo de sufrir una fractura.

La fortaleza del hueso refleja principalmente la integración de la densidad y calidad ósea. La densidad ósea es expresada en gramos de minerales por área de volumen ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), y en todos los individuos está determinada por el pico de masa ósea y por la cantidad de pérdida de hueso.

El pico de masa ósea, el cual está definido por la cantidad de tejido óseo presente al final de la maduración del esqueleto, es decir, el punto en el que los huesos han alcanzado su máxima densidad y fortaleza es un importante determinante de riesgo de fractura. La calidad del hueso se refiere a la arquitectura, así como a la acumulación de daños como por ejemplo las microfracturas y a la mineralización. Las fracturas ocurren cuando una fuerza, como una caída, por ejemplo, es ejercida sobre un hueso osteoporótico. Actualmente no existe una medida adecuada que determine de forma precisa la fortaleza del hueso, aunque la densidad mineral ósea (DMO) se utiliza de forma frecuente como una medida cercana para definirla.

La organización mundial de la salud (OMS) define a la osteoporosis, al menos de forma operacional, como 2.5 desviaciones estándar (DE) de DMO por debajo de la DMO de una mujer blanca adulta joven (T-score), aunque no está claro cómo utilizar este criterio en hombres y niños, sobre todo a través de los diferentes grupos étnicos<sup>22</sup> (Figura 5). De tal forma que cuando los valores de DMO caen por lo menos 2.5 DE por debajo de la población promedio en individuos jóvenes sanos, tenemos la presencia de osteoporosis. Cuando el T-score está sobre -2.5 pero debajo de -1, tenemos la presencia de osteopenia, una fase previa a la osteoporosis. Por último, las personas

con valores de T-score por arriba de 1 y sin sobrepasar 2.5, se considera que tienen una DMO normal.

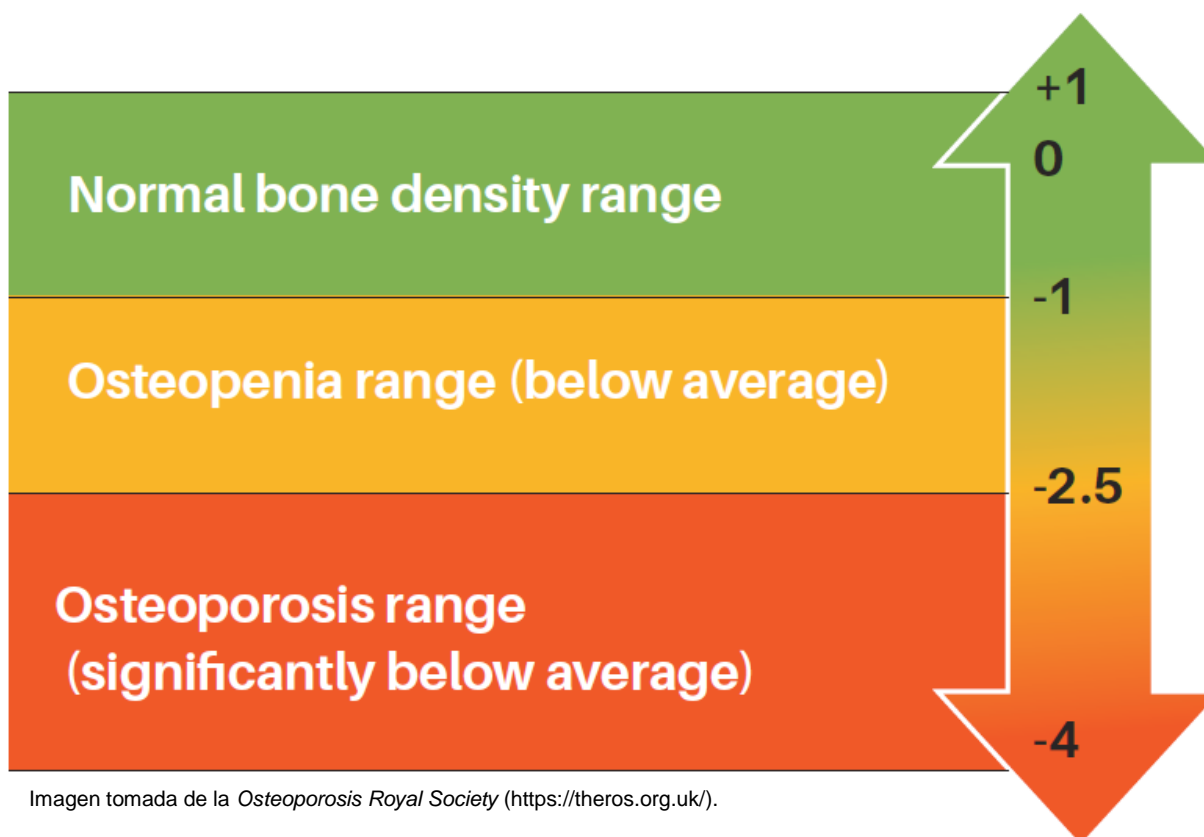


Imagen tomada de la *Osteoporosis Royal Society* (<https://theros.org.uk/>).

**Figura 5. T-Score.** *Densidad de hueso Normal:* DMO de +1 a -1 desviaciones estándar (verde) *Osteopenia:* DMO de -1 a -2.5 desviaciones estándar (amarillo). *Osteoporosis:* DMO de -2.5 a -4 desviaciones estándar (rojo). (Comparado con el valor de referencia de un adulto joven promedio).

En general, la osteoporosis se puede dividir en osteoporosis primaria y secundaria. La osteoporosis primaria puede presentarse en hombres y mujeres a diferentes edades, aunque normalmente está asociada a la menopausia en mujeres y al envejecimiento en hombres. En contraste, la osteoporosis secundaria es el resultado de la ingesta crónica

de algunos medicamentos como los glucocorticoides, de algunas condiciones como el hipogonadismo o de enfermedades como la enfermedad celíaca<sup>23</sup>.

Aunque el riesgo de fractura incrementa con la disminución de la DMO es importante hacer notar que muchos pacientes con osteoporosis no sufren de fracturas y que la mayor parte de las fracturas en la población general, no son osteoporóticas. En la actualidad, se estima que más de 200 millones de personas alrededor del mundo padecen osteoporosis. Aproximadamente el 30% de mujeres postmenopáusicas en Estados Unidos y en Europa padecen esta enfermedad y por lo menos el 40% de estas mujeres y el 15% de estos hombres, tendrán una o más fracturas osteoporóticas a lo largo de sus vidas<sup>24</sup>.

#### *Osteoporosis en México.*

En un estudio realizado en población mexicana en el cual se generaron curvas estándar para DMO normal de espina dorsal y cuello femoral mediante DXA, con el fin de analizar diferencias geográficas y de comparar los resultados con los datos hispanos de referencia, se encontraron claras diferencias en la DMO entre tres poblaciones pertenecientes a tres regiones geográficas diferentes de México: Una DMO más alta en el norte, intermedia en el centro y más baja en el sur. Diferencias similares se encontraron en los valores de peso y altura. Sin embargo, las diferencias entre los valores de DMO permanecieron después de ajustar por estas variables. Estos resultados muestran diferencias en la DMO, probablemente debidas a factores étnicos y nutricionales así como la heterogeneidad en los valores de DMO dentro de las mujeres

mexicanas, datos que son importantes para ser considerados en el diagnóstico de la osteoporosis por DXA<sup>25</sup>.

México pasa por una transición epidemiológica y demográfica, con un número creciente de personas mayores a 50 años y un aumento de 40 años en la expectativa de vida durante los últimos 70 años, la cual está estimada que sea de 82 años para el año 2050. En el 2009, el 17% de la población mexicana era mayor de 50 años, cifra que se incrementará en un 37% para el 2050 (Figura 6).

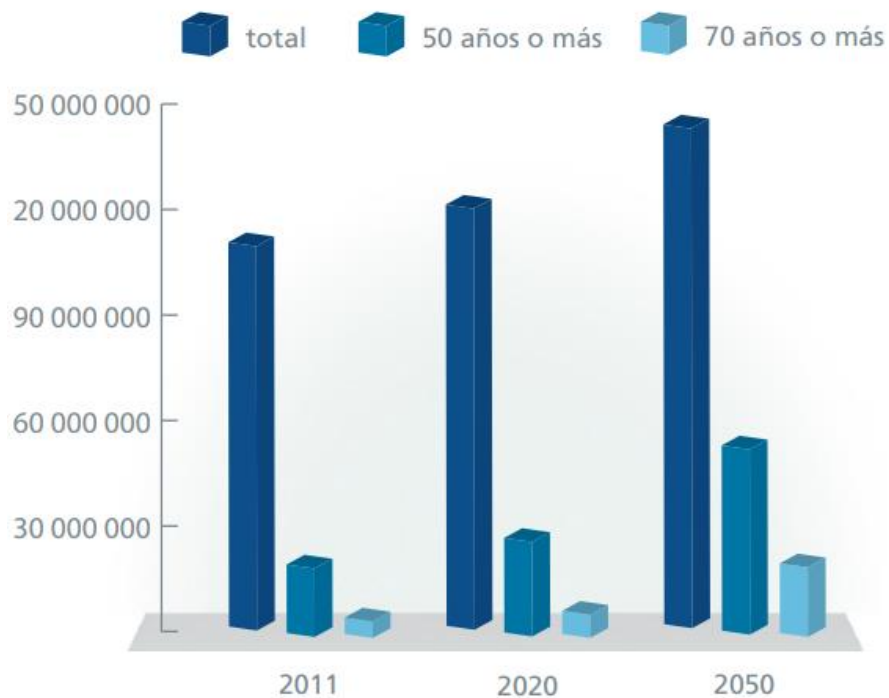


Imagen tomada de <https://www.iofbonehealth.org/>

**Figura 6. Proyección demográfica para México hasta 2050.**

El 17% de las mujeres mexicanas y el 9% de los hombres mayores a 50 años tenían osteoporosis en la espina lumbar; el 16% de las mujeres y el 6% de los hombres padecía osteoporosis en la cadera, mientras que una de cada doce mexicanas y uno de cada veinte mexicanos mayores de 50 años sufrirían una fractura de cadera en su vida. En el 2005, el número total de fracturas de cadera era de 21,000 y estaba proyectado a crecer en un 431%, llegando a más de 110,000 para el 2050 (Figura 7).



Imagen tomada de <https://www.iofbonehealth.org/>

**Figura 7. Proyección de fracturas de cadera en México hasta el 2050.** Cantidad de fracturas de cadera estimadas para hombres y mujeres mexicanos desde 2005 hasta 2050.

En el 2006, las fracturas de cadera tuvieron un costo de 97 millones de dólares, con una proyección para el 2025 de más de 466 millones y para el 2050 de 4,000 millones de dólares. En el 2010, cerca de 18 millones de personas en México eran mayores de 50 años. Se calcula que esta cifra incrementará a 26.2 millones de personas para el

2020. Debido a que la osteoporosis es una enfermedad asociada a la edad y al envejecimiento de la población, se espera que los casos aumenten, así como los casos de osteopenia y de fracturas por fragilidad. Costos directos del manejo de osteopenia y osteoporosis, sin contar medicamentos, fueron de 411.1 millones de dólares en el 2010<sup>26,27</sup>.

### *Factores genéticos*

Muchos factores pueden influenciar el riesgo a desarrollar osteoporosis incluyendo la dieta, la actividad física, la medicación y la presencia de otras enfermedades. Sin embargo, uno de los factores de riesgo a nivel clínico más importante es la existencia de antecedentes familiares, lo que hace énfasis en la importancia de la genética en la patogénesis de la enfermedad. Estudios realizados en familias y en gemelos han mostrado que entre un 50% y un 85% de la variación en el pico de DMO, está genéticamente determinado<sup>28-31</sup>. Los estudios realizados en gemelos, en general, han arrojado mayores estimaciones sobre la heredabilidad que los estudios basados en familia<sup>32-34</sup> en los cuales los individuos han sido comparados a través de varias generaciones<sup>31-35</sup>, posiblemente debido a las influencias no genéticas en la tasa de pérdida de hueso. En la mayoría de los estudios, la heredabilidad de la DMO en sitios axiales como la espina dorsal y la cadera ha sido más alta que en sitios como el antebrazo<sup>32,33</sup> con alguna excepción<sup>34</sup>.

Estudios en gemelos han confirmado que existe un componente hereditario asociado a la pérdida de hueso relacionada con la edad, aunque la contribución genética parece

ser más débil que para el pico de masa ósea. Alrededor del 40% de la variación de la pérdida de hueso en la muñeca y en la espina lumbar se encontró determinada genéticamente, aunque ningún componente hereditario significativo fue encontrado para la pérdida de hueso en cuello femoral<sup>36</sup>. Uno de los determinantes más importantes en la pérdida de hueso en mujeres es la deficiencia de estrógenos después de la menopausia. Estudios en gemelas han indicado que la edad en la que sucede la menopausia está determinada genéticamente<sup>37</sup>, lo que da apoyo a la idea de que los factores genéticos tienen un papel en la determinación de la pérdida de hueso, al menos en mujeres. Acorde con esto, algunas variantes genéticas asociadas a la edad en la menopausia han sido indentificadas<sup>38</sup>. Por otro lado, la heredabilidad de la pérdida de hueso asociada a la edad en hombres ha sido estudiada mucho menos en comparación con la de las mujeres. Sin embargo, en un estudio realizado en 50 gemelos, no fue encontrada ninguna evidencia de componentes hereditarios asociados a la pérdida de hueso en un periodo de seguimiento de 16 años<sup>39</sup>. En diferentes estudios, se ha mostrado que una historia familiar de fracturas es un factor de riesgo para fractura, independientemente de la DMO<sup>40,41</sup>. Sin embargo, la heredabilidad de las fracturas disminuye con la edad, mientras que los factores ambientales se vuelven de mayor importancia. Esto se demostró en un estudio de gemelos donde la heredabilidad de la fractura de cadera era del 68% alrededor de los 65 años, pero disminuía de forma dramática hasta llegar casi al 0% para los 80 años<sup>42</sup>. Diferentes enfermedades han sido identificadas en las cuales efectos considerables en la masa ósea, la fragilidad del hueso y en el recambio óseo son el resultado de mutaciones en un solo gen.



Estas enfermedades han arrojado información importante para las vías moleculares que regulan la masa ósea y la función celular del hueso, así como su calidad. Algunos ejemplos de estas enfermedades y genes que las causan son:

*Osteogénesis imperfecta*: enfermedad caracterizada por una baja masa ósea y un incremento característico en la fragilidad del hueso, principalmente causada por mutaciones en *COL1A1* y *COL1A2*.

*Síndromes de osteoporosis mendeliana*: El síndrome de osteoporosis-seudoglioma, es una enfermedad rara que es recesiva, se caracteriza por ceguera y una baja masa ósea siendo el gen responsable *LRP5*, mientras que el gen que codifica para la aromatasa, *CYP17*, y *ESR1*, el gen que codifica para el receptor de estrógenos, son responsables del desarrollo de osteoporosis severa en hombres.

*Alta masa ósea*: Otros síndromes poco comunes que han sido descritos, son aquellos donde individuos con alta masa ósea están protegidos contra fracturas osteoporóticas. Entre los genes relacionados con estos síndromes se encuentran *LRP5* y *SOST*.

*Osteopetrosis*: Síndromes que se caracterizan por un fallo en la actividad de reabsorción de los osteoclastos. Los genes que se ven afectados en estas enfermedades son *TNFRSF11A*, gen que codifica para RANK, así como *TNFSF11*, gen que codifica para RANKL<sup>43</sup>.

Estudios de gen candidato y estudios de asociación de genoma completo (GWAS) en poblaciones europeas y asiáticas así como en poblaciones mexicanas, han identificado genes clave en la osteoporosis como *COL1A1*, *VDR*, *ESR1* y *LRP5*, los cuales se han asociado con DMO y fractura<sup>44-47</sup>. Sin embargo, estos estudios han sido hasta cierto punto desalentadores principalmente porque únicamente son capaces de detectar una proporción de la población en riesgo, por lo que más investigaciones con diferentes acercamientos son necesarias para mejorar los resultados de estos estudios.

#### *Factores nutricionales y estilo de vida.*

Aunque la densidad del hueso se encuentra parcialmente determinada por factores genéticos, varios factores asociados al estilo de vida como los nutricionales o los de comportamiento, tienen un rol tanto en el desarrollo como en la prevención de la osteoporosis, a través de sus efectos durante los años de crecimiento así como de la tasa de pérdida de hueso en años posteriores<sup>48</sup>.

Se sabe que una ingesta de calcio adecuada es importante para lograr un pico de masa ósea óptimo y para el mantenimiento de esta en la vejez. Durante la infancia y la adolescencia, el incremento en la ingesta de calcio está asociado con el incremento en la acumulación mineral ósea<sup>49,50</sup>. La deficiencia de calcio está relacionada con una disminución en la DMO, con un aumento en el riesgo de fractura y por lo tanto en el riesgo de padecer osteoporosis<sup>51,52</sup>. La vitamina D tiene un papel destacado en la absorción de calcio y por consiguiente en la salud del hueso. La deficiencia severa de vitamina D causa raquitismo en niños y osteomalacia en adultos, mientras que una

deficiencia leve, se ha asociado con hiperparatiroidismo e incrementos en el recambio óseo<sup>53</sup>. Diferentes estudios han encontrado asociación entre los niveles circulantes de 25-hidroxyvitamina D (25-OHD) y la DMO<sup>54-56</sup>.

Se ha descrito que el posible impacto de la ingesta de proteína en el metabolismo del hueso podría estar mediada por el incremento de IGF-1, un factor reconocido que promueve el crecimiento del hueso, en respuesta a la ingesta de proteína y su relación con la fortaleza muscular. De esta forma, una ingesta proteica inadecuada en personas mayores podría desencadenar problemas relacionados con la salud del hueso <sup>57</sup>.

Por otro lado, ha sido reportado que una dieta rica en frutas y vegetales puede mejorar la salud del hueso debido a que contiene altas concentraciones de iones alcalinos como el potasio, el magnesio y el calcio, los cuales pueden ayudar a disminuir la carga de ácido en la dieta, promoviendo un balance positivo de calcio<sup>58,59</sup>. Las frutas y los vegetales son considerados una buena fuente de vitamina K, la cual es importante para la síntesis de la matriz del hueso, también son una buena fuente de antioxidantes y fitoquímicos como los polifenoles, carotenoides y tocoferoles, los cuales pueden reducir la reabsorción ósea que resulta del estrés oxidativo y a la vez promover la actividad de osteoblastos o inhibir la diferenciación de osteoclastos<sup>60-62</sup>.

En un estudio realizado en población mexicana adulta se asociaron de manera significativa patrones de dieta con la DMO. Un patrón de dieta alto en frutas y verduras, así como un patrón alto en lácteos, pescado y granos enteros y a su vez bajo en granos refinados y bebidas carbonatadas, puede contribuir a una buena DMO. Sin embargo, un

patrón dietético con un alto consumo de granos refinados, azúcares, dulces, bebidas alcohólicas, carnes rojas, grasas y bebidas carbonatadas se encontró significativamente asociado con una baja DMO<sup>63</sup>

Es bien sabido que una carga mecánica superior a la experimentada en las actividades diarias es necesaria para mejorar la DMO<sup>64</sup>. Por lo tanto, la actividad física es un factor dentro del estilo de vida que es de gran importancia para mejorar la masa ósea a través de la vida. Se ha visto que en niños y adolescentes la actividad física diaria, como la actividad física de los programas escolares, tiene efectos positivos en el aumento de la densidad mineral ósea<sup>65</sup>. Varios estudios han mostrado que el ejercicio es una manera efectiva de mejorar y mantener la masa ósea<sup>66-68</sup>.

Fumar tabaco ha sido un factor de riesgo para padecer osteoporosis desde hace 30 años<sup>69</sup>. Empezar a fumar a edades tempranas se ha relacionado con una baja DMO en adolescentes<sup>70,71</sup> mientras que algunos meta análisis en adultos han demostrado que fumar tabaco está relacionado con una reducción en la masa ósea, un incremento en la pérdida de hueso y un incremento en el riesgo de fractura<sup>72,73</sup>. Los cigarros contienen al menos 150 toxinas conocidas y el fumarlos genera una gran cantidad de radicales libres. Algunas toxinas incrementan la producción de enzimas que degradan estrógeno en el hígado, por lo que las mujeres que fuman a menudo, tienen niveles bajos de estrógeno y tienden a presentar menopausia temprana, ambas características tienen un impacto negativo en la masa ósea<sup>74</sup>. La nicotina y los radicales libres pueden afectar la actividad osteoblástica perjudicando la formación de hueso<sup>75</sup>. Fumar también puede llevar a un incremento en la reabsorción ósea mediante la activación de enzimas que

favorecen la actividad o mediante la producción de proteínas que la incrementan<sup>76,77</sup>. Consistentemente, se ha demostrado que el dejar de fumar mejora la DMO y reduce el riesgo de sufrir una fractura<sup>73,78,79</sup>.

### *Factores epigenéticos*

Tanto la diferenciación de osteoblastos como la diferenciación de osteoclastos, implica la sobrerregulación de genes implicados en la generación de fenotipos celulares específicos y la subregulación de los genes responsables de la pluripotencialidad de estas células. Genes clave en el mantenimiento de células pluripotenciales y su diferenciación hacia linajes celulares específicos muestran evidencias de regulaciones epigenéticas<sup>80,81</sup>. Estas alteraciones no genéticas son reguladas por tres modificaciones epigenéticas principales: la metilación del DNA, las modificaciones de histonas y los RNAs no codificantes.

La metilación del DNA es una modificación epigenética bien caracterizada y la mayoría de las veces se encuentra asociada al silenciamiento transcripcional. La metilación del DNA ocurre en la posición 5' del anillo de citosina dentro de dinucleótidos CpG y es catalizada por las DNA metiltransferasas (DNMTs). Distintos estudios han sugerido que la metilación del DNA tiene un papel relevante en la diferenciación de osteoblastos. Por ejemplo, en la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos, *RUNX2* y *BGLAP* muestran una hipometilación en los sitios CpGs lo que lleva a una sobre expresión de estos genes<sup>82</sup>. Las marcas de metilación también son importantes en la comunicación entre osteoblastos y osteoclastos. Recientemente, se ha demostrado que

la represión epigenética de *IRF8* puede regular el proceso de diferenciación de osteoclastos<sup>83</sup>.

Las modificaciones de histonas, que incluyen la acetilación, fosforilación y ubiquitinación<sup>84</sup>, son otro mecanismo epigenético que regula la expresión génica y el metabolismo óseo. Las modificaciones de histonas han sido estudiadas en varios genes candidato en términos de sus efectos sobre la expresión génica y la diferenciación celular asociada al hueso. En un estudio, se observó un enriquecimiento de las marcas H3K4me3 y H3K27ac en el región del promotor de *RUNX2*<sup>85</sup>. También se ha visto que durante la diferenciación de osteoblastos, la acetilación de las histonas H3 y H4 aumenta significativamente en los genes *OSX* y *BGLAP*<sup>86</sup>.

Aunque el 90% del DNA genómico se transcribe a RNA, solo entre el 1 y el 2% del genoma humano codifica para proteínas<sup>87</sup>. La mayoría del RNA no se utiliza para la producción de proteínas y está representado por los RNAs no codificantes (ncRNAs).

Los ncRNAs tienen papeles importantes en la regulación de la expresión génica a través de la regulación transcripcional y postranscripcional. Dentro de los ncRNAs que han sido más descritos y asociados a diferentes patologías podemos encontrar a los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y a los microRNAs (miRNAs)<sup>88</sup>.

## **miRNAs**

El primer miRNA fue descrito en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* en 1993. En este organismo, la subexpresión de la proteína LIN-14 es esencial para la progresión de la

etapa larval L1 a la L2. Además, la subexpresión de LIN-14 es dependiente de la transcripción de un segundo gen conocido como *lin-4*. Interesantemente, *lin-4* no era traducido en ninguna proteína biológicamente activa, en cambio daba origen a dos RNAs pequeños de aproximadamente 21 y 61 nucleótidos de longitud. La secuencia más larga formaba una estructura en forma de horquilla y funcionaba como precursor de la secuencia más corta.

Después, se descubrió que el RNA más pequeño era complementario a múltiples sitios en la región 3'UTR del mRNA de *lin-14*. La unión entre las regiones complementarias del RNA pequeño y del mRNA, resultaba en una disminución de los niveles de expresión de la proteína LIN-14 sin causar casi ningún cambio en los niveles de expresión del mensajero<sup>89,90</sup>.

Los miRNAs son RNAs pequeños no codificantes de cadena sencilla, endógenos y conservados evolutivamente, que tienen la capacidad de unirse a RNA mensajeros blanco y de esta forma regular la expresión génica. A la fecha, más de 2000 miRNAs han sido identificados en el genoma humano<sup>91</sup>.

La mayoría de los miRNAs se transcriben como miRNAs primarios (pri-miRNAs) a partir de secuencias de DNA, para después ser procesados en miRNAs precursores (pre-miRNAs) y finalmente, en miRNAs maduros. En la mayoría de los casos, los miRNAs interactúan con la región 3'UTR del mRNA blanco para disminuir la expresión. Sin embargo, han sido reportados miRNAs con la capacidad de interactuar con otras regiones, incluyendo la región 5'UTR, secuencias codificantes y promotores<sup>92</sup>. Los

miRNAs son moléculas que juegan un papel crítico en el desarrollo animal y están implicados en una variedad de procesos biológicos. La expresión aberrante de microRNAs está asociada con una gran variedad de enfermedades humanas<sup>93</sup>. Otra característica importante de los miRNAs es que son secretados en fluidos extracelulares por lo que miRNAs extracelulares han sido ampliamente reportados como biomarcadores potenciales para diferentes enfermedades<sup>94-96</sup>.

La biogénesis de los miRNAs comienza con el procesamiento de transcritos por la RNA polimerasa II/III, ya sea de manera post o cotranscripcional. Aproximadamente la mitad de los miRNAs identificados a la fecha son intragénicos y procesados en su mayoría a partir de intrones y en menor medida de exones de genes codificantes, mientras que los restantes son intergénicos, transcritos de manera independiente y regulados por sus propios promotores. Algunas veces, los miRNAs se transcriben como transcritos largos llamados clústeres, los cuales pueden tener regiones semilla similares y en tal caso, son considerados como una familia de miRNAs<sup>97,98</sup>. La biogénesis de los miRNAs se puede clasificar en canónica y no canónica.

La vía de biogénesis canónica es la vía dominante mediante la cual los miRNAs son procesados. En esta vía, los pri-miRNAs son transcritos y después procesados para dar origen a pre-miRNAs gracias al complejo microprocesador, el cual consiste en una proteína de unión a RNA llamada DGCR8 y una enzima ribonucleasa de tipo III llamada Drosha. DGCR8 reconoce un GGAC N6-metiladenilado y otros motivos dentro de la secuencia del pri-miRNA, mientras que Drosha procesa el pri-miRNA dúplex mediante una escisión en la base de la estructura en forma de horquilla. Esto resulta en la



formación de una secuencia extra de 2 nucleótidos en el extremo 3'. Una vez que el pre-miRNA se genera, es exportado al citoplasma por el complejo exportina5/RanGTP para después ser procesado por una RNAsa III llamada Dicer. Este procesamiento involucra la eliminación de la parte terminal de la horquilla, lo que da lugar a un miRNA dúplex maduro. La direccionalidad de la cadena del miRNA determina el nombre del miRNA maduro. La cadena 5p surge del extremo 5' de la horquilla del pre-miRNA mientras que la cadena 3p se origina a partir del extremo 3'. Ambas cadenas derivadas del miRNA dúplex maduro pueden ser cargadas en una forma dependiente de ATP a proteínas de la familia Argonauta (AGO), la cual en humanos va de la AGO1 a la AGO4. La proporción de cadenas 5p y 3p de cada miRNA que es cargada en AGO varía en gran manera dependiendo del tipo y del ambiente celular, oscilando desde proporciones muy parecidas hasta ocasiones en la que una cadena predomina sobre la otra. Esta selección está basada en parte en la estabilidad termodinámica en los extremos 5' del miRNA dúplex, así como de la presencia de un U en la posición 1 del extremo 5'. Por lo general, la cadena con menos estabilidad y/o con el uracilo en el extremo 5' es cargada en AGO y nombrada cadena guía. La otra cadena es conocida como cadena pasajera, la cual se separará de la cadena guía a través de varios mecanismos con base en el grado de complementariedad. Las cadenas pasajeras de miRNAs que no contienen *mismatches* son cortadas por AGO2 y degradadas por la maquinaria celular, mientras que los dúplex con *mismatches* en el centro o que no hayan cargado cadenas a AGO2 son separados de forma pasiva y posteriormente degradados<sup>99-103</sup> (Figura 8).

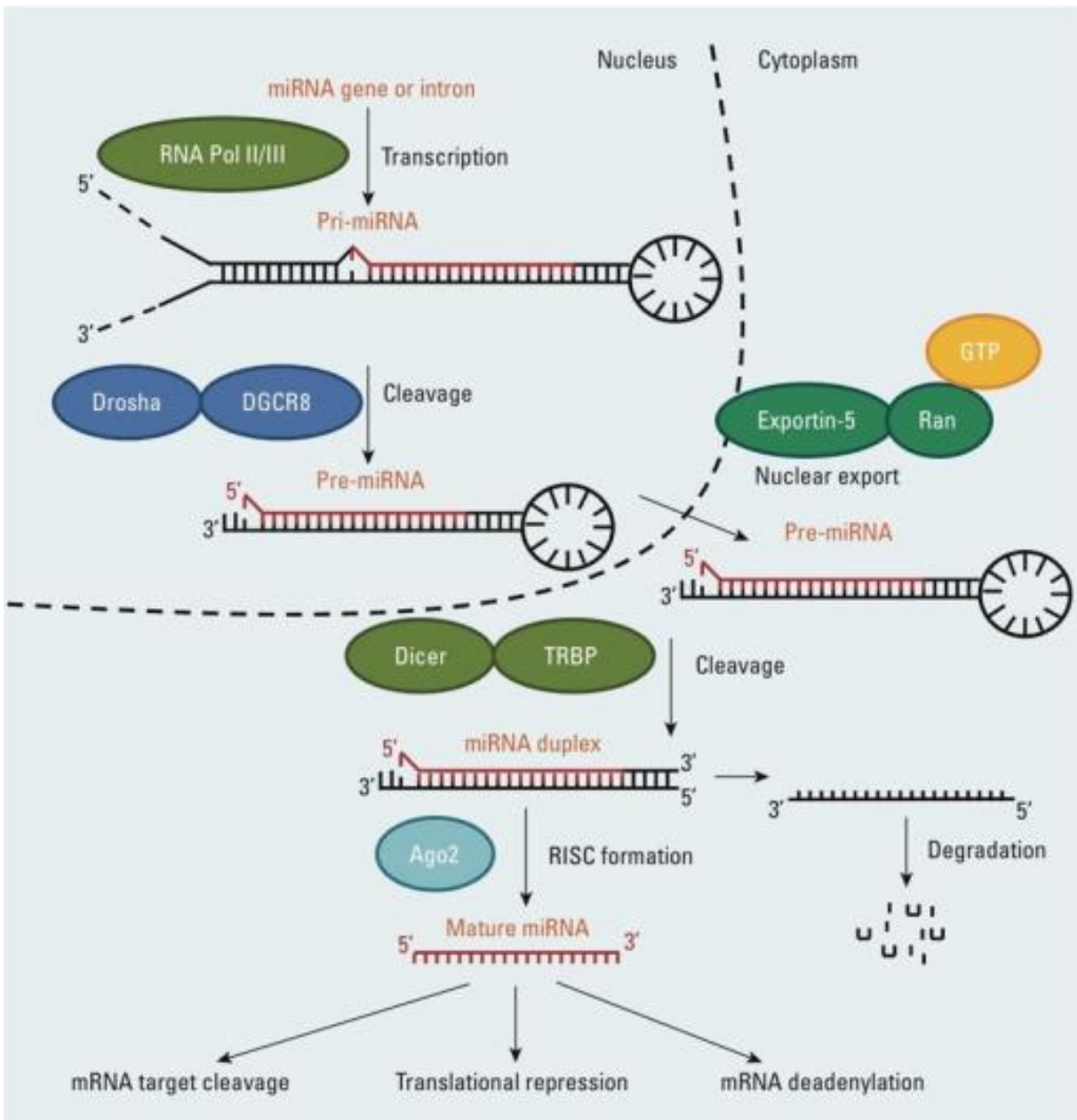


Imagen tomada de: Vrijens, K., Bollati, V., & Nawrot, T. S. (2015). MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. *Environmental health perspectives*, 123(5), 399–411. doi:10.1289/ehp.1408459.

**Figura 8. Biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.** La ruta canónica de biogénesis de miRNAs empieza con la transcripción de un miRNA primario (pri-miRNA) por la RNA polimerasa II o III y su escisión por el complejo microprocesador Droscha/DGCR8, en el núcleo. Esto resulta en un precursor con una estructura en forma de horquilla (pre-miRNA) el cual es exportado del núcleo al citoplasma por el complejo Exportina5/Ran/GTP. En el citoplasma, el complejo Dicer/TRBP procesa el pre-miRNA a su forma madura. La cadena funcional del miRNA maduro es cargada junto con Ago2 al complejo RISC. El silenciamiento de los mRNAs se lleva a cabo a través de su escisión, represión traduccional o deadenilación, mientras que la cadena pasajera es degradada.

### *miRNAs en la diferenciación de osteoblastos.*

La diferenciación de osteoblastos es un proceso muy importante para mantener en balance la homeostasis del hueso. En los últimos años, ha incrementado el número de estudios que demuestran que los miRNAs tienen un papel relevante en la regulación del proceso de diferenciación de osteoblastos<sup>104</sup>.

Varios miRNAs pueden unirse a la región 3' UTR de *RUNX2*, gen conocido como regulador maestro del hueso<sup>105</sup>. La sobre expresión de miR-375 inhibe la diferenciación osteogénica mediante la regulación de *RUNX2*, junto con una disminución en la actividad de varios marcadores osteoblásticos, como ALP, osteocalcina e IBSP<sup>106</sup>.

También se ha descrito que miR-96 promueve la diferenciación osteogénica suprimiendo la expresión de (HB-EGF)–EGF en osteoblastos<sup>107</sup>.

Li y colaboradores<sup>108</sup> demostraron que miR-194 regula la diferenciación de osteoblastos a través de la modulación de STAT1.

Algunos otros miRNAs tienen la capacidad de promover y de suprimir distintas vías de señalización asociadas con la diferenciación osteogénica. miR-124 inhibió la diferenciación osteogénica y la formación de hueso regulando factores de transcripción como Dlx2, Dlx3 y Dlx5, en células madre mesenquimales<sup>109</sup>.

Por otro lado miR-216a reestableció la osteogénesis y aumentó la diferenciación de osteoblastos así como la formación de hueso mediante la regulación de la vía PI3k/AKT mediada por c-Cbl<sup>110</sup>.

En células madre mesenquimales humanas, miR-153 suprimió la diferenciación osteogénica uniéndose a la región 3' UTR de *BMPR2*<sup>111</sup>.

MiR-542-3p suprimió la diferenciación y proliferación de células osteoclasticas, mediante la regulación de la señalización de BMP-7 y consecuentemente la formación de hueso fue inhibida<sup>112</sup>.

DKK1 es considerado un biomarcador importante para la osteoporosis ya que es un antagonista de la vía de señalización WNT. Estudios recientes mostraron que miR-433-3p promueve la diferenciación de osteoblastos con *DKK1* como su gen blanco.

Todos estos datos sugieren que los miRNAs podrían estar participando de manera relevante en el proceso de diferenciación de osteoblastos regulando genes y vías de señalización relacionadas con la diferenciación osteogénica (Tabla 1).

<b>microRNA</b>	<b>Tipo celular</b>	<b>Genes Blanco</b>	<b>Efectos en el Remodelado óseo</b>
<b>miR-375</b>	Células C2C12	RUNX2	Inhibe diferenciación osteogénica.
<b>miR-96</b>	Células MC3T3-E1 y células mesenquimales de ratón.	HB-EGF	Promueve diferenciación osteogénica.
<b>miR-194</b>	Células de hueso mesenquimales.	STAT1 y RUNX2	Promueve diferenciación de osteoblastos.
<b>miR-124</b>	Células mesenquimales humanas y de ratón, células MC3T3-E1 y C2C12.	DLX5, DLX3 y DLX2	Inhibe diferenciación osteogénica.
<b>miR-216a</b>	Células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo.	ALP, OPN, RUNX2, COL1A1 e IBSP.	Promueve diferenciación de osteoblastos y la formación de hueso.
<b>miR-153</b>	Células mesenquimales humanas	BMPR2	Suprime diferenciación de osteogénica.
<b>miR-542-3p</b>	Osteoblastos	BMP-7	Suprime proliferación y diferenciación de osteoblastos.
<b>MiR-433-3p</b>	Osteoblastos derivados de médula ósea de rata.	DKK1	Promueve diferenciación de osteoblastos.

**Tabla 1. miRNAs involucrados en la diferenciación de osteoblastos.**

*miRNAs en la diferenciación de osteoclastos.*

Además de la diferenciación de osteoblastos, la expresión de miRNAs relacionados con la diferenciación de osteoclastos también ha sido explorada, aunque en mucho menor medida. El sistema ligando-receptor RANK/RANKL-RANKL/OPG es un componente clave en el metabolismo del hueso, ya que puede regular la diferenciación de osteoclastos y la osteólisis.

Se sabe que miR-17/20a puede disminuir la expresión de RANKL y consecuentemente inhibir la diferenciación de osteoclastos inducida por glucocorticoides en células osteoblásticas<sup>113</sup>.

Por otro lado, la sobreexpresión ectópica de miR-26a puede atenuar la formación de anillos de actina en precursores osteoclásticos, así como su diferenciación, llevando a una disminución de la expresión *CTGF/CCN2*. La sobre expresión de un inhibidor de miR-26a promovió la función y formación de osteoclastos inducida por RANKL<sup>114</sup>.

Adicionalmente al sistema RANK/RANKL/OPG, se ha encontrado que algunos miRNAs también pueden regular otras vías de señalización relacionadas con la diferenciación de osteoclastos. Wu y colaboradores<sup>115</sup> encontraron que la sobreexpresión de miR-126-5p puede inhibir la diferenciación de osteoclastos y disminuir la osteólisis en células del estroma de una célula tumoral gigante.

En monocitos de médula ósea, la sobreexpresión de miR-214 promueve la osteoclastogénesis activando la vía PI3K/Akt, con *PTEN* como el gen blanco potencial responsable<sup>116</sup>.

Liu y colaboradores<sup>117</sup> identificaron un miRNA nuevo en osteoclastos primarios de ratón, miR-9718, el cual promueve la diferenciación de osteoclastos mediante la represión postranscripcional de *PIAS3*.

En estudios más recientes se encontró que miR-34c se une a la región 3'UTR del *LGR4*, aumentando significativamente la diferenciación de osteoclastos<sup>118</sup>, mientras que miR-155 regula de forma negativa la diferenciación de osteoclastos mediante la vía (TGFβ1)/Smad4<sup>119</sup>. Estos estudios son el reflejo del potencial de los miRNAs como reguladores del proceso de diferenciación de osteoclastos (Tabla 2)

microRNA	Tipo celular	Genes Blanco	Efectos en el Remodelado óseo
<b>miR- 17/20a</b>	Osteoblastos	RANKL	Inhibe diferenciación y función de osteoclastos inducida por glucocorticoides.
<b>miR-26a</b>	Precursores de osteoblastos	CTGF/CCN2, RANKL	Atenúa formación de osteoclastos, formación del anillo de actina y reabsorción ósea.
<b>miR- 126-5p</b>	Células del estroma tumorales	MMP-13	Inhibe diferenciación de osteoclastos.
<b>miR-214</b>	Macrófagos de médula ósea	Pten/PI3K/Akt	Promueve osteoclastogénesis.
<b>miR-194</b>	Osteoclastos primarios de ratón	STAT3	Promueve diferenciación de osteoclastos.
<b>miR-34</b>	Precursores de osteoclastos	LGR4	Promueve diferenciación de osteoclastos.
<b>miR-155</b>	Macrófagos de médula ósea	TGFβ1/Smad4	Inhibe diferenciación de osteoclastos.

Tabla 2. miRNAs involucrados en la diferenciación de osteoclastos.



## **Monocitos circulantes de sangre periférica como modelo de estudio de osteoclastos.**

Debido a que los monocitos circulantes de sangre periférica (MCSP) son precursores de osteoclastos y tienen la capacidad de producir diferentes tipos de moléculas incluyendo citocinas proinflamatorias características de osteoclastos como TNF- $\alpha$ , IL-1) e IL-6, se cree que podrían tener papeles importantes en el metabolismo del hueso. Alteraciones en la formación, migración, diferenciación, actividad funcional y apoptosis de MCSP podrían estar ligadas al desarrollo de diferentes enfermedades esqueléticas, como es el caso de la osteoporosis.

De esta forma, se ha establecido por medio de diferentes trabajos, que estudios genómicos y moleculares utilizando MCSP como una célula modelo, pueden facilitar la identificación de moléculas y vías de señalización involucradas en estas enfermedades, ofreciendo nuevos acercamientos a los mecanismos fisiopatológicos que rodean a los desórdenes esqueléticos<sup>120,121</sup> Debido a esto, los MCSP son considerados un buen modelo para estudios relacionados con el metabolismo óseo, y en particular con osteoclastos.

Algunos estudios se han enfocado en la identificación de miRNAs en MCSP y su posible asociación con osteoporosis, como es el caso del miR-133a y el miR-422a los cuales tienen como blancos genes que inhiben la osteoclastogénesis (CXCL11, SLC39A1, CBL, CD226, PAG1 y TOB2), ambos descritos en poblaciones caucásicas, así como el miR-1270, miRNA que ha sido descrito en población mexicana y que tiene la capacidad de regular la osteoclastogénesis a través de uno de sus genes blanco, *IRF8*<sup>122-124</sup>.

Sin embargo, la mayoría de ellos se ha realizado mediante la tecnología de microarreglos de DNA, la cual tiene algunas limitaciones; como hibridación cruzada y ruido de fondo, factores que restringen una evaluación precisa de los niveles de expresión, especialmente para moléculas de baja abundancia<sup>125</sup>. Dentro de los métodos para realizar perfiles de expresión para miRNAs, los microarreglos son los que tienen la sensibilidad y el rango dinámico más bajo, y aunque se utilizan como herramientas de descubrimiento, la señales observadas tienen que ser forzosamente validadas por otros métodos<sup>126,127</sup>. Además, las sondas tienen variaciones en sus características de hibridación y los microarreglos en general, están limitados a analizar únicamente las moléculas para las cuales tienen sondas diseñadas<sup>127</sup>, por lo que algunos estudios han comenzado a utilizar secuenciación de nueva generación para realizar perfiles de expresión de miRNAs en MCSP<sup>128</sup>.

La secuenciación de nueva generación (NGS) fue introducida en los laboratorios genómicos hace ya más de 10 años. Su impacto en la revolución tecnológica ha tenido implicaciones importantes en los campos de la biología y medicina. Después de mejoras en la precisión, robustez y manejo, se ha convertido en una herramienta usada ampliamente y una alternativa a la secuenciación por Sanger. Gracias al progreso de la NGS y a que ésta herramienta permite la secuenciación de forma paralela y masiva de diferentes regiones específicas, se ha dado un incremento considerable en el descubrimiento de moléculas asociadas a diferentes enfermedades y a elucidar las bases moleculares de estas<sup>129</sup>.

Dentro de las técnicas de secuenciación de nueva generación, la secuenciación de RNAs pequeños (sRNA-Seq) ha surgido como el nuevo estándar para el análisis de

perfiles de expresión e identificación de microRNAs. La secuenciación de RNAs pequeños otorga algunas ventajas por sobre los microarreglos como una alta sensibilidad así como especificidad, la identificación de polimorfismos, la detección de edición en secuencias de miRNAs, y la identificación de miRNAs nuevos o previamente reportados<sup>125,127</sup>.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Identificar microRNAs diferencialmente expresados en el proceso de diferenciación de monocitos a osteoclastos en mujeres postmenopáusicas y su posible papel en la variación de la densidad mineral ósea.

### Objetivos Particulares

- 1.- Establecer un modelo de diferenciación celular *in vitro* de la osteoclastogénesis a partir de monocitos humanos circulantes de sangre periférica.
- 2.- Identificar microRNAs diferencialmente expresados en el proceso de diferenciación de monocitos a osteoclastos en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis y sin osteoporosis.
- 3.- Identificar los posibles genes blancos de los microRNAs que puedan estar participando en la osteoclastogénesis, así como en la variación de la densidad mineral ósea.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Población de estudio.**

Las mujeres participantes en este estudio tienen un origen mestizo-mexicano y fueron reclutadas del Estudio de Cohorte de Trabajadores de la Salud (ECTS), el cual es un estudio a largo plazo que se enfoca en examinar el desarrollo de enfermedades crónicas y su asociación con factores genéticos y con el estilo de vida, en el que participan trabajadores del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca, Morelos<sup>130</sup>. Del 2011 al 2013, se realizó un seguimiento a los participantes como parte de la segunda etapa del proyecto, en la cual 1,026 participantes iniciaron con su participación en este estudio longitudinal.

Dentro de estos 1026 participantes se identificaron 400 mujeres postmenopáusicas. Las características detalladas de éstas mujeres ya han sido previamente descritas<sup>131</sup>. Los procedimientos clínicos, recopilación de datos y seguimiento de todos los participantes han sido estandarizados y validados previamente<sup>132</sup>. De estas 400 mujeres postmenopáusicas, dieciséis mujeres no relacionadas fueron seleccionaron de la base de datos, recontactadas vía telefónica e invitadas a participar. Sin embargo, solo siete mujeres sin osteoporosis y siete mujeres con osteoporosis en cadera aceptaron participar en el estudio. Únicamente las mujeres de los extremos de la distribución de T-score fueron consideradas con el fin de generar ambos grupos (fenotipos extremos).

Los criterios de inclusión para este trabajo fueron: T-score de cadera < -2.5 para el grupo de mujeres con osteoporosis y T-score de cadera > -1.0 para el grupo de mujeres sin osteoporosis. La DMO (g/cm<sup>2</sup>) para cadera total fue medida utilizando un

densitómetro *Lunar DPX NT*. El rango de edad de las mujeres fue de 63 a 85 años y todas habían sido postmenopáusicas por al menos un año (el estado de postmenopausia fue definido como el periodo después del que una mujer ha experimentado doce meses consecutivos sin menstruación). Algunos criterios de exclusión fueron utilizados para minimizar efectos potenciales de cualquier factor no genético en el metabolismo del hueso. Se excluyeron todas las mujeres que presentaran una o más de las siguientes características: que padecieran diabetes mellitus, enfermedades hepáticas crónicas o alcoholismo, artritis reumatoide, hipertiroidismo, terapia de reemplazo hormonal, tratamiento con corticoesteroides, drogas antiepilépticas, bifosfonatos, o cualquier otra enfermedad, condición o tratamiento que pudiera ser un factor no genético que enmascare la variación de la DMO.

Los comités de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social (No. 12CEI 09 006 14) y del Instituto Nacional de Medicina Genómica IRB/IEC (07/2017/I) aprobaron el protocolo del estudio, así como los consentimientos informados. Todas las participantes del presente estudio fueron informadas sobre el proyecto y firmaron un consentimiento informado.

### **Aislamiento de monocitos circulantes de sangre periférica (CD14<sup>++</sup>).**

Quince mililitros de sangre periférica de cada participante fueron colectados en tubos CPT para la obtención de la fracción correspondiente a las células mononucleares (CMN). Los tubos CPT fueron centrifugados a 2700 rpm. La fracción que corresponde a las CMN representada como una nube blanca fue recuperada y lavada con PBS 1X a 1500 rpm por 15 minutos y una vez más a 1200 rpm por 10 minutos. Después, se aislaron las células CD14<sup>++</sup> correspondientes a MCSP mediante el *EasySep* kit de *Stemcell*, a través de una técnica de selección negativa. Esta técnica consiste en un coctel de anticuerpos tetraméricos, por un lado, dirigidos contra antígenos de la superficie celular de células CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123 y por el otro contra dextrano. De esta forma se seleccionan y se marcan con dextrano todas las células no deseadas las cuales son separadas posteriormente utilizando una columna magnética y enriqueciendo la población celular CD14<sup>++</sup>.

### **Comprobación de pureza de células CD14<sup>++</sup> por citometría de flujo.**

La pureza de los MCSP obtenidos mediante selección negativa fue evaluada por citometría de flujo. Las células fueron marcadas con dos anticuerpos conjugados: PE (CD14) y FITC (CD45). Las muestras fueron examinadas en un *FACSAria I Sorter*. Se realizó la lectura de 10,000 eventos para finalmente confirmar una pureza superior al 85%, requerida para proceder a la extracción de RNA o cultivo celular.

### **Extracción de RNA total, cuantificación e integridad.**

Se realizó la extracción de RNA total a partir de MCSP utilizando el *miRNEasy Mini Kit* de *QIAGEN*. Brevemente, este kit combina la capacidad de lisis basada en fenol-guanidina, la inhibición de RNAsas y la remoción de DNA celular y de proteínas. Las células son homogenizadas en *QIAzol*. Después de la adición de cloroformo, la solución es separada por centrifugación en una fase acuosa y una fase orgánica. La fase acuosa queda en la parte superior y contiene el RNA, mientras que, en la fase orgánica, el DNA permanece en la interfase y las proteínas en la parte inferior. La fase acuosa es recuperada y se le añade etanol. Después, la muestra es añadida a la columna del kit donde el RNA total se une a la membrana mientras que el cloroformo y otros contaminantes son lavados y eliminados. Por último, RNA total de alta calidad es eluido en agua libre de RNAsas. La cuantificación del RNA total fue llevada a cabo con la ayuda de un fluorómetro *Qubit 3.0* mientras que la integridad fue analizada mediante el Bioanalizador 2100.

### **Construcción de librerías de cDNA y secuenciación de RNAs pequeños.**

Las librerías de cDNA fueron preparadas a partir de 30ug de RNA total utilizando el *SMARTer small RNA-Seq Kit* para *Illumina* de *Clontech*. Brevemente, el RNA total fue poliadenilado, después se llevó a cabo la síntesis de cDNA seguida de la incorporación de las secuencias de los adaptadores. Adicionalmente, adaptadores de *Illumina* fueron añadidos durante la amplificación por PCR. Por último, el cDNA fue seleccionado por tamaño utilizando perlas *Agencourt AMPure XP*. El cDNA purificado fue secuenciado por síntesis durante 50 ciclos en un *NextSeq 500* de la plataforma *Illumina*.



### **Procesamiento de datos de secuenciación de RNAs pequeños.**

Los archivos fueron exportados en formato FASTQ y después visualizados para control de calidad empleando *FastQC*<sup>133</sup>. La herramienta *Seqtk*<sup>134</sup> fue utilizada (<https://github.com/lh3/seqtk>) para remover las 3 primeras bases de cada lectura provenientes de uno de los oligos utilizados para la preparación de las librerías de cDNA. Las colas de más de 15 adeninas y las secuencias correspondientes a los adaptadores de sRNA3' de *Illumina* (AGATCGGAAGAG) fueron removidas con *Reaper*<sup>135</sup>. Las lecturas de sRNA-Seq fueron procesadas utilizando *exceRpt* (<https://rkitchen.github.io/exceRpt/>) como ha sido descrito previamente<sup>136</sup>. Brevemente, el algoritmo filtra las lecturas de baja calidad y aquellas que pudieran provenir de secuencias contaminantes con ayuda de *UniVec*, así como de posibles RNAs ribosomales. Las lecturas que no son eliminadas son alineadas sin huecos a secuencias de pre-miRNAs provenientes de *miRbase*<sup>137</sup> v21 así como al genoma y transcriptoma con la herramienta *STAR*<sup>138</sup>. El alineamiento requiere una longitud de complementariedad entre secuencias de 16 nucleótidos y 0 *mismatches* si la longitud de la lectura es menor a 20 nucleótidos o 1 *mismatch* si es mayor a 20 nucleótidos.

### **Análisis de expresión diferencial de microRNAs.**

Se estimó el tamaño efectivo de las librerías mediante el método *TMM* con *edgeR* v3.18.1 para encontrar los factores de escala que minimizaran el valor de *fold change* para la mayoría de los genes<sup>139</sup>. Se disminuyeron los pesos correspondientes a las muestras atípicas utilizando la función *voomWithQualityWeights*<sup>140</sup>. Finalmente, se ajustó un modelo lineal y se estimó una *t* estadística moderada con ayuda de *limma*

v3.32.7<sup>141</sup> para evaluar las diferencias en los niveles de expresión entre grupos. El *false discovery rate* (FDR) fue utilizado para corregir los valores de *p* para pruebas múltiples<sup>142</sup>. Los pesos de las librerías fueron estimados utilizando el paquete *Voom*<sup>143</sup> a través de *limma*. El análisis de expresión diferencial fue realizado únicamente para miRNAs con por lo menos una cuenta por millón en al menos tres muestras.

### **Análisis por RT-qPCR.**

El cDNA fue preparado a partir de 100ng de RNA total empleando el kit de transcripción reversa para microRNAs de *TaqMan*. La expresión de hsa-miR-708-5p, hsa-miR-3161, hsa-miR-939-3p y hsa-miR-4422 fue evaluada utilizando ensayos para microRNAs de *TaqMan* por PCR cuantitativa en un equipo para qPCR *QuantStudio 7 Flex*. Dos RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs) RNU44 y RNU48 fueron utilizados como normalizadores. El método delta-delta Ct fue llevado a cabo para la cuantificación de la expresión relativa.

### **Predicción de genes blanco y análisis de enriquecimiento funcional.**

Se realizó una búsqueda en las bases de datos de *MiRNet* y *miRTarBase* para encontrar genes blancos validados para hsa-miR-708-5p. Todos aquellos genes que tuvieran reportes de validación y que estuvieran presentes en ambas bases de datos, fueron sometidos a las plataformas basadas en web *STRING* y *KEGG* para análisis de enriquecimiento funcional. Se seleccionaron todas aquellas vías que estuvieran relacionadas con el metabolismo óseo. Los genes contenidos en ellas, y que cumplieran con un valor de FDR < 0.05, fueron seleccionados para análisis posteriores.

El software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) fue utilizado para construir una red de interacción entre el microRNA y sus genes blanco-validados previamente seleccionados.

### **Análisis de datos de microarreglos de expresión.**

Los datos crudos obtenidos de 12 microarreglos de expresión *GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0* de Affymetrix, que contenían datos de MCSP de mujeres postmenopáusicas independientes, fueron procesados de nuevo para comparar los resultados de expresión con los genes blanco predichos para el hsa-miR-708-5p. Brevemente, los datos crudos fueron procesados utilizando el método *Robust Multiarray Average* (RMA)<sup>144</sup> para la corrección de fondo y las muestras fueron normalizadas mediante normalización por quintiles. La expresión diferencial fue determinada a través de modelos lineares utilizando *limma*, como ha sido descrito previamente <sup>124</sup>.

### **Modelo de diferenciación celular *in vitro* de osteoclastos a partir de MCSP.**

Se realizó el establecimiento de un modelo celular de la osteoclastogénesis a partir de MCSP de voluntarias sanas. Las células se llevaron a cultivo celular dentro de las siguientes condiciones:

- Medio mínimo alfa ( $\alpha$ -MEM).
- 10% de suero fetal bovino (SFB).
- 100ug/ml de estreptomicina
- 25ng/ml de M-CSF
- 50ng/ml de RANKL

Las células fueron mantenidas en cultivo celular a una temperatura de 37°C en placas de 6 pozos por un periodo de 21 días con un cambio de medio suplementado con citocinas cada tercer día.

### **Caracterización bioquímica, celular y molecular de osteoclastos.**

Para la caracterización de osteoclastos a nivel celular, se llevó a cabo una tinción faloidina/DAPI después de 21 días de tratamiento con citocinas. La faloidina se une a la f-actina, proteína que constituye los microfilamentos del citoesqueleto mientras que el DAPI se une a las regiones ricas en adeninas y timinas del DNA.

La caracterización a nivel bioquímico se realizó mediante la tinción de la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). En las células TRAP positivas pueden observarse pequeños puntos color granate los cuales corresponden a los sitios de actividad de la enzima.

Por último, para la caracterización a nivel molecular, se evaluó por RT-qPCR la expresión en MCSP y en células después de 21 días de tratamiento con citocinas, de marcadores osteoclásticos como *CA2*, *CTSK* y *ACP5* y de *CX3CR1*, un marcador monocítico.

### **Análisis funcional del miR-708-5p.**

Se realizó un ensayo de gen reportero de luciferasa para comprobar la unión específica del miR-708-5p a la región 3' UTR del gen *AKT1*. La región 3'UTR de *AKT1* contiene 3 sitios de unión para el miR-708-5p. Esta región fue amplificada por PCR mediante el diseño de *primers* específicos. Después de su purificación, el producto de PCR fue ligado a un vector pGEM-T y posteriormente utilizado para transformar células DH5 $\alpha$  competentes y extraer DNA. Se realizó una digestión mediante enzimas de restricción (XhoI y SdaI) para clonar el fragmento correspondiente a la región 3'UTR de *AKT1* al vector de expresión pmirGLO (Promega). Por último, se comprobó por secuenciación Sanger la presencia de la secuencia correspondiente a la región 3'UTR de interés y la ausencia de mutaciones. Por otro lado, fue adquirido un vector de expresión pCMV-MIR con la secuencia precursora del miR-708-5p (MI0005543; OriGene).

Células HEK293 y Saos-2 fueron cultivadas en medio DMEM con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%, a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Cuando las células alcanzaron la fase logarítmica fueron sembradas 3x10<sup>5</sup> células por pocillo en placas de 6 pozos. A las 24 horas, fueron transfectadas mediante el reactivo de transfección *FuGENE HD* (Promega). Los vectores *AKT1* 3'UTR pmirGLO y pCMV-MIR 708 fueron cotransfectados (1:1, DNA total: 2000 ng) en células HEK293 y Saos-2, como control negativo se utilizó el pCMV-MIR 383 ya que *AKT1* no es blanco del miR-383. Después de 48 horas el sistema para el ensayo de gen reportero dual de luciferasa fue utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Las células fueron lisadas y se realizó la detección de la intensidad de fluorescencia. Todos los experimentos fueron realizados en tres experimentos independientes con tres replicas por experimento.

### **Análisis estadísticos.**

Los resultados fueron analizados empleando la prueba U de Mann-Whitney. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar. Los resultados obtenidos son el promedio de tres ensayos independientes. Para los análisis estadísticos de los datos provenientes de los microarreglos de expresión, los archivos CEL fueron procesados utilizando el lenguaje de programación *R*. Los niveles de expresión fueron calculados transformando los valores de *fold change* a  $\log_2$ . La paquetería *limma*<sup>141</sup> fue utilizada para realizar las comparaciones entre grupos. El algoritmo RMA fue utilizado para la generación de valores relativos y para normalizar. Todos los análisis fueron realizados en *Prisma* v6.0. Para todos los casos, la significancia estadística fue determinada con un valor de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### Características de la población de estudio.

Como resultado del diseño experimental de este estudio, las variables como la edad, peso, altura, índice de masa corporal y niveles de glucosa en sangre de las 14 mujeres que participaron en este trabajo, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), mientras que variables asociadas al hueso como la densidad mineral ósea y T-score de cadera, arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ( $p < 0.001$ ), como se muestra en la Tabla 3.

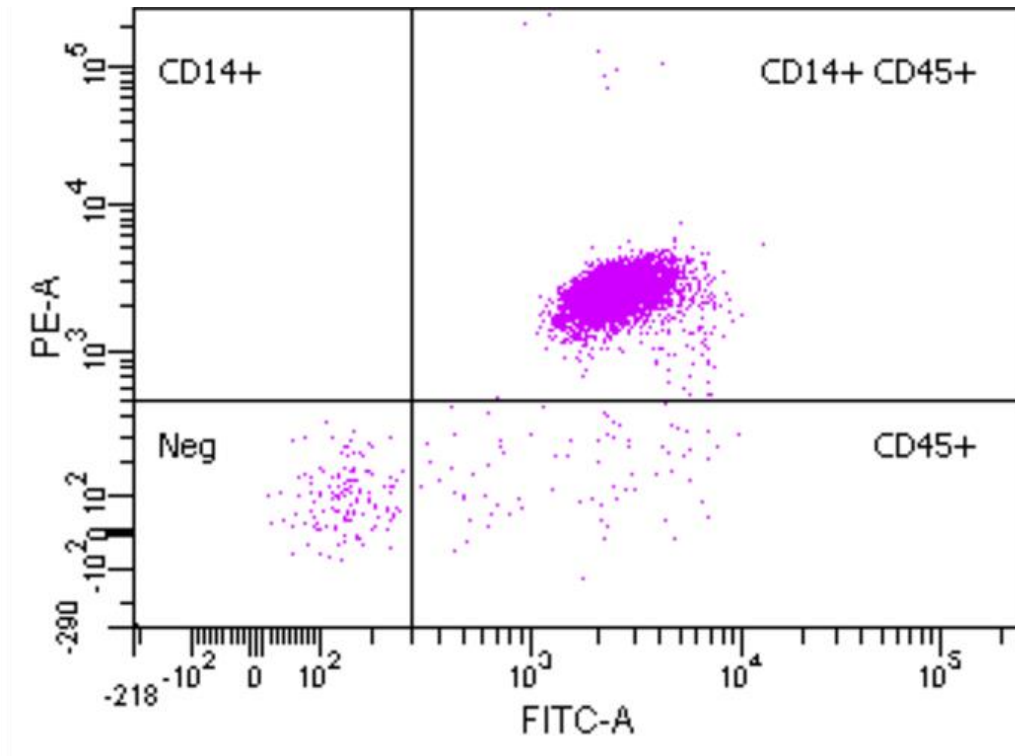
	Mujeres sin osteoporosis n=7	Mujeres con osteoporosis n=7	Valor de $p$
<b>Edad (años)</b>	68.86 ± 0.89	70.43 ± 3.20	0.2692
<b>Altura (cm)</b>	154.7 ± 2.028	150.6 ± 1.806	0.1684
<b>Peso (kg)</b>	56.53 ± 2.055	50.96 ± 3.317	0.1972
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.77 ± 1.19	23.47 ± 3.38	0.8718
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	123.3 ± 34.96	100.9 ± 13.85	0.2203
<b>DMO cadera (g/cm<sup>2</sup>)</b>	0.9811 ± 0.06	0.6781 ± 0.01	<b>0.0006</b>
<b>t-Score cadera (DE)</b>	-0.2110 ± 0.50	-2.616 ± 0.1142	<b>0.0006</b>

**IMC: Índice de masa corporal; DMO: densidad mineral ósea; DE: desviación estándar. Los datos se encuentran expresados en media ± DE.**

Tabla 3. Características de la población de estudio.

### Pureza de monocitos circulantes de sangre periférica (CD14<sup>++</sup>).

Después del enriquecimiento de la población celular CD14<sup>++</sup>, correspondiente a los MCSP con capacidad de diferenciación hacia osteoclastos<sup>145</sup>, se realizó la evaluación de su pureza mediante citometría de flujo.



**Figura 9. Análisis de expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo.** Proporción de células que expresan CD14 y CD45 (cuadrante superior derecho). Lectura de 10,000 eventos.

En la Figura 9, podemos observar el resultado del análisis de expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo. En el cuadrante superior izquierdo se encuentran las células que expresan CD14, en el cuadrante inferior derecho las células que expresan CD45, en el cuadrante inferior izquierdo las células que no expresan ninguno de los dos marcadores y en el cuadrante superior derecho las células que expresan



tanto CD14 como CD45, el primero, marcador de monocitos<sup>128</sup> y el segundo, marcador de leucocitos<sup>146</sup>. Las células del cuadrante superior derecho que expresan ambos marcadores corresponden a MCSP y representaron el 95% del total de células analizadas. Este requisito de pureza es indispensable para proseguir con la extracción de RNA y/o cultivo celular.

### **Análisis de datos de secuenciación de RNAs pequeños.**

Un total de 14 muestras, siete provenientes de mujeres con osteoporosis y siete de mujeres sin osteoporosis, fueron secuenciadas para RNAs pequeños de la forma previamente descrita en la sección anterior. Se obtuvieron archivos de salida FASTQ, los cuales fueron visualizados con *FastQC* para obtener reportes de control de calidad como lo son estadísticas básicas, puntajes de calidad, contenido de G-C, distribución de longitud de las secuencias y el contenido de adaptadores. Como resultado de la construcción de librerías de cDNA, las lecturas obtenidas mostraron dos características especiales; todas las lecturas presentaron 3 nucleótidos extras en el extremo 5', derivados de un oligo utilizado para la secuenciación y una cantidad considerable de adeninas en el extremo 3'. Se utilizó la herramienta *Seqtk* para procesar los archivos FASTQ, removiendo los tres primeros nucleótidos y las colas de adeninas de todas las lecturas. La secuencia correspondiente al adaptador de *Illumina* sRNA 3' (AGATCGGAAGAG) fue removida de las lecturas en las que estaba presente, utilizando *Reaper*. De las lecturas limpias, se seleccionaron aquellas que se encontraran en la longitud de 18 a 24 nucleótidos, debido a que éste es el rango de longitud típico de los miRNAs<sup>147</sup>. Después de estos pasos de limpieza y filtrado (Figura 10), se obtuvieron

22,575,505 lecturas limpias, las cuales fueron seleccionadas para los análisis posteriores. La mayor frecuencia en la longitud de las lecturas se observó a los 21 nucleótidos, lo que corresponde con la longitud promedio de los miRNAs (Figura 11 A). La clasificación de RNAs pequeños, muestra que la mayor fracción de lecturas (17,916,938) mapearon a miRNAs maduros (79.36%), seguidos por 2,053,536 de lecturas que mapearon a piRNAs (9.10%), como se ilustra en la Figura 11 B.

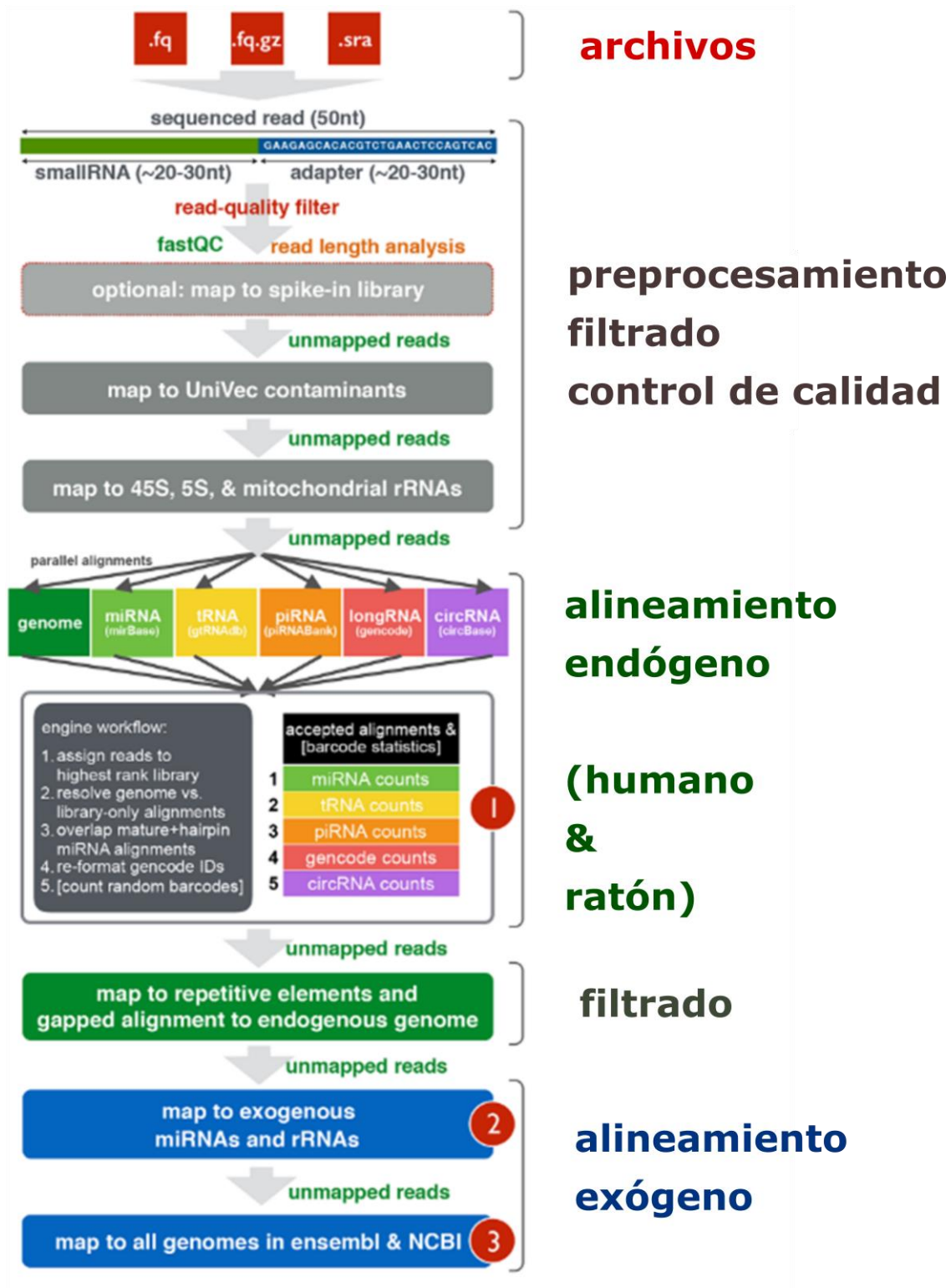
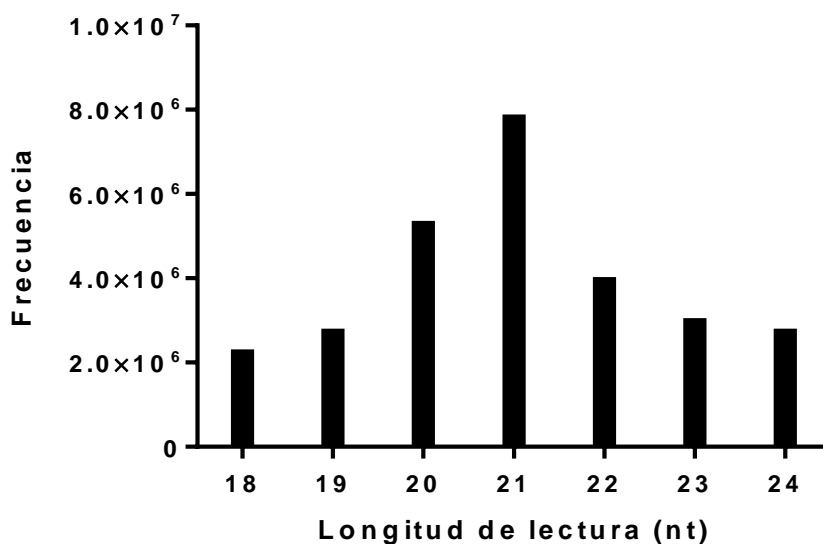
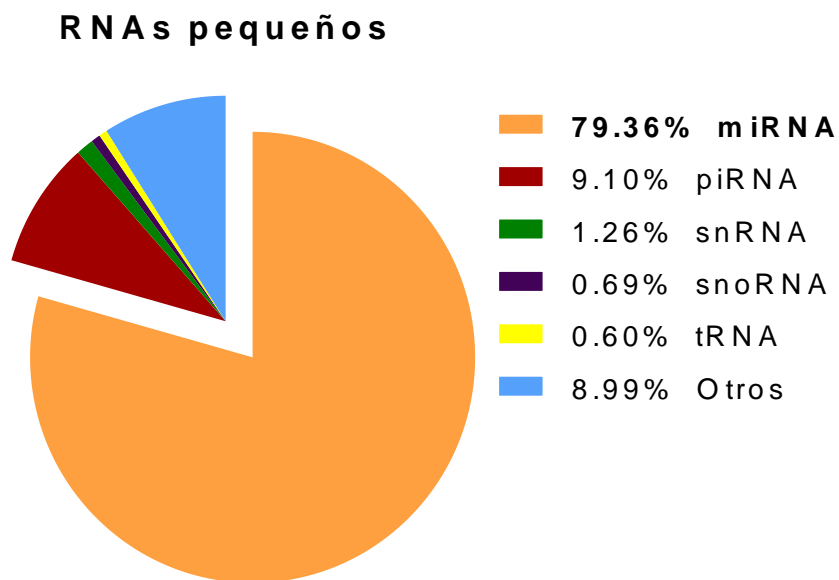


Figura 10. Flujo de trabajo de la herramienta *exceRpt*. Serie de pasos para el análisis de lecturas provenientes de la secuenciación de RNAs pequeños.

A



B



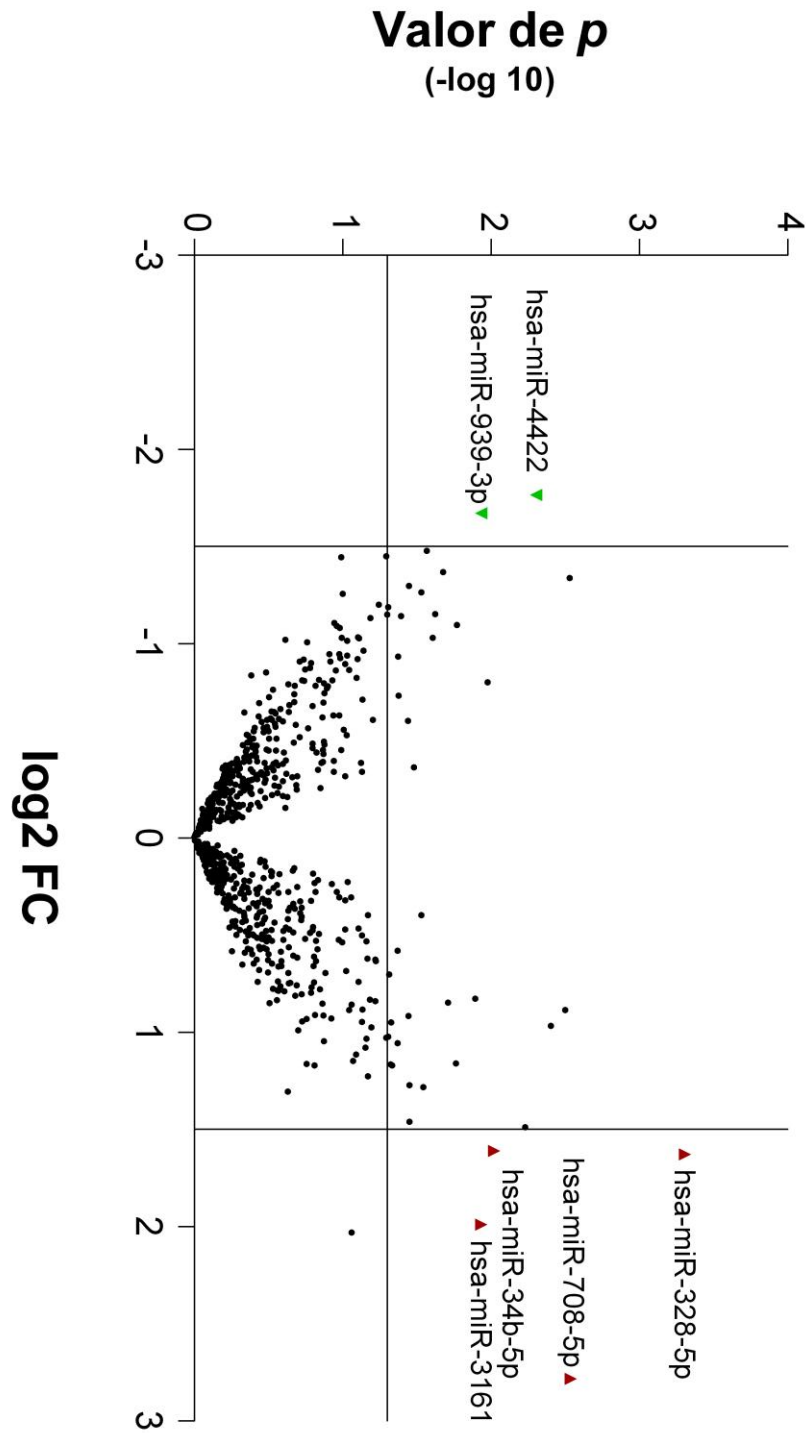
**Figura 11. Panorama general de lecturas de secuenciación de RNAs pequeños (sRNA-Seq).** Se muestra la frecuencia de las lecturas de sRNA-Seq de acuerdo con su longitud (A). Porcentaje de lecturas limpias de entre 18-24 nt que mapean a RNAs pequeños (B).

### **miRNAs diferencialmente expresados en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis.**

El análisis de expresión diferencial nos permitió analizar 885 miRNAs diferencialmente expresados entre mujeres con osteoporosis y mujeres sin osteoporosis. La comparación entre los niveles de expresión de los miRNAs entre estos grupos de estudio está representada en la Figura 12, en forma de un gráfico de volcán.

Antes de realizar una corrección por FDR, 46 miRNAs mostraron diferencias significativas cuando se compararon mujeres con osteoporosis contra mujeres sin osteoporosis ( $p \leq 0.05$ ). Los 10 miRNAs más sobre regulados y los 10 miRNAs más sub regulados en el grupo de mujeres con osteoporosis se muestran en la Tabla 4.

Para los análisis de validación se seleccionaron 4 miRNAs, dos sobre regulados hsa-miR-708-5p y hsa-miR-3161 y dos sub regulados hsa-miR-4422 y hsa-miR-939-3p en mujeres con osteoporosis. Estos miRNAs fueron seleccionados con base en un valor crudo de  $p \leq 0.05$ , un valor de  $\log_2 \text{fold change} \pm 1.5$  y su rol potencial en la regulación de genes que participan en la osteoclastogénesis, de acuerdo con la literatura.



**Figura 12. Gráfico de volcán.** miRNAs diferencialmente expresados en MCSP de mujeres con osteoporosis. Los triángulos hacia arriba (rojos) representan miRNAs sobre regulados y los triángulos hacia abajo (verdes) representan miRNAs sub regulados.

miRNA	Log2 Fold Change	Valor de <i>p</i> -
<b>hsa-miR-708-5p</b>	<b>2.78</b>	<b>0.0029</b>
<b>hsa-miR-3161</b>	<b>1.98</b>	<b>0.0116</b>
<b>hsa-miR-328-5p</b>	<b>1.62</b>	<b>0.0005</b>
<b>hsa-miR-34b-5p</b>	<b>1.61</b>	<b>0.010</b>
hsa-miR-6741-5p	1.49	0.0059
hsa-miR-6791-5p	1.16	0.0171
hsa-miR-181a-3p	0.96	0.0039
hsa-miR-501-3p	0.88	0.0032
hsa-miR-20b-3p	0.84	0.0194
hsa-miR-181b-3p	0.82	0.0127
hsa-miR-556-5p	-0.79	0.0105
hsa-miR-2278	-1.02	0.0246
hsa-miR-4433b-3p	-1.09	0.017
hsa-miR-1278	-1.15	0.0237
hsa-miR-3127-3p	-1.26	0.0295
hsa-miR-7848-3p	-1.33	0.0029
hsa-miR-4677-5p	-1.36	0.0211
hsa-miR-133a-3p	-1.47	0.0269
<b>hsa-miR-939-3p</b>	<b>-1.66</b>	<b>0.0116</b>
<b>hsa-miR-4422</b>	<b>-1.76</b>	<b>0.005</b>

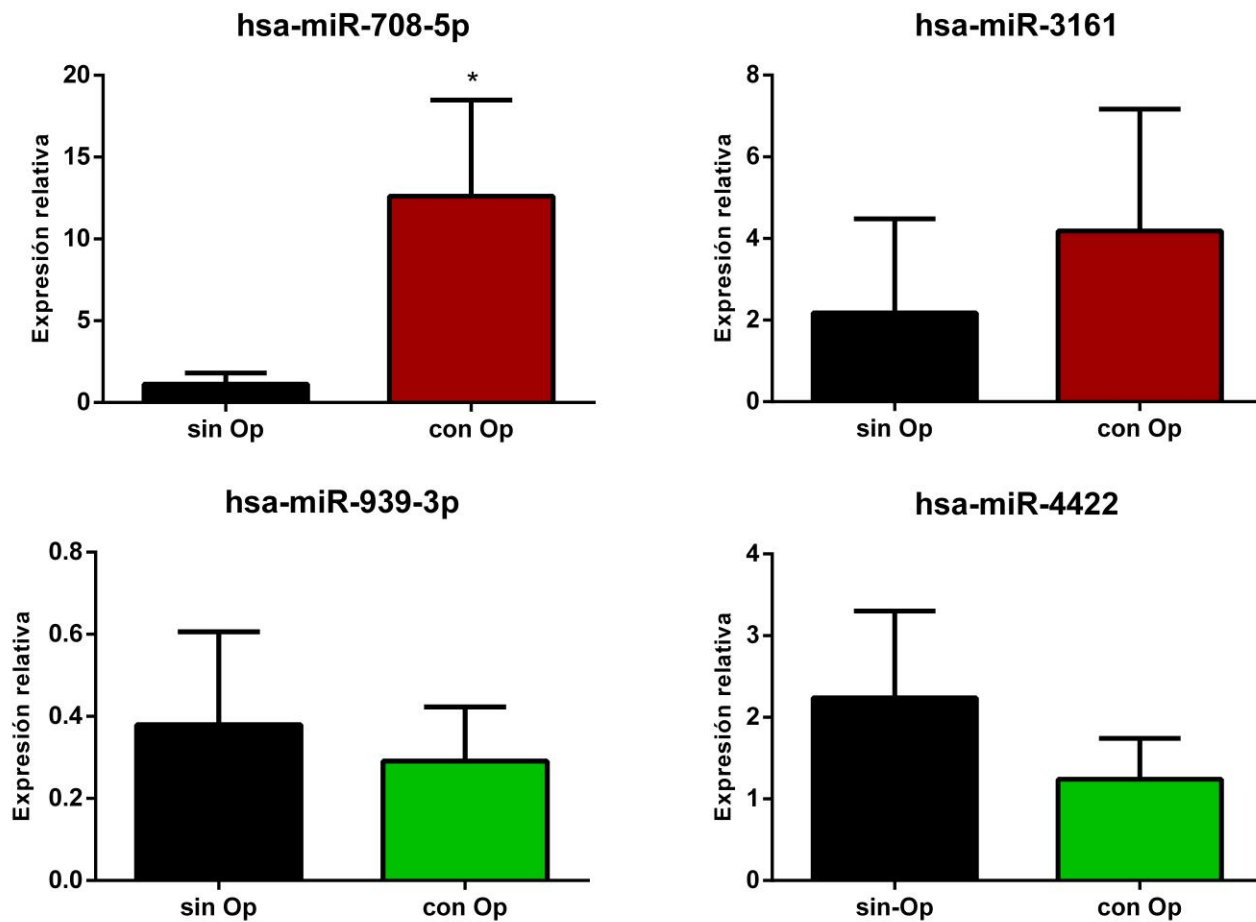
**Tabla 4. Top de miRNAs sobre regulados y sub regulados en MCSP de mujeres con osteoporosis.** Los miRNAs diferencialmente expresados ( $p \leq 0.05$  y  $\log_2$  fold change  $\pm 1.5$ ) están indicados en negritas.

### **Validación de miRNAs diferencialmente expresados por RT-qPCR**

Mediante un análisis por RT-qPCR se validó la expresión diferencial de los miRNAs sobre regulados miR-708-5p y miR-3161, así como de los sub regulados miR-939-3p y miR-4422, previamente seleccionados tomando en cuenta el valor de  $p \leq 0.05$ , un valor de  $\log_2 \text{ fold change} \pm 1.5$  y su posible papel en la regulación de genes que participan en la diferenciación de monocitos a osteoclastos, de acuerdo con reportes previos.

Únicamente la sobre regulación del miR-708-5p fue estadísticamente significativa en el grupo de mujeres con osteoporosis. Los cambios en la expresión de los miR-3161, miR-4422 y miR-939-3p no fueron estadísticamente significativos entre grupos. Sin embargo, se puede observar una tendencia en los cambios de los niveles de expresión del miR-3161 (sobrerregulación) así como de miR-4422 y miR-939-3p (subregulación) en mujeres con osteoporosis, como se puede observar en la Figura 13.





**Figura 13. Análisis por RTqPCR de miRNAs diferencialmente expresados.** Expresión relativa de los miRNAs seleccionados con expresión diferencial en el grupo de mujeres con osteoporosis comparado con el de mujeres sin osteoporosis. Solo se encontraron diferencias significativas en los cambios de los niveles de expresión para miR-708-5p (\*  $p = 0.01$ ) de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney.

### **Predicción de genes blanco de miRNAs y análisis de enriquecimiento funcional.**

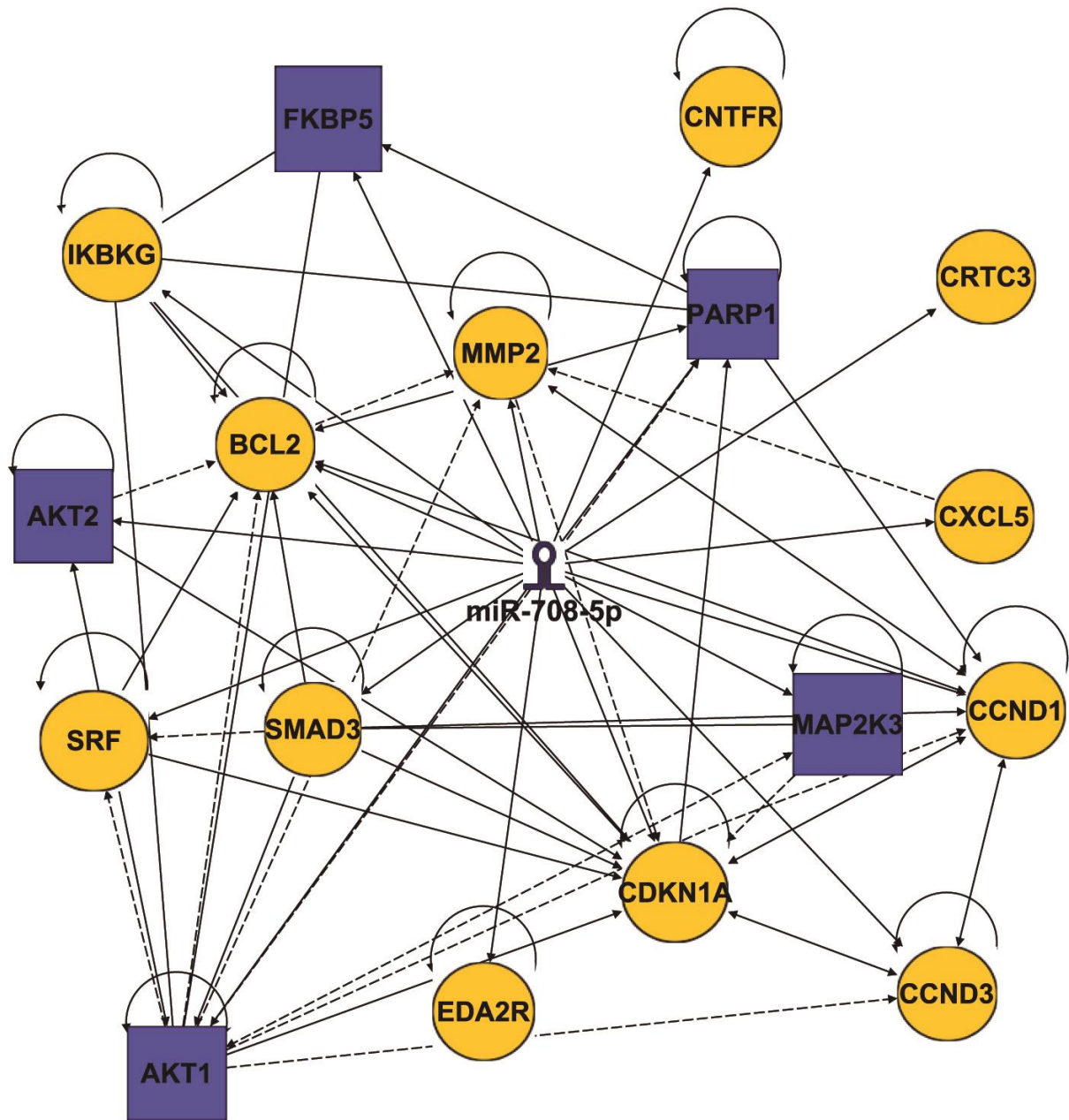
Para investigar una posible asociación funcional, se obtuvieron todos los genes blancos validados para miR-708-5p reportados en las bases de datos de las plataformas *miRNet* y *miRTarBase*. Se obtuvieron 104 genes blanco validados para miR-708-5p, los cuales fueron sometidos a la herramienta basada en web *STRING*. El análisis de enriquecimiento funcional en *STRING* reveló 15 vías enriquecidas de acuerdo con *KEGG*, las cuales contenían 17 genes sobre representados y asociados al metabolismo óseo: *AKT1*, *AKT2*, *CCND1*, *PARP1*, *SMAD3*, *CXCL5*, *FKBP5*, *MAP2K3*, *MMP2*, *IKBKG*, *CCND3*, *CDKN1A*, *CRTC3*, *SRF*, *BCL2*, *CDKN1A* y *EDA2R*.

Las vías de señalización que contenían genes blanco-validados para miR-708-5p y asociadas al metabolismo óseo que se encontraron enriquecidas, fueron las vías de: infección por HTLV-I, PI3K-AKT, TNF, JAK-STAT, MAPK, NF-Kappa B, Estrógenos, HIF-1, FoxO, p53, Rap1, VEGF, Citocina-citocina, Wnt y diferenciación de osteoclastos, como se muestra en la Tabla 5.

Después, los 17 genes blanco-validados y sobre representados en vías asociadas al metabolismo óseo junto con el miR-708-5p fueron analizados en IPA para construir una red de interacción (Figura 14).

Vía de señalización	# de Genes	FDR	Genes
HTLV-1 infection	9	7.08E-09	AKT1,AKT2,CCND1,CCND3,CDKN1A,CRTC3,IKBK,SRF,SMAD3
PI3K-Akt signaling pathway	7	6.37E-07	AKT1,AKT2,BCL2,CCND1,CCND3,CDKN1A,IKBK
TNF signaling pathway	5	1.42E-06	AKT1,AKT2,CXCL5,IKBK,MAP2K3
Jak-STAT signaling pathway	5	6.40E-06	AKT1,AKT2,CCND1,CCND3,CNTFR
Estrogen signaling pathway	4	2.51E-05	AKT1,AKT2,FKBP5,MMP2
HIF-1 signaling pathway	4	3.44E-05	AKT1,AKT2,BCL2,CDKN1A
MAPK signaling pathway	5	4.26E-05	AKT1,AKT2,IKBK,MAP2K3,SRF
FoxO signaling pathway	5	5.82E-05	AKT1,AKT2,CCND1,CDKN1A,SMAD3
p53 signaling pathway	3	0.000288	CCND1,CCND3,CDKN1A
NF-kappa B signaling pathway	3	0.000597	BCL2,IKBK,PARP1
Osteoclast differentiation	3	0.00134	AKT1,AKT2,IKBK
Rap1 signaling pathway	3	0.00522	AKT1,AKT2,MAP2K3
VEGF signaling pathway	2	0.00744	AKT1,AKT2
Cytokine-cytokine receptor interaction	3	0.00943	CNTFR,CXCL5,EDA2R
Wnt signaling pathway	3	0.0321	SMAD3,CCND1,CCND3

**Tabla 5. Análisis de enriquecimiento funcional por KEGG.** Vías de señalización que contienen genes blanco-validados para miR-708-5p y que se encuentran relacionadas con el metabolismo óseo.

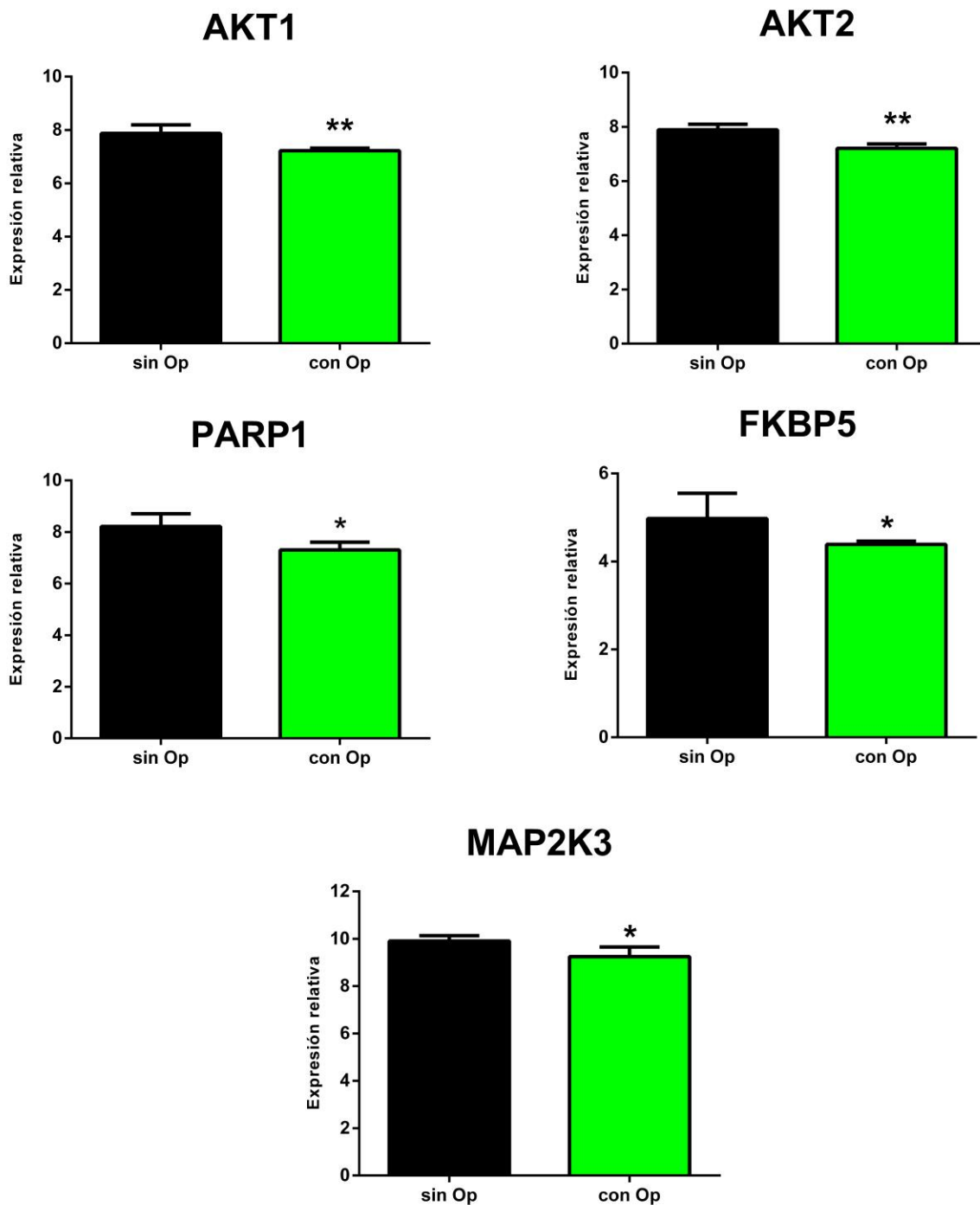


**Figura 14. Análisis de vías de interacción.** Red de interacción entre miR-708-5p y su genes blanco potenciales. Los círculos (amarillos) representan genes blanco pertenecientes a vías asociadas al metabolismo óseo. Los cuadrados (azules) representan a los genes que además fueron validados *in silico* mediante los microarreglos de expresión. Las líneas sólidas representan interacciones directas y las líneas punteadas interacciones indirectas. Las líneas curvas representan autorregulación.

### **Predicción de genes blanco y validación.**

Los 17 genes blanco contenidos en las vías asociadas al metabolismo óseo fueron sometidos a una extensa búsqueda bibliográfica buscando referencias relevantes en *PubMed*. Como resultado, se encontró que 10 genes blanco validados para miR-708-5p han sido descritos o asociados al proceso de osteoclastogénesis: “AKT Serina / Treonina Cinasa 1” (*AKT1*), “AKT Serina / Treonina Cinasa 2” (*AKT2*), “Ciclina D1” (*CCND1*), “Polimerasa de poli (ADP-Ribosa) 1” (*PARP1*), “Miembro de la Familia SMAD 3” (*SMAD3*), “Ligando 5 de quimiocina de motivo C-X-C” (*CXCL5*), “Proteína de unión a FK506 5” (*FKBP5*), “Proteína quinasa activada por mitógenos 3” (*MAP2K3*), “Metaloproteidasa de matriz 2” (*MMP2*), y el “Subunidad gamma quinasa del inhibidor del factor nuclear Kappa B” (*IKBK3*).

Para validar estos genes, se compararon los niveles de expresión con los de un set de datos independiente, proveniente de un análisis de microarreglos previamente reportado<sup>124</sup>. Asumiendo, que un aumento en los niveles de expresión de un miRNA debería corresponder a una disminución en los niveles de expresión del gen blanco<sup>148</sup>. Observamos que 5 de los 17 genes blanco validados y asociados a la osteoclastogénesis, *AKT1*<sup>20,149</sup>, *AKT2*<sup>150</sup>, *PARP1*<sup>151</sup>, *FKBP5*<sup>152</sup> y *MAP2K3*<sup>153</sup> se encontraban diferencialmente expresados, en los datos provenientes de los microarreglos de expresión. Los resultados de los análisis confirmaron una disminución en los niveles de expresión de estos genes entre los grupos de estudio ( $p = 0.008$ ,  $p = 0.004$ ,  $p = 0.01$ ,  $p = 0.01$  y  $p = 0.01$ , respectivamente.) como se puede observar en la Figura 15.

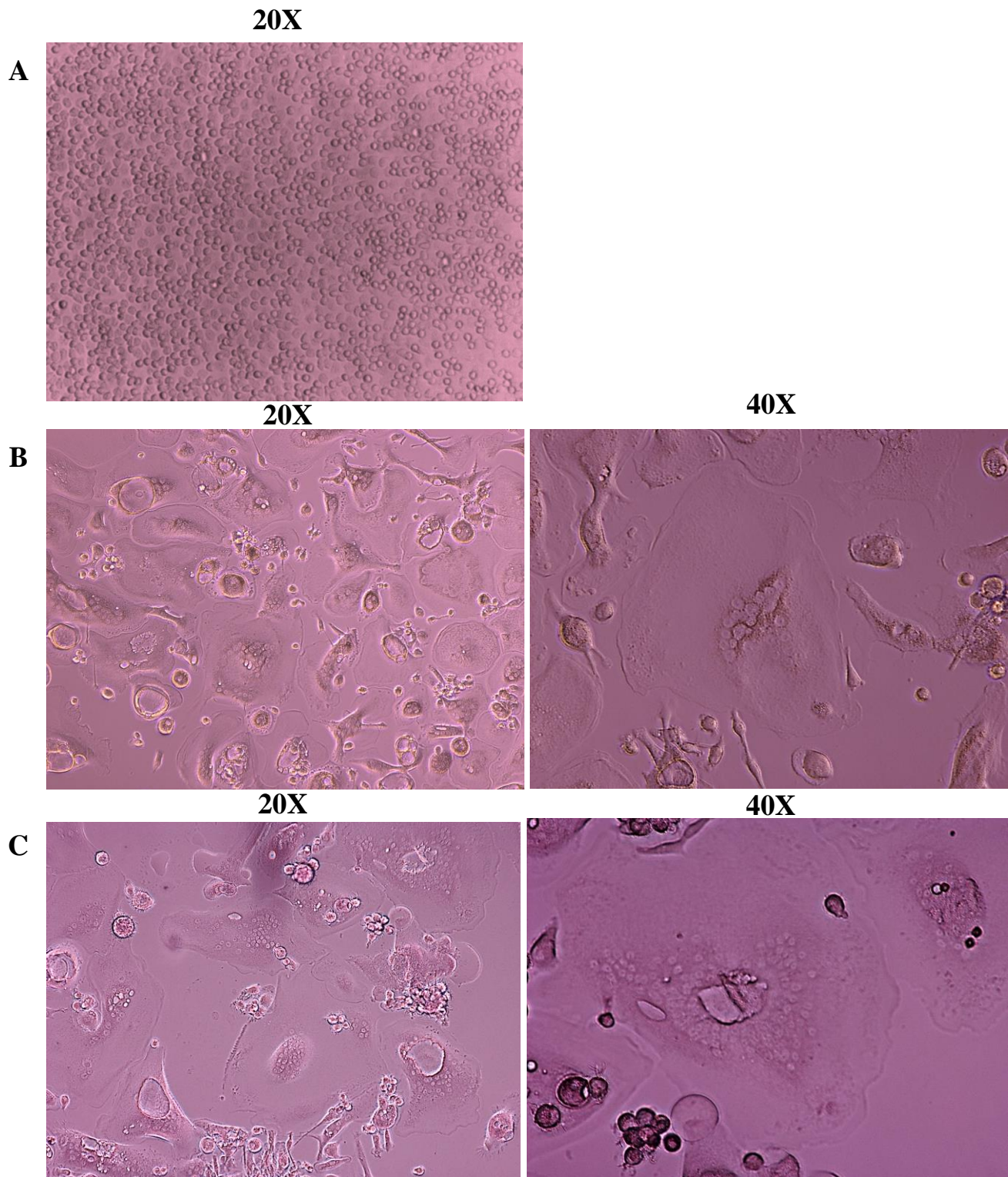


**Figura 15. Análisis *in silico* de genes blanco para miR-708-5p.** Expresión relativa de genes blanco para miR-708-5p con datos provenientes de microarreglos *GeneChip Human U133-Plus 2.0* de Affymetrix en el grupo de mujeres con osteoporosis comparado con el de mujeres sin osteoporosis (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , de acuerdo con la prueba U de Mann-Whitney).

### **Modelo de diferenciación celular in vitro de la osteoclastogénesis a partir de monocitos circulantes humanos de sangre periférica.**

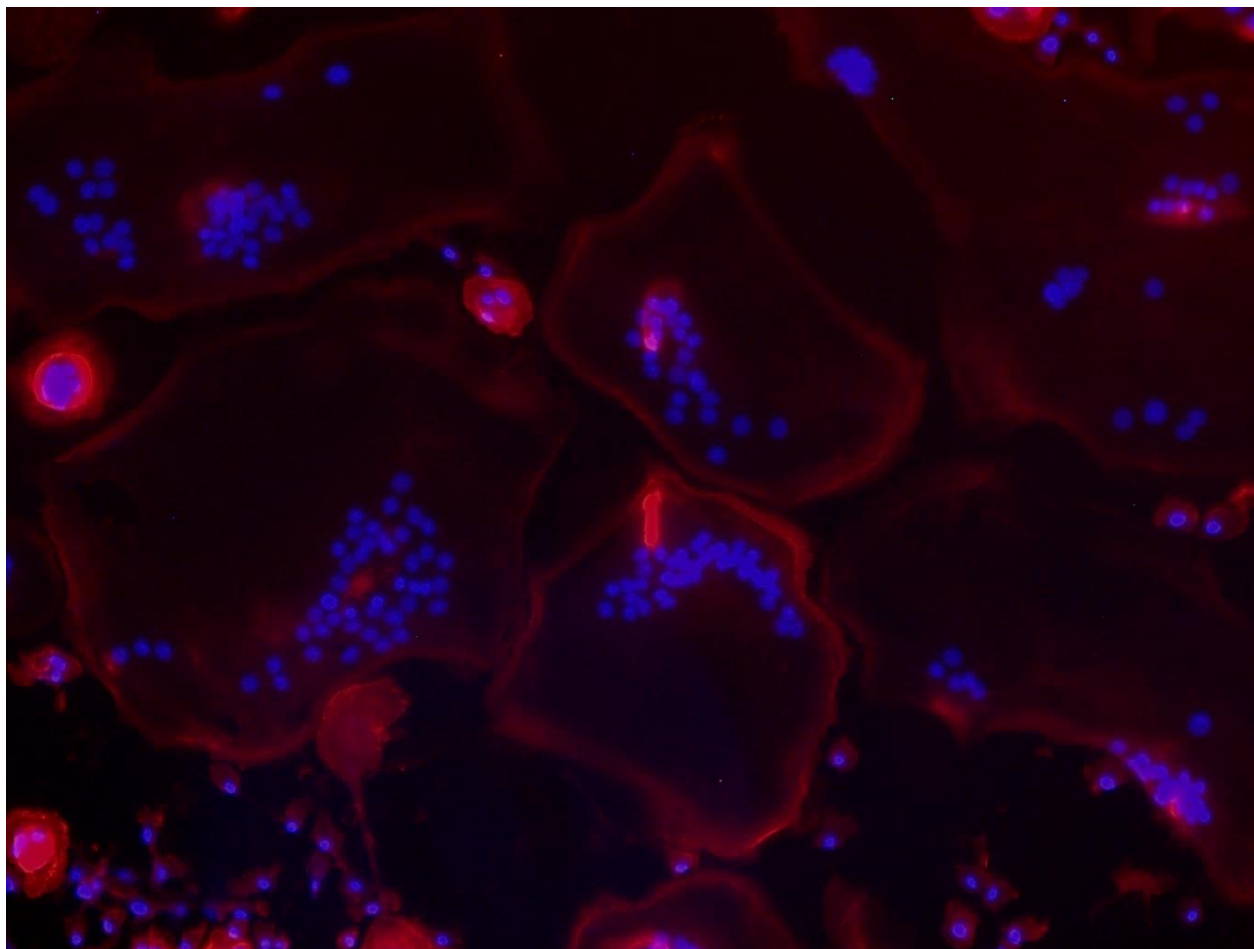
Los MCSP provenientes de voluntarias sanas (Figura 16 A) fueron cultivadas en medio suplementado con M-CSF y RANKL por 21 días. Después de 14 días de tratamiento con citocinas, se pueden observar la presencia de células multinucleadas (Figura 16 B). A los 21 días de tratamiento con citocinas hay un incremento considerable en el tamaño de las células, así como en el número de núcleos por célula (Figura 16, C).

Para llevar a cabo la caracterización a nivel celular, las células fueron fijadas para posteriormente realizar una tinción faloidina/DAPI. Las células fueron observadas con ayuda de un microscopio de fluorescencia. Como puede observarse en la Figura 17 hay presencia de células gigantes multinucleadas, característica que define al linaje osteoclástico<sup>19</sup>. Por otro lado, las células fueron fijadas y se realizó la tinción para TRAP. En las células TRAP positivas pueden observarse pequeños puntos color granate los cuales corresponden a los sitios de actividad (datos no mostrados



**Figura 16. Modelo de diferenciación celular *in vitro* de la osteoclastogénesis a partir de monocitos circulantes de sangre periférica.** Monocitos circulantes de sangre periférica sin tratamiento con M-CSF y RANKL (A). Células multinucleadas después de 14 días de tratamiento con M-CSF y RANKL (B). Células gigantes multinucleadas después de 21 días de tratamiento con M-CSF y RANKL (C). Microscopio digital, Izquierda 20X y derecha 40X.

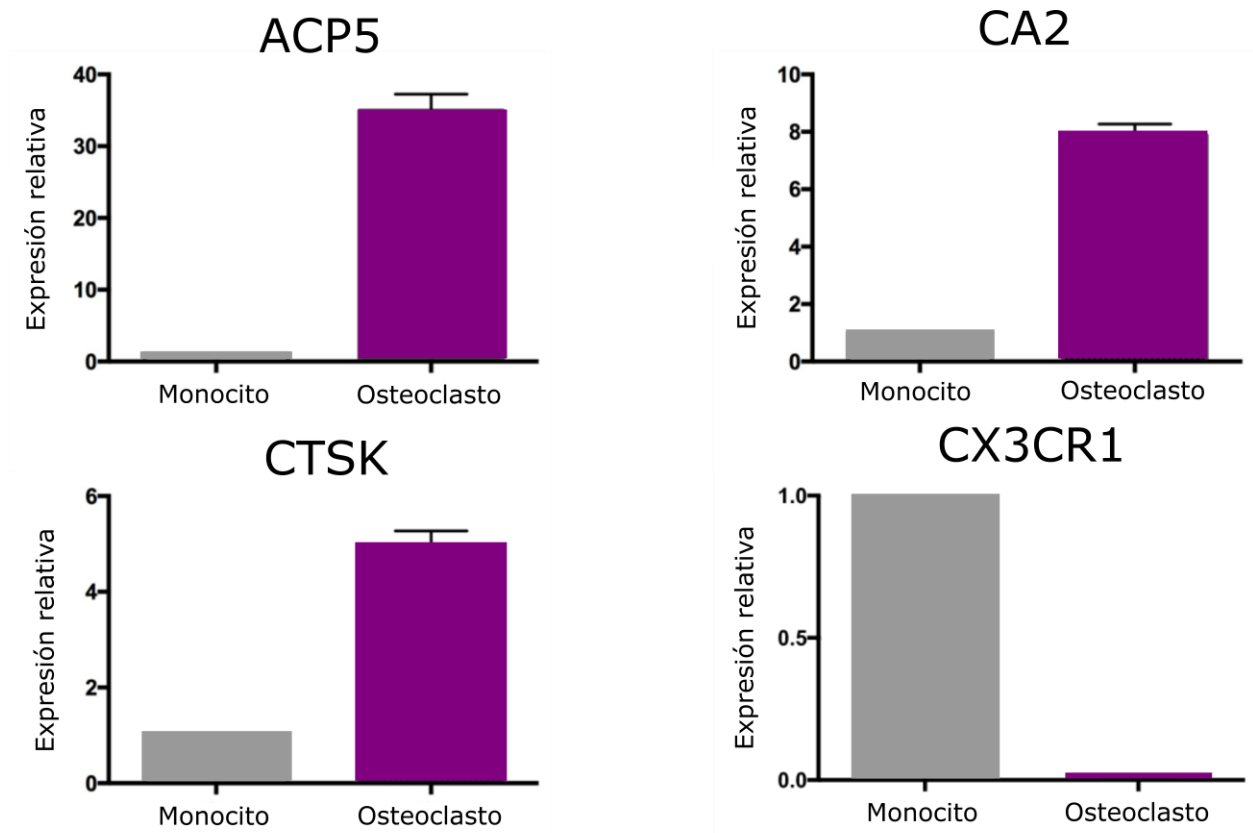




**Figura 17. Caracterización celular de osteoclastos.** Tinción faloidina/DAPI en células multinucleadas después de 21 días de tratamiento con M-CSF y RANKL. En rojo se puede observar la f-actina que conforma el citoesqueleto de las células y en azul los núcleos teñidos por el DAPI. Microscopía de fluorescencia, 20X.

Por último, se realizó una extracción de RNA para realizar la caracterización a nivel molecular donde se evaluó por RT-qPCR en MCSP y en células después de 21 días de tratamiento con citocinas, la expresión de marcadores osteoclasticos como la Anhidrasa carbónica (*CA2*), Catepsina K (*CTSK*) y Fosfatasa ácida resistente al tartrato (*ACP5*) y del Receptor de fractalquina (*CX3CR1*), un marcador monocítico.

En la Figura 18 se puede observar que los niveles de expresión de *CA2*, *CTSK* y *ACP5* incrementan considerablemente después de los 21 días de tratamiento con citocinas mientras que los niveles de expresión de *CX3CR1* casi desaparecen. *CA2*, *CTSK* y *ACP5* son genes que se utilizan como marcadores característicos de osteoclastos ya que tienen funciones esenciales en la actividad osteoclastica, como la fusión del citoesqueleto, la acidificación del microambiente del hueso y la degradación de la matriz mineral, por lo que son genes clave para llevar a cabo el proceso de reabsorción ósea, mientras que *CX3CR1* es un gen que mantiene la homeostasis de los monocitos y promueve su supervivencia<sup>154-157</sup>.



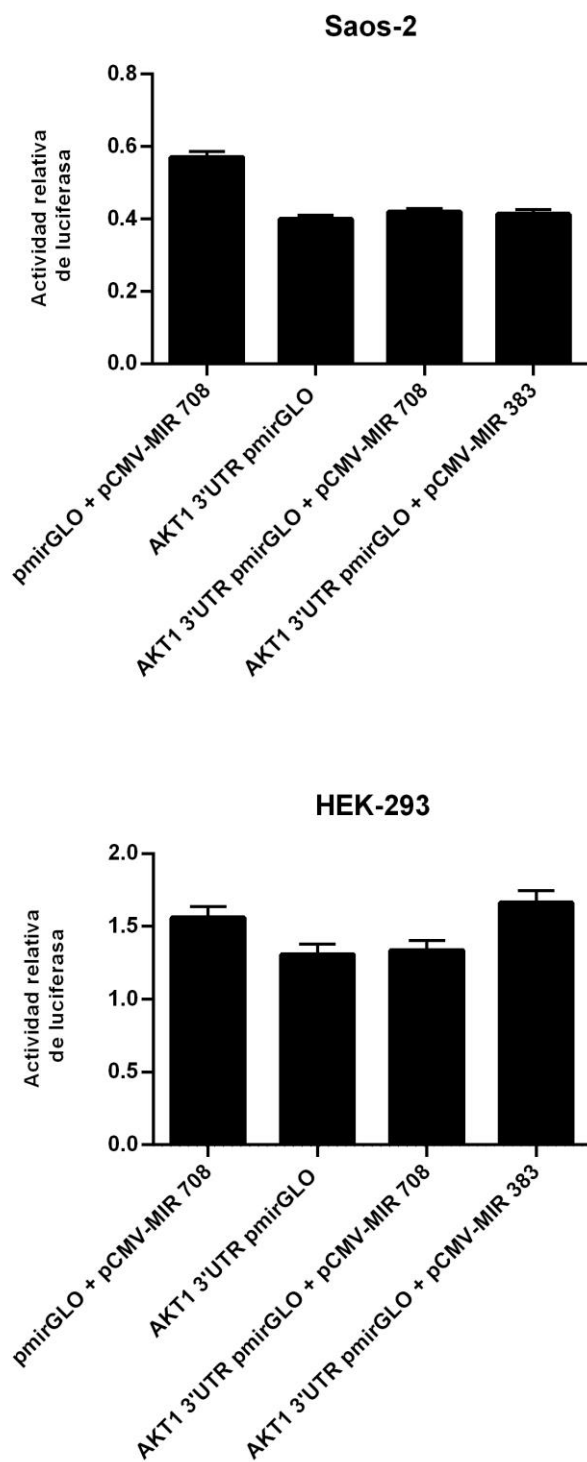
**Figura 18. Caracterización molecular de osteoclastos.** Análisis por RT-qPCR de genes específicos de osteoclastos (*ACP5*, *CA2* y *CTSK*) y uno específico de monocitos (*CX3CR1*). Las barras grises representan MCSP sin tratamiento con citocinas. Las barras moradas representan osteoclastos 21 días después de tratamiento con M-CSF y RANKL.

### **Análisis funcional del miR-708-5p**

Se realizó la cotransfección en células HEK-293 y Saos-2 en 4 condiciones diferentes:

- 1.- pmirGLO (sin *AKT1* 3'UTR) + pCMV-MIR 708
- 2.- *AKT1* 3'UTR pmirGLO
- 3.- *AKT1* 3'UTR pmirGLO + pCMV-MIR 708
- 4.- *AKT1* 3'UTR pmirGLO + pCMV-MIR 383

En ambas líneas celulares se observó una disminución no significativa en la actividad de luciferasa cuando se cotransfectan *AKT1* 3'UTR pmirGLO + pCMV-MIR 708 comparándolo con pmirGLO (sin *AKT1* 3'UTR) + pCMV-MIR 708, sin embargo, podemos observar el mismo fenómeno cuando comparamos la condición *AKT1* 3'UTR pmirGLO con pmirGLO (sin *AKT1* 3'UTR) + pCMV-MIR 708 (Figura 19).



**Figura 19. Ensayo de gen reportero de luciferasa.** Actividad relativa de luciferasa en las líneas celulares Saos-2 y HEK-293 después de ser cotransfectadas en 4 condiciones diferentes.

## DISCUSIÓN

En este trabajo, se identificaron miRNAs diferencialmente expresados en MCSP provenientes de mujeres postmenopáusicas mexicanas con osteoporosis, mediante secuenciación de RNAs pequeños, validación por RT-qPCR y análisis de enriquecimiento funcional. Además, se realizó el establecimiento de un modelo de diferenciación *in vitro* de la osteoclastogénesis a partir de MCSP, el cual fue caracterizado a nivel bioquímico, celular y molecular, el cual servirá para estudios posteriores. Uno de los principales hallazgos de este trabajo es la identificación del miR-708-5p como posible marcador de la osteoporosis postmenopáusica, sumándose a otros miRNAs que han sido reportados previamente como miR-133a, miR-422a, miR-1270 y miR-194-5p<sup>124,158–160</sup>.

El miR-708-5p ha sido previamente identificado en cáncer cervical e involucrado en otras enfermedades como desórdenes degenerativos y patologías cardiovasculares, así como en la respuesta inmune<sup>161,162</sup>. Fueron examinadas posibles fuentes celulares del miR-708-5p. De acuerdo con la base de datos de expresión de microRNAs humanos *miRmine*<sup>163</sup>, la cual es una colección de perfiles de expresión de diferentes sets de datos públicos de secuenciación de miRNAs, el miR-708-5p fue descrito en células de osteosarcoma (línea celular 143B), y no se encuentra presente en suero de mujeres postmenopáusicas. Por otro lado, datos normalizados provenientes de la base de datos pública *The Human miRNA Tissue Atlas*<sup>164</sup>, mostraron bajos niveles de expresión para miR-708-5p en hueso en comparación con otros tejidos como cerebro, pulmón y colon. Sin embargo, reportes recientes mostraron que miR-708-5p es un supresor de la diferenciación mesenquimal de células madre tanto a nivel adipogénico como a nivel

osteogénico<sup>165</sup>. De acuerdo con nuestro conocimiento, el miR-708-5p no había sido identificado en monocitos circulantes, ni relacionado con un fenotipo osteoporótico.

Mediante análisis bioinformáticos se identificaron y clasificaron genes blancos validados para miR-708-5p. El análisis de enriquecimiento funcional mostró quince vías de señalización de KEGG estadísticamente significativas y asociadas al metabolismo óseo. Hay dos de ellas que vale la pena remarcar; la vía de diferenciación de osteoclastos y la vía de señalización de WNT, las cuales comprenden y modulan la biogénesis de dos tipos celulares más importantes y cruciales en el remodelado óseo y el metabolismo del hueso; los osteoclastos y los osteoblastos, respectivamente. Adicionalmente, a través de una búsqueda en la literatura y partiendo de los genes previamente identificados, se encontraron 10 genes blanco clave para miR-708-5p relacionados con la diferenciación de monocitos a osteoclastos y con osteoporosis: *AKT1*, *AKT2*, *CCND1*, *PARP1*, *SMAD3*, *CXCL5*, *FKBP5*, *MAP2K3*, *MMP2*, e *IKBKG*. Adicionalmente, cinco de estos genes blanco (*AKT1*, *AKT2*, *PARP1*, *FKBP5* y *MAP2K3*) mostraron cambios en sus niveles de expresión, confirmando la hipótesis en donde la sobreexpresión del miR-708-5p conlleva a una disminución en la expresión de sus genes blanco, de acuerdo con un análisis de expresión utilizando microarreglos de MCSP provenientes de un grupo independiente de mujeres postmenopáusicas con osteoporosis<sup>124</sup>.

Reportes previos han remarcado la importancia en el metabolismo del hueso, así como en la osteoclastogénesis, de estos cinco genes encontrados como blancos potenciales del miR-708-5p.

## *AKT1*

*AKT* o proteína quinasa B, es un gen que codifica para una serina treonina quinasa que tiene un papel importante en diferentes procesos celulares como el metabolismo de la glucosa, apoptosis, proliferación celular, transcripción y migración. También es conocido por ser un potente transductor de señales de algunos factores anabólicos del hueso como IGF-I, BMP y Wnt. Existen tres miembros de la familia Akt: Akt1, Akt2 y Akt3. La expresión de Akt1 y Akt2 ha sido reportada de forma similar en varios tejidos, aunque la expresión de Akt2 es predominante en tejidos blanco de la insulina como la grasa, el hígado y el músculo. *AKT* es considerada una molécula extremadamente esencial debido a los efectos que resultan de su disfunción en diferentes enfermedades<sup>166</sup>. De los tres miembros que componen a la familia Akt, Akt1 es la isoforma más común tanto en osteoclastos como en osteoblastos. Un estudio en ratones mostró que *AKT1* es un regulador clave de osteoclastos y osteoblastos porque promueve su supervivencia y diferenciación manteniendo la masa ósea y el recambio del hueso<sup>167</sup>. Por otra parte, *Mukherjee* y colaboradores<sup>168</sup> identificaron que *AKT1* tiene la capacidad de modular la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos.

## *AKT2*

Algunos estudios identificaron a *AKT2* como un regulador esencial de la osteogénesis mediada por IGF. La deficiencia de Akt2 inhibe la diferenciación regulada por BMP2 de células madre mesenquimales hacia osteoblastos. Se ha visto que la restitución de *AKT2*, así como la sobreexpresión del factor maestro de transcripción en osteoblastos,



*RUNX2*, suprime la diferenciación osteoblástica. Estas observaciones clarifican papeles importantes para *AKT2* durante la diferenciación osteogénica, indicando que *AKT1* y *AKT2* podrían tener diferentes efectos y consecuencias en la diferenciación de precursores mesenquimales<sup>19,169,170</sup>. Los resultados presentados en este trabajo confirman hallazgos previos<sup>171</sup> y sugieren que *AKT1* y *AKT2* podrían tener un rol relevante en el desarrollo de la osteoporosis mediante la regulación del proceso de diferenciación de osteoclastos. Debido a que existen escasos estudios de validación funcional de Akt en humanos, análisis adicionales son fundamentales para explicar la posible función de *AKT1* y *AKT2* en el proceso de diferenciación de osteoclastos y del desarrollo de la osteoporosis.

### *PARP1*

*PARP1*, también llamado “ADP-ribosiltransferasa difteria tipo toxina 1” es un miembro de la familia de las ADP-ribosiltransferasas que utiliza NAD<sup>+</sup> para la síntesis de polímeros de ADP-ribosa en proteínas aceptoras<sup>172</sup>. La familia ARTD en humanos, consiste en 18 proteínas ya sea con mono o poli actividad ADP-ribosiltransferasa y todas comparten el mismo motivo ARTD en su dominio homólogo catalítico. El efecto positivo o negativo que ejerce *PARP1* en la expresión génica resulta principalmente de su cooperación con factores de transcripción como NF-κB, así como del remodelado y modificación de la cromatina. Evidencia acumulada ha relacionado la actividad de *PARP1* con la diferenciación celular y con el compromiso de las células en procesos de diferenciación terminal<sup>173</sup>.

Dos estudios recientes mostraron que *PARP1* promueve la diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales hacia osteoblastos, lo que sugiere una posible participación de *PARP1* en el remodelado óseo<sup>174,175</sup>. *PARP1* reprimió la expresión de factores osteoclásticos incluyendo a *Tracp* y *Tcirg1* en osteoclastogénesis inducida por RANKL<sup>176</sup>. Esto sugiere que *PARP1* podría estar modulando la diferenciación de osteoclastos y por consiguiente, el remodelado óseo.

Otros trabajos demostraron que una mutante de *PARP1* inhibe la osteoclastogénesis, mientras que su silenciamiento o la supresión de su actividad enzimática, promueve la función y diferenciación de osteoclastos, indicando que una mutante estable de *PARP1* regula de manera negativa la diferenciación de osteoclastos<sup>173,177</sup>. Sin embargo, estudios adicionales son necesarios para mejorar el conocimiento sobre el papel de *PARP1* en la homeostasis del hueso.

### *FKBP5*

La fosforilación del inhibidor de NF- $\kappa$ B alfa (IKBKB)<sup>178</sup> es mediada por la asociación del inhibidor de kappa B quinasa alfa (IKK $\alpha$ ) y su cofactor FKBP5, lo que causa la degradación de IKBKB mediada por el proteasoma, la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B y por lo tanto su activación<sup>179</sup>. Se sabe que la expresión del mRNA de *FKBP5* en células CD34<sup>+</sup> de médula ósea es mayor en artritis reumatoide que en osteoartritis. Ya que las células de médula ósea CD34<sup>+</sup> son células hematopoyéticas pluripotentes, la sobreexpresión de *FKBP5* puede desencadenar diferentes efectos<sup>180</sup>.

Otros estudios han revelado que células de médula ósea CD34<sup>+</sup> tienen la capacidad de diferenciarse a osteoclastos en presencia de M-CSF y RANKL. Por lo tanto, es posible que la sobreexpresión de *FKBP5* en células de médula ósea CD34<sup>+</sup> contribuya al desarrollo de osteoporosis en pacientes con artritis reumatoide<sup>181</sup>. También se sabe que *FKBP5* tiene un efecto directo en la diferenciación de osteoclastos en la línea celular de macrófagos murinos *RAW 264.7*, mediante un mecanismo alternativo a la activación por NF-κB. Esta observación apoya que la sobreexpresión de *FKBP5* regula de manera parcial la osteoporosis inducida por glucocorticoides. Recientemente, la mutación c.163G>C en *FKBP5* fue asociada a un aumento en la actividad y diferenciación de osteoclastos en osteítis deformante, mejor conocida como enfermedad de Paget<sup>182,183</sup>.

### *MAP2K3*

Las proteínas MAPK son un grupo de proteínas que transducen cambios a las células influenciando su proliferación, diferenciación y apoptosis. Por lo general, las MAPK actúan fosforilando factores de transcripción, lo que permite la reprogramación transcripcional de las células para adaptarse al ambiente. Estas respuestas son reguladas por la activación de tres vías de señalización principales: ERK, JNK, y MAPK p38. Cada vía está organizada de manera similar, una activación sucesiva de quinasas río arriba conduce a la activación de su respectiva MAPK. La familia MAPK p38 está compuesta por reguladores esenciales de la osteoclastogénesis mediada por RANKL, lo que las ha hecho candidatas a blancos terapéuticos para la osteoporosis<sup>184</sup>. MKK6 y MKK3, también conocida como MAP2K3 pueden regular de forma diferencial la función de MAPK p38<sup>185</sup>. Estudios en ratones ovariectomizados mostraron que la deficiencia de

MAP2K3 está relacionada con un fenotipo de alta masa ósea y con la subexpresión de *NFATc1*, uno de los factores más importantes en la regulación de la diferenciación de osteoclastos. La deficiencia de *MAP2K3* altera la masa ósea *in vivo* mediante la regulación del número de osteoclastos<sup>186</sup>. De esta forma, *MAP2K3* podría ser un potencial blanco terapéutico ya que su expresión podría modular la pérdida de hueso y consecuentemente tener efectos positivos en la homeostasis ósea controlando la función y/o diferenciación de los osteoclastos.

La osteoporosis es una enfermedad asociada a la edad y al envejecimiento de la población<sup>3</sup>. En los resultados de este trabajo, la edad del grupo de mujeres sin osteoporosis (68.8 años) como la del grupo de mujeres con osteoporosis (70.4 años) fueron muy similares, excluyendo la posibilidad de que la identificación del miR-708-5p pudiera haber sido influenciada por la edad de las participantes ( $p < 0.26$ ). Además, los valores similares en el índice de masa corporal (IMC) de ambos grupos ( $p < 0.87$ ) reflejan que el peso y la estatura no tienen efecto en la identificación del miRNA en MCSP de mujeres con osteoporosis. En cambio, los valores de T-score y DMO de cadera, muestran claras diferencias entre los grupos de estudio ( $p < 0.0006$ ) haciendo posible distinguir de forma precisa al grupo de mujeres con osteoporosis del grupo de mujeres sin osteoporosis. Por consiguiente, el miRNA identificado en este trabajo tiene más probabilidades de estar asociado con el estado de osteoporosis postmenopáusica.

Todas las células del cuerpo comparten el mismo genotipo, aun así, solo un número definido de genes son expresados de manera tejido y tiempo específico. Esto es lo que permite a los organismos adaptarse al ambiente. Los mecanismos epigenéticos son

responsables de esta adaptación. Aunque el prendido y apagado de genes parece estar relacionado a cambios específicos, como los de la metilación del DNA, mecanismos de regulación postranscripcional como los miRNAs podrían tener un papel mucho más importante en la regulación de la síntesis de proteínas en intervalos cortos de tiempo<sup>187</sup>. Debido a esto, los mecanismos mediados por miRNAs son buenos candidatos de ser explorados como potenciales reguladores del remodelado óseo. Se ha demostrado que la secuenciación de RNAs pequeños es útil para identificar miRNAs que son importantes en la regulación de una gama de procesos, incluido el desarrollo, establecimiento y mantenimiento de la diferenciación celular. Por otro lado, los miRNAs han mostrado ser mucho más estables que mRNAs en diferentes microambientes y condiciones, como plasma, suero y orina además de poder ser medidos con mucha más sensibilidad que las proteínas, principalmente por el hecho de que pueden ser amplificados por RT-PCR<sup>127</sup>.

Es esperado que los cambios en los niveles de expresión de los miRNAs entre las mujeres sin osteoporosis y con osteoporosis sean sutiles, como ha sido reportado por otros grupos<sup>158,188</sup>. Sin embargo, estas pequeñas diferencias podrían verse incrementadas de forma exponencial en microambientes específicos como es el caso del hueso<sup>189</sup>. Este es uno de los pocos estudios dirigidos al análisis de los niveles de expresión de miRNAs en MCSP utilizando secuenciación de nueva generación. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse de forma cautelosa y teniendo en cuenta sus limitaciones.

Primero, el tamaño de muestra utilizado en este trabajo es relativamente pequeño aunque comparable con otros estudios que han utilizado secuenciación de nueva

generación (RNA-Seq) en MCSP así como en otras enfermedades<sup>128,190,191</sup>. Por consiguiente, únicamente fue posible validar un microRNA que mostrara cambios claros en su expresión entre grupos. Por lo que otros miRNAs con cambios más sutiles en su expresión podrían haber pasado desapercibidos, de tal forma que más miRNAs asociados a osteoporosis podrían ser identificados con un tamaño de muestra mayor.

Segundo, en lugar de ajustar para comparaciones múltiples, en este trabajo se trabajó con valores crudos de  $p$  para evitar la pérdida de poder estadístico. En este contexto, los posibles falsos positivos fueron controlados mediante la confirmación por RT-qPCR de la expresión diferencial del miR-708-5p como resultado del análisis de secuenciación de RNAs pequeños, así como la disminución de la expresión de los posibles genes blanco fue confirmada por el análisis *in silico* mediante los datos provenientes de microarreglos de expresión.

Tercero, no fue posible validar la unión del miR-708-5p a la región 3'UTR de *AKT1*. Sin embargo, se pudo observar que la actividad de la luciferasa es mayor cuando se transfecta el miR-708-5p con el vector pmirGLO vacío. Cuando se cotransfecta el miR-708-5p junto con el vector pmirGLO que contiene la 3'UTR de *AKT1* se observa una disminución no significativa en la actividad de la luciferasa. Este mismo efecto es observado cuando se transfecta únicamente el vector pmirGLO que contiene la 3'UTR de *AKT1* (sin el miR-708-5p) y cuando se cotransfecta el miR-383 (control negativo) junto con el vector pmirGLO que contiene la 3'UTR de *AKT1*. Estos resultados fueron obtenidos en ambas líneas celulares (Saos-2 y HEK-293) y nos indican que los cambios observados en la actividad de la luciferasa son independientes del efecto del miR-708-

5p, lo que sugiere que podrían existir elementos externos no considerados en estos experimentos que podrían estar uniéndose a la región 3'UTR de *AKT1*.

La región 3'UTR de *AKT1* contiene 3 sitios de unión predichos para miR-708-5p y de acuerdo con las bases de datos de *MiRNet* y *miRTarBase*, *AKT1* es un gen blanco validado experimentalmente para miR-708-5p. Sin embargo, es importante señalar que esta validación fue realizada por la técnica de *western blot*, en la cual se observó una disminución en los niveles de proteína de AKT1 como resultado de la sobreexpresión del miR-708-5p<sup>192</sup>, por lo que es necesario evaluar a nivel transcripcional estos resultados, y/o en un modelo de diferenciación monocito-osteoclasto. Una posible alternativa para estudios posteriores es clonar independientemente cada uno de los tres sitios de unión para miR-708-5p presentes en la región 3'UTR de *AKT1*, así como las mutantes de cada uno, para poder comprobar la regulación postranscripcional de *AKT1* mediante la unión específica del miR-708-5p a esta región.

Finalmente, el establecimiento del modelo de diferenciación *in vitro* de la osteoclastogénesis nos ofrece una amplia gama de posibilidades para estudios posteriores. La generación *in vitro* de osteoclastos a partir de precursores monocíticos de sangre periférica permite el estudio de estas células, ya que el aislamiento de osteoclastos directamente de hueso es un procedimiento extremadamente complicado<sup>193</sup>. Además, nos ofrece la posibilidad de trabajar con osteoclastos humanos diferenciados a partir de MCSP de pacientes sanos y/o con alguna patología, como es el caso de la osteoporosis. Esto nos da un acercamiento aun mayor de lo que podría estar sucediendo en el microambiente del hueso, así como en el posible impacto que podrían tener estas células en el desarrollo de la enfermedad.

## CONCLUSIONES

1.- Este es el primer estudio en el cual el microRNA hsa-miR-708-5p ha sido identificado en monocitos circulantes de sangre periférica (precursores de osteoclastos) y asociado a la osteoporosis postmenopáusica.

2.- Mediante análisis bioinformáticos y una validación *in silico*, se identificaron genes blanco y vías de señalización de gran relevancia en el metabolismo óseo, los cuales resaltan a hsa-miR-708-5p como una molécula que podría ser de importancia en la fisiopatología y el desarrollo de la osteoporosis.

3.- Los resultados obtenidos en este trabajo en conjunto con los reportes previos para *AKT1*, *AKT2*, *PARP1*, *KKBP5* y *MAP2K3* en la diferenciación de monocitos a osteoclastos sugieren que hsa-miR-708-5p podría estar regulando la expresión de estos genes y participando de esta forma en el desarrollo de la osteoporosis.

4.- La secuenciación de nueva generación, en especial small RNA-Seq, proporcionan una visión más en detalle de la regulación postranscripcional, la cual puede ser útil para identificar microRNAs y sus genes con potencial como blancos terapéuticos que puedan contribuir al tratamiento de la osteoporosis, así como para el posible uso de microRNAs como potenciales marcadores que posibiliten la detección temprana de esta enfermedad.



5.- En este estudio no fue posible determinar el posible papel funcional del microRNA miR-708-5p en el metabolismo óseo, por lo que son necesarios estudios adicionales para determinar su posible papel en la diferenciación monocito-osteoclasto, así como en la fisiopatología de la osteoporosis.

6.- En la búsqueda de modelos de estudio para análisis funcionales de las moléculas involucradas en la diferenciación de monocito a osteoclasto, fue posible establecer un modelo de diferenciación de monocitos a osteoclastos que servirá como punto de partida para futuros estudios.

## REFERENCIAS

1. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep.* 2013;2:447. doi:10.1038/bonekey.2013.181.
2. Jepsen KJ. Systems analysis of bone. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009;1(1):73-88. doi:10.1002/wsbm.15.
3. Chen H, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo K-Y. Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:213234. doi:10.1155/2013/213234.
4. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-S139. doi:10.2215/CJN.04151206.
5. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2017;26(6):e12740. doi:10.1111/ecc.12740.
6. Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2008;5(1):49-56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22460846>.
7. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-355. doi:10.1038/nature01660.
8. Krane SM. Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic targets. *J Exp Med.* 2005;201(6):841-843. doi:10.1084/jem.20050354.
9. Stains JP, Civitelli R. Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol.* 2003;4(7):222. doi:10.1186/gb-2003-4-7-222.
10. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science (80- ).* 2000;289(5484):1501 LP-1504. doi:10.1126/science.289.5484.1501.

11. Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(9):1301-1305. doi:[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00107-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00107-9).
12. Thomas G, Baker S, Eisman J, Gardiner E. *Changing RANKL/OPG MRNA Expression in Differentiating Murine Primary Osteoblasts.* Vol 170.; 2001. doi:10.1677/joe.0.1700451.
13. Dunstan CR, Gori F, Hofbauer LC, Khosla S, Spelsberg TC, Riggs BL. The Expression of Osteoprotegerin and RANK Ligand and the Support of Osteoclast Formation by Stromal-Osteoblast Lineage Cells Is Developmentally Regulated\*\*This work was supported by Grant AG-04875 from the National Institute on Aging. *Endocrinology.* 2000;141(12):4768-4776. doi:10.1210/endo.141.12.7840.
14. Seeman E, Delmas PD. Bone Quality — The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. *N Engl J Med.* 2006;354(21):2250-2261. doi:10.1056/NEJMra053077.
15. Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(1):1-8. doi:[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00241-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00241-3).
16. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis\*. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-137. doi:10.1210/edrv.21.2.0395.
17. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(3):171-180. doi:12b6e91c2627fc7a,03210611080ec17a [pii].
18. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- $\kappa$ B-Mediated Regulation of

- Osteoclastogenesis. *Endocrinol Metab.* 2015;30(1):35-44.  
doi:10.3803/EnM.2015.30.1.35.
19. Takumi M, Yuichi N, Jun H, Naoto T, Tetsuro Y, Yuho K, Kohjiro U, Takashi K, Kozo N, Sakae T. Regulation of bone resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through protein kinase b–mediated microtubule stabilization. *J Bone Miner Res.* 2012;28(5):1191-1202. doi:10.1002/jbmr.1844.
  20. Feng X. RANKing Intracellular Signaling in Osteoclasts. *IUBMB Life (International Union Biochem Mol Biol Life)*. 2005. doi:10.1080/15216540500137669.
  21. Feng X, McDonald JM. Disorders of Bone Remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-145. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130203.
  22. Prevention NIHCDP on O, Diagnosis, Therapy and. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.* 2001;285(6):785-795.  
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.285.6.785>.
  23. Mirza F, Canalis E. Management of endocrine disease: Secondary osteoporosis: pathophysiology and management. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(3):R131-R151.  
doi:10.1530/EJE-15-0118.
  24. H. Ralston S, G. Uitterlinden A. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2010;31(5):629-662. doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.141.
  25. Delezé M, Cons-Molina F, Villa AR, Morales-Torres J, Gonzalez-Gonzalez JG, Calva JJ, Murillo A, Briceño A, Orozco J, Morales-Franco G, Peña-Rios H, Guerrero-Yeo G, Aguirre E, Elizondo J. Geographic Differences in Bone Mineral Density of Mexican Women. *Osteoporos Int.* 2000;11(7):562-569.  
doi:10.1007/s001980070076.
  26. Clark P, Carlos F. Epidemiology , costs and burden of osteoporosis in Mexico.

2010;9-17. doi:10.1007/s11657-010-0042-8.

27. Carlos F, Clark P, Galindo-Suárez RM, Chico-Barba LG. Health care costs of osteopenia, osteoporosis, and fragility fractures in Mexico. *Arch Osteoporos*. 2013;8(1):125. doi:10.1007/s11657-013-0125-4.
28. Slemenda CW, Turner CH, Peacock M CJ, Sorbel J, Hui SL JC. The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral density. *Osteoporos Int*. 1996;6:178-182.
29. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston Jr CC. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest*. 1973;52(11):2800-2808. doi:10.1172/JCI107476.
30. Guéguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res*. 1995;10(12):2017-2022. doi:10.1002/jbmr.5650101223.
31. Krall EA, Dawson-Hughes B. Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *J Bone Miner Res*. 1993;8(1):1-9. doi:10.1002/jbmr.5650080102.
32. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston Jr. CC. Genetic determinants of bone mass in adult women: A reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res*. 1991;6(6):561-567. doi:10.1002/jbmr.5650060606.
33. Arden NK, Baker J, Hogg C, Baan K, Spector TD. The heritability of bone mineral density, ultrasound of the calcaneus and hip axis length: A study of postmenopausal twins. *J Bone Miner Res*. 1996;11(4):530-534. doi:10.1002/jbmr.5650110414.

34. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest.* 1987;80(3):706-710. doi:10.1172/JCI113125.
35. Hansen MA, Hassager C, Jensen SB, Christiansen C. Is heritability a risk factor for postmenopausal osteoporosis? *J Bone Miner Res.* 1992;7(9):1037-1043. doi:10.1002/jbmr.5650070906.
36. Makovey J, Nguyen T V, Naganathan V, Wark JD, Sambrook PN. Genetic Effects on Bone Loss in Peri- and Postmenopausal Women: A Longitudinal Twin Study. *J Bone Miner Res.* 2007;22(11):1773-1780. doi:10.1359/jbmr.070708.
37. MacGregor AJ, Spector TD, Snieder H. Genes Control the Cessation of a Woman's Reproductive Life: A Twin Study of Hysterectomy and Age at Menopause<sup>1</sup>. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(6):1875-1880. doi:10.1210/jcem.83.6.4890.
38. Stolk L, Zhai G, van Meurs JBJ, Verbiest MMPJ, Visser JA, Estrada K, Rivadeneira F, Williams FM, Cherkas L, Deloukas P, Soranzo N, de Keyzer JJ, Pop VJM, Lips P, Lebrun CEI, van der Schouw YT, Grobbee DE, Witteman J, Hofman A, Pols HAP, Laven JSE, Spector TD, Uitterlinden AG. Loci at chromosomes 13, 19 and 20 influence age at natural menopause. *Nat Genet.* 2009;41(6):645-647. doi:10.1038/ng.387.
39. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW, Johnston Jr CC. Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet.* 1989;44(3):429-433. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2916585>.
40. Torgerson DJ, Campbell MK, Thomas RE, Reid DM. Prediction of perimenopausal fractures by bone mineral density and other risk factors. *J Bone Miner Res.*

- 1996;11(2):293-297. doi:10.1002/jbmr.5650110219.
41. Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, Cauley J, Black D, Vogt TM. Risk Factors for Hip Fracture in White Women. *N Engl J Med.* 1995;332(12):767-774. doi:10.1056/NEJM199503233321202.
  42. Michaëlsson K, Melhus H, Ferm H, Ahlbom A, Pedersen NL. Genetic Liability to Fractures in the Elderly. *Arch Intern Med.* 2005;165(16):1825-1830. doi:10.1001/archinte.165.16.1825.
  43. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of Osteoporosis. *Endocr Rev.* 2010;31(5):629-662. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2009-0044>.
  44. Hidalgo-Bravo A, Parra-Torres AY, Casas-Avila L, Jimenez-Ortega RF, Ramírez-Salazar EG, Patiño N, Rivera-Paredes B, Salmerón J, Valdés-Flores M, Velázquez-Cruz R. Association of RMND1/CCDC170–ESR1 single nucleotide polymorphisms with hip fracture and osteoporosis in postmenopausal women. *Climacteric.* 2019;22(1):97-104. doi:10.1080/13697137.2018.1538339.
  45. Falcón-Ramírez E, Hidalgo-Bravo A, Barredo-Prieto BA, Pineda-Gómez E, Valdés-Flores M. Association of the COL1A1 gene polymorphisms in Mexican postmenopausal women with fracture or with low bone mineral density at the hip. *Aging Clin Exp Res.* 2016;28(3):567-571. doi:10.1007/s40520-015-0449-6.
  46. Rojano-Mejía D, Coral-Vázquez RM, Espinosa LC, López-Medina G, Aguirre-García MC, Coronel A, Canto P. JAG1 and COL1A1 polymorphisms and haplotypes in relation to bone mineral density variations in postmenopausal Mexican-Mestizo Women. *Age (Dordr).* 2013;35(2):471-478. doi:10.1007/s11357-011-9363-9.
  47. Estrada K, Stykarsdottir U, Evangelou E, Hsu Y-H, Duncan EL, Ntzani EE, Oei L,

Albagha OME, Amin N, Kemp JP, Koller DL, Li G, Liu C-T, Minster RL, Moayyeri A, Vandenput L, Willner D, Xiao S-M, Yerges-Armstrong LM, Zheng H-F, Alonso N, Eriksson J, Kammerer CM, Kaptoge SK, Leo PJ, Thorleifsson G, Wilson SG, Wilson JF, Aalto V, Alen M, Aragaki AK, Aspelund T, Center JR, Dailiana Z, Duggan DJ, Garcia M, Garcia-Giralt N, Giroux S, Hallmans G, Hocking LJ, Husted LB, Jameson KA, Khusainova R, Kim GS, Kooperberg C, Koromila T, Kruk M, Laaksonen M, Lacroix AZ, Lee SH, Leung PC, Lewis JR, Masi L, Mencej-Bedrac S, Nguyen T V, Nogues X, Patel MS, Prezelj J, Rose LM, Scollen S, Siggeirsdottir K, Smith A V, Svensson O, Trompet S, Trummer O, van Schoor NM, Woo J, Zhu K, Balcells S, Brandi ML, Buckley BM, Cheng S, Christiansen C, Cooper C, Dedoussis G, Ford I, Frost M, Goltzman D, González-Macías J, Kähönen M, Karlsson M, Khusnutdinova E, Koh J-M, Kollia P, Langdahl BL, Leslie WD, Lips P, Ljunggren Ö, Lorenc RS, Marc J, Mellström D, Obermayer-Pietsch B, Olmos JM, Pettersson-Kymmer U, Reid DM, Riancho JA, Ridker PM, Rousseau F, et al.

Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet.* 2012;44(5):491-501.

doi:10.1038/ng.2249.

48. Zhu K, Prince RL. Lifestyle and Osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(1):52-59. doi:10.1007/s11914-014-0248-6.
49. Yin J, Zhang Q, Liu A, Du W, Wang X, Hu X, Ma G. Factors affecting calcium balance in Chinese adolescents. *Bone.* 2010;46(1):162-166. doi:https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.09.022.
50. Martin BR, Palacios C, McCabe GP, Wigertz K, McCabe LD, Jackman LA, Braun M, Peacock M, Bryant RJ, Weaver CM. Racial differences in skeletal calcium



- retention in adolescent girls with varied controlled calcium intakes. *Am J Clin Nutr.* 2007;85(6):1657-1663. doi:10.1093/ajcn/85.6.1657.
51. Warensjö E, Byberg L, Melhus H, Gedeberg R, Mallmin H, Wolk A, Michaëlsson K. Dietary calcium intake and risk of fracture and osteoporosis: prospective longitudinal cohort study. *BMJ.* 2011;342:d1473-d1473. doi:10.1136/bmj.d1473.
  52. Dawson-Hughes B. Calcium insufficiency and fracture risk. *Osteoporos Int.* 1996;6(3):37-41. doi:10.1007/BF01623763.
  53. Lips P. Vitamin D Deficiency and Secondary Hyperparathyroidism in the Elderly: Consequences for Bone Loss and Fractures and Therapeutic Implications. *Endocr Rev.* 2001;22(4):477-501. doi:10.1210/edrv.22.4.0437.
  54. Ooms ME, Lips P, Roos JC, van der Vijgh WJF, Popp-Snijders C, Bezemer PD, Bouter LM. Vitamin D status and sex hormone binding globulin: Determinants of bone turnover and bone mineral density in elderly women. *J Bone Miner Res.* 1995;10(8):1177-1184. doi:10.1002/jbmr.5650100806.
  55. Kuchuk NO, Pluijm SMF, van Schoor NM, Looman CWN, Smit JH, Lips P. Relationships of Serum 25-Hydroxyvitamin D to Bone Mineral Density and Serum Parathyroid Hormone and Markers of Bone Turnover in Older Persons. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(4):1244-1250. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2008-1832>.
  56. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin d levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med.* 2004;116(9):634-639. doi:<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2003.12.029>.
  57. Rizzoli R, Stevenson JC, Bauer JM, van Loon LJC, Walrand S, Kanis JA, Cooper C, Brandi M-L, Diez-Perez A, Reginster J-Y. The role of dietary protein and

- vitamin D in maintaining musculoskeletal health in postmenopausal women: A consensus statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Maturitas*. 2014;79(1):122-132. doi:<https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2014.07.005>.
58. Bolton-Smith C, Grubb DA, Reid DM, Martin JC, Campbell MK, Garton MJ, Robins SP, Lee SJ, New SA. Dietary influences on bone mass and bone metabolism: further evidence of a positive link between fruit and vegetable consumption and bone health? *Am J Clin Nutr*. 2000;71(1):142-151. doi:10.1093/ajcn/71.1.142.
59. Zhu K, Devine A, Prince RL. The effects of high potassium consumption on bone mineral density in a prospective cohort study of elderly postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2009;20(2):335-340. doi:10.1007/s00198-008-0666-3.
60. Cockayne S, Adamson J, Lanham-New S, Shearer MJ, Gilbody S, Torgerson DJ. Vitamin K and the Prevention of Fractures: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Arch Intern Med*. 2006;166(12):1256-1261. doi:10.1001/archinte.166.12.1256.
61. Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Horcajada M-N. When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev*. 2009;22(1):68-81. doi:DOI: 10.1017/S095442240926402X.
62. Hunter DC, Skinner MA, Lister CE. Impact of phytochemicals on maintaining bone and joint health. *Nutrition*. 2008;24(4):390-392. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.12.015>.
63. Denova-Gutiérrez E, Clark P, Tucker KL, Muñoz-Aguirre P, Salmerón J. Dietary patterns are associated with bone mineral density in an urban Mexican adult population. *Osteoporos Int*. 2016;27(10):3033-3040. doi:10.1007/s00198-016-

3633-4.

64. Frost HM. Bone “mass” and the “mechanostat”: A proposal. *Anat Rec.* 1987;219(1):1-9. doi:10.1002/ar.1092190104.
65. Daly R. The Effect of Exercise on Bone Mass and Structural Geometry during Growth. In: *Medicine and Sport Science*. Vol 51. ; 2007:33-49. doi:10.1159/000103003.
66. Bolam KA, van Uffelen JGZ, Taaffe DR. The effect of physical exercise on bone density in middle-aged and older men: A systematic review. *Osteoporos Int.* 2013;24(11):2749-2762. doi:10.1007/s00198-013-2346-1.
67. Zehnacker CH, Bemis-Dougherty A. Effect of Weighted Exercises on Bone Mineral Density in Post Menopausal Women A Systematic Review. *J Geriatr Phys Ther.* 2007;30(2).  
[https://journals.lww.com/jgpt/Fulltext/2007/08000/Effect\\_of\\_Weighted\\_Exercises\\_on\\_Bone\\_Mineral.7.aspx](https://journals.lww.com/jgpt/Fulltext/2007/08000/Effect_of_Weighted_Exercises_on_Bone_Mineral.7.aspx).
68. Gómez-Cabello A, Ara I, González-Agüero A, Casajús JA, Vicente-Rodríguez G. Effects of Training on Bone Mass in Older Adults. *Sport Med.* 2012;42(4):301-325. doi:10.2165/11597670-000000000-00000.
69. Kelsey JL. Risk factors for osteoporosis and associated fractures. *Public Health Rep.* 1989;104 Suppl(Suppl):14-20.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2517695>.
70. Eleftheriou KI, Rawal JS, James LE, Payne JR, Loosemore M, Pennell DJ, World M, Drenos F, Haddad FS, Humphries SE, Sanders J, Montgomery HE. Bone structure and geometry in young men: The influence of smoking, alcohol intake and physical activity. *Bone.* 2013;52(1):17-26.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.09.003>.

71. Lucas R, Fraga S, Ramos E, Barros H. Early Initiation of Smoking and Alcohol Drinking as a Predictor of Lower Forearm Bone Mineral Density in Late Adolescence: A Cohort Study in Girls. *PLoS One*. 2012;7(10):e46940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046940>.
72. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, McCloskey E V, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2005;16(2):155-162. doi:10.1007/s00198-004-1640-3.
73. Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int*. 2001;68(5):259-270. doi:10.1007/BF02390832.
74. Tansavatdi K, McClain B, M Herrington D. *The Effects of Smoking on Estradiol Metabolism*. Vol 56.; 2004.
75. de Vernejoul MC, Bielakoff J, Herve M, Gueris J, Hott M, Modrowski D, Kuntz D, Miravet L, Ryckewaert A. Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men. *Clin Orthop Relat Res*. 1983;(179):107-115. <http://europepmc.org/abstract/MED/6617002>.
76. Ma D, Li Y, Hackfort B, Zhao Y, Xiao J, Swanson PC, Lappe J, Xiao P, Cullen D, Akhter M, Recker R, Xiao GG. Smoke-Induced Signal Molecules in Bone Marrow Cells from Altered Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 Mice. *J Proteome Res*. 2012;11(7):3548-3560. doi:10.1021/pr2012158.
77. Iqbal J, Sun L, Cao J, Yuen T, Lu P, Bab I, Leu NA, Srinivasan S, Wagage S,

- Hunter CA, Nebert DW, Zaidi M, Avadhani NG. Smoke carcinogens cause bone loss through the aryl hydrocarbon receptor and induction of Cyp1 enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):11115-11120. doi:10.1073/pnas.1220919110.
78. Callréus M, McGuigan F, Åkesson K. Adverse Effects of Smoking on Peak Bone Mass May Be Attenuated by Higher Body Mass Index in Young Female Smokers. *Calcif Tissue Int*. 2013;93(6):517-525. doi:10.1007/s00223-013-9785-8.
79. Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. *BMJ*. 1997;315(7112):841-846. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353503>.
80. Bloushtain-Qimron N, Yao J, Shipitsin M, Maruyama R, Polyak K. Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells. *Cell Cycle*. 2009;8(6):809-817. doi:10.4161/cc.8.6.7938.
81. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693-705. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
82. Kang M-I, Kim H-S, Jung Y-C, Kim Y-H, Hong S-J, Kim M-K, Baek K-H, Kim C, Rhyu M-G. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem*. 2007;102(1):224-239. doi:10.1002/jcb.21291.
83. Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H, Ishii M. DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. *Nat Med*. 2015;21:281. <https://doi.org/10.1038/nm.3774>.
84. Delgado-Calle J, Garmilla P, Riancho JA. Do Epigenetic Marks Govern Bone

- Mass and Homeostasis? *Curr Genomics*. 2012;13(3):252-263.  
doi:10.2174/138920212800543129.
85. Rojas A, Aguilar R, Henriquez B, Lian JB, Stein JL, Stein GS, van Wijnen AJ, van Zundert B, Allende ML, Montecino M. Epigenetic Control of the Bone-master Runx2 Gene during Osteoblast-lineage Commitment by the Histone Demethylase JARID1B/KDM5B. *J Biol Chem*. 2015;290(47):28329-28342.  
doi:10.1074/jbc.M115.657825.
86. Kim AY, Lee HW, Suh JH, Park SY, Lee YS, Kim JB. Histone Deacetylase 1-Mediated Histone Modification Regulates Osteoblast Differentiation. *Mol Endocrinol*. 2006;20(10):2432-2443. doi:10.1210/me.2006-0061.
87. The ENCODE (ENCyclopedia Of DNA Elements) Project. *Science* (80- ). 2004;306(5696):636 LP-640. doi:10.1126/science.1105136.
88. Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*. 2014;9(1):3-12.  
doi:10.4161/epi.27473.
89. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854. doi:https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y.
90. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-862. doi:https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4.
91. Meese E, Hart M, Abu-Halima M, Fischer U, Alles J, Minet M, Backes C, Fehlmann T, Galata V, Keller A, Grässer FA, Lenhof H-P. An estimate of the total number of true human miRNAs. March 2019. doi:10.1093/nar/gkz097.

92. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*. 2016;64(2):320-333. doi:10.1016/j.molcel.2016.09.004.
93. Tüfekci KU, Öner MG, Meuwissen RLJ, Genç Ş. The Role of MicroRNAs in Human Diseases BT - miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis. In: Yousef M, Allmer J, eds. Totowa, NJ: Humana Press; 2014:33-50. doi:10.1007/978-1-62703-748-8\_3.
94. Hagiwara S, Cooper PK and ME. microRNA as Biomarkers and Regulator of Cardiovascular Development and Disease. *Curr Pharm Des*. 2014;20(14):2347-2370. doi:http://dx.doi.org/10.2174/13816128113199990495.
95. Huang W. MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics BT - Bioinformatics in MicroRNA Research. In: Huang J, Borchert GM, Dou D, Huan J (Luke), Lan W, Tan M, Wu B, eds. New York, NY: Springer New York; 2017:57-67. doi:10.1007/978-1-4939-7046-9\_4.
96. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol*. 2016;231(1):25-30. doi:10.1002/jcp.25056.
97. Kim Y-K, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007;26(3):775-783. doi:10.1038/sj.emboj.7601512.
98. Tanzer A, Stadler PF. Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *J Mol Biol*. 2004;339(2):327-335. doi:https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.065.
99. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-235. doi:10.1038/nature03049.
100. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex

- in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004;18(24):3016-3027.  
doi:10.1101/gad.1262504.
101. Meijer HA, Smith EM, Bushell M. Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochem Soc Trans.* 2014;42(4):1135 LP-1140.  
doi:10.1042/BST20140142.
102. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:509. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
103. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:402. doi:10.3389/fendo.2018.00402.
104. Husain A, Jeffries MA. Epigenetics and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(5):450-458. doi:10.1007/s11914-017-0391-y.
105. Zhang Y, Xie R-L, Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(24):9863-9868.  
doi:10.1073/pnas.1018493108.
106. DU F, Wu H, Zhou Z, Liu YU. microRNA-375 inhibits osteogenic differentiation by targeting runt-related transcription factor 2. *Exp Ther Med.* 2015;10(1):207-212.  
doi:10.3892/etm.2015.2477.
107. Yang M, Pan Y, Zhou Y. miR-96 promotes osteogenic differentiation by suppressing HBEGF–EGFR signaling in osteoblastic cells. *FEBS Lett.* 2014;588(24):4761-4768. doi:10.1016/j.febslet.2014.11.008.
108. Li J, He X, Wei W, Zhou X. MicroRNA-194 promotes osteoblast differentiation via downregulating STAT1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;460(2):482-488.



doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.059>.

109. Qadir AS, Um S, Lee H, Baek K, Seo BM, Lee G, Kim G-S, Woo KM, Ryoo H-M, Baek J-H. miR-124 Negatively Regulates Osteogenic Differentiation and In vivo Bone Formation of Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Biochem.* 2015;116(5):730-742. doi:10.1002/jcb.25026.
110. Li H, Li T, Fan J, Li T, Fan L, Wang S, Weng X, Han Q, Zhao RC. miR-216a rescues dexamethasone suppression of osteogenesis, promotes osteoblast differentiation and enhances bone formation, by regulating c-Cbl-mediated PI3K/AKT pathway. *Cell Death Differ.* 2015;22(12):1935-1945. doi:10.1038/cdd.2015.99.
111. Cao Y, Lv Q, Lv C. MicroRNA-153 suppresses the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by targeting bone morphogenetic protein receptor type II. 2015:760-766. doi:10.3892/ijmm.2015.2275.
112. Kureel J, Dixit M, Tyagi AM, Mansoori MN, Srivastava K, Raghuvanshi A, Maurya R, Trivedi R, Goel A, Singh D. miR-542-3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation. *Cell Death Dis.* 2014;5(2):e1050-e1050. doi:10.1038/cddis.2014.4.
113. Shi C, Qi J, Huang P, Jiang M, Zhou Q, Zhou H, Kang H, Qian N, Yang Q, Guo L, Deng L. MicroRNA-17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells. *Bone.* 2014;68:67-75. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.08.004>.
114. Kim K, Kim JH, Kim I, Lee J, Seong S, Park Y-W, Kim N. MicroRNA-26a regulates RANKL-induced osteoclast formation. *Mol Cells.* 2015;38(1):75-80. doi:10.14348/molcells.2015.2241.

115. Wu Z, Yin H, Liu T, Yan W, Li Z, Chen J, Chen H, Wang T, Jiang Z, Zhou W, Xiao J. MiR-126-5p regulates osteoclast differentiation and bone resorption in giant cell tumor through inhibition of MMP-13. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;443(3):944-949. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.075>.
116. Zhao C, Sun W, Zhang P, Ling S, Li Y, Zhao D, Peng J, Wang A, Li Q, Song J, Wang C, Xu X, Xu Z, Zhong G, Han B, Chang Y-Z, Li Y. miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. *RNA Biol*. 2015;12(3):343-353. doi:10.1080/15476286.2015.1017205.
117. Liu T, Qin A-P, Liao B, Shao H-G, Guo L-J, Xie G-Q, Yang L, Jiang T-J. A novel microRNA regulates osteoclast differentiation via targeting protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *Bone*. 2014;67:156-165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.07.004>.
118. Cong F, Wu N, Tian X, Fan J, Liu J, Song T, Fu H. MicroRNA-34c promotes osteoclast differentiation through targeting LGR4. *Gene*. 2017;610:1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.028>.
119. Zhao H, Zhang J, Shao H, Liu J, Jin M, Chen J, Huang Y. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1/Smad4 Signaling Affects Osteoclast Differentiation via Regulation of miR-155 Expression. *Mol Cells*. 2017;40(3):211-221. doi:10.14348/molcells.2017.2303.
120. Zhou Y, Deng HW, Shen H. Circulating monocytes: an appropriate model for bone-related study. *Osteoporos Int*. 2015;26(11):2561-2572. doi:10.1007/s00198-015-3250-7.
121. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth*

- Factor Rev.* 2004;15(1):49-60. doi:10.1016/j.cytogfr.2003.10.005.
122. Schulert GS, Fall N, Harley JB, Shen N, Lovell DJ, Thornton S, Grom AA. Monocyte microRNA expression in active systemic juvenile idiopathic arthritis implicates miR-125a-5p in polarized monocyte phenotypes. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ)*. 2016;68(9):2300-2313. doi:10.1002/art.39694.
123. de la Rica L, García-Gómez A, Comet NR, Rodríguez-Ubreva J, Ciudad L, Vento-Tormo R, Company C, Álvarez-Errico D, García M, Gómez-Vaquero C, Ballestar E. NF- $\kappa$ B-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome Biol.* 2015;16(1):2. doi:10.1186/s13059-014-0561-5.
124. Jiménez-Ortega RF, Ramírez-Salazar EG, Parra-Torres AY, Muñoz-Montero SA, Rangel-Escareño C, Salido-Guadarrama I, Rodríguez-Dorantes M, Quiterio M, Salmerón J, Velázquez-Cruz R. Identification of microRNAs in human circulating monocytes of postmenopausal osteoporotic Mexican-Mestizo women: A pilot study. *Exp Ther Med.* 2017;14(6):5464-5472. doi:10.3892/etm.2017.5260.
125. Buitrago DH, Patnaik SK, Kadota K, Kannisto E, Jones DR, Adusumilli PS. Small RNA Sequencing for Profiling MicroRNAs in Long-Term Preserved Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Non-Small Cell Lung Cancer Tumor Specimens. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121521>.
126. Jaksik R, Iwanaszko M, Rzeszowska-Wolny J, Kimmel M. Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biol Direct.* 2015;10:46. doi:10.1186/s13062-015-0077-2.
127. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M, Division B, Hutchinson F, Health P, Divisions S, Hutchinson F. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev*

- Genet.* 2015;13(5):358-369. doi:10.1038/nrg3198.MicroRNA.
128. Zawada AM, Zhang L, Emrich IE, Rogacev KS, Krezdorn N, Rotter B, Fliser D, Devaux Y, Ziegler-Heitbrock L, Heine GH. MicroRNA profiling of human intermediate monocytes. *Immunobiology.* 2017;222(3):587-596. doi:<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.11.006>.
129. Di Resta C, Galbiati S, Carrera P, Ferrari M. Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *EJIFCC.* 2018;29(1):4-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29765282>.
130. Dena-Gutiérrez E, Flores YN, Gallegos-Carrillo K, Ramírez-Palacios P, Rivera-Paredes B, Muñoz-Aguirre P, Velázquez-Cruz R, Torres-Ibarra L, Meneses-León J, Méndez-Hernández P, Hernández-López R, Salazar-Martínez E, Talavera JO, Tamayo J, Castañón S, Osuna-Ramírez I, León-Maldonado L, Flores M, Macías N, Antúnez D, Huitrón-Bravo G, Salmerón J. Health workers cohort study: methods and study design. *Salud Publica Mex.* 2016;58(6):708-716. doi:10.21149/spm.v58i6.8299.
131. Velázquez-Cruz R, García-Ortiz H, Castillejos-López M, Quiterio M, Valdés-Flores M, Orozco L, Villarreal-Molina T, Salmerón J. WNT3A gene polymorphisms are associated with bone mineral density variation in postmenopausal mestizo women of an urban Mexican population: findings of a pathway-based high-density single nucleotide screening. *Age (Omaha).* 2014;36(3):9635. doi:10.1007/s11357-014-9635-2.
132. Dena-Gutiérrez E, Castañón S, Talavera JO, Flores M, Macías N, Rodríguez-Ramírez S, Flores YN, Salmerón J. Dietary Patterns Are Associated with Different

- Indexes of Adiposity and Obesity in an Urban Mexican Population. *J Nutr.* 2011;141(5):921-927. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.110.132332>.
133. Andrews S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. citeulike-article-id:11583827.
134. Shen W, Le S, Li Y, Hu F. SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation. *PLoS One.* 2016;11(10):e0163962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>.
135. Davis MPA, van Dongen S, Abreu-Goodger C, Bartonicek N, Enright AJ. Kraken: A set of tools for quality control and analysis of high-throughput sequence data. *Methods.* 2013;63(1):41-49. doi:10.1016/j.ymeth.2013.06.027.
136. Freedman JE, Gerstein M, Mick E, Rozowsky J, Levy D, Kitchen R, Das S, Shah R, Danielson K, Beaulieu L, Navarro FCP, Wang Y, Galeev TR, Holman A, Kwong RY, Murthy V, Tanriverdi SE, Koupenova M, Mikhalev E, Tanriverdi K. Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma. *Nat Commun.* 2016;7:11106. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11106>.
137. Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):68-73. doi:10.1093/nar/gkt1181.
138. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.
139. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.*

- 2010;26(1):139-140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.
140. Liu R, Holik AZ, Su S, Jansz N, Chen K, Leong HS an, Blewitt ME, Asselin-Labat ML, Smyth GK, Ritchie ME. Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(15):e97. doi:10.1093/nar/gkv412.
141. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. {limma} powers differential expression analyses for {RNA}-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
142. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B.* 1995:289-300.
143. Law CW, Chen Y, Shi W, Smyth GK. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.* 2014;15(2):R29. doi:10.1186/gb-2014-15-2-r29.
144. Hobbs B, Collin F, Antonellis KJ, Irizarry RA, Speed TP, Scherf U, Beazer-Barclay YD. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003;4(2):249-264. doi:10.1093/biostatistics/4.2.249.
145. Hemingway F, Cheng X, Knowles HJ, Estrada FM, Gordon S, Athanasou NA. In vitro generation of mature human osteoclasts. *Calcif Tissue Int.* 2011;89(5):389-395. doi:10.1007/s00223-011-9530-0.
146. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: An Emerging Role as a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development. *Annu Rev Immunol.* 1994;12(1):85-116. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.000505.
147. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and

- therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460-469.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>.
148. Macfarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*. 2010;11(7):537-561. doi:10.2174/138920210793175895.
149. Johnson ME, Deliard S, Zhu F, Xia Q, Wells AD, Hankenson KD, Grant SFA. A ChIP-seq-defined genome-wide map of MEF2C binding reveals inflammatory pathways associated with its role in bone density determination. *Calcif Tissue Int*. 2014;94(4):396-402. doi:10.1007/s00223-013-9824-5.
150. Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop*. 2012;3(11):175-181.  
doi:10.5312/wjo.v3.i11.175.
151. Feng HT, Cheng T, Steer JH, Joyce DA, Pavlos NJ, Leong C, Kular J, Liu J, Feng X, Zheng MH, Xu J. Myocyte enhancer factor 2 and microphthalmia-associated transcription factor cooperate with NFATc1 to transactivate the V-ATPase d2 promoter during RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2009;284(21):14667-14675. doi:10.1074/jbc.M901670200.
152. Westra WH, Sturm P, Drillenburger P, Choti MA, Klimstra DS, Albores-Saavedra J, Montag A, Offerhaus GJ, Hruban RH. K-ras oncogene mutations in osteoclast-like giant cell tumors of the pancreas and liver: genetic evidence to support origin from the duct epithelium. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(10):1247-1254.
153. Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv LB, Takayanagi H, Kamijo R. Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat Med*. 2009;15(9):1066-1071. doi:10.1038/nm.2007.

154. Lehenkari P, Hentunen TA, Laitala-Leinonen T, Tuukkanen J, Väänänen HK. Carbonic Anhydrase II Plays a Major Role in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Effecting the Steady State Intracellular pH and Ca<sup>2+</sup>. *Exp Cell Res.* 1998;242(1):128-137. doi:<https://doi.org/10.1006/excr.1998.4071>.
155. Wilson SR, Peters C, Saftig P, Brömme D. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem.* 2009;284(4):2584-2592. doi:10.1074/jbc.M805280200.
156. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 2008;41(3):218-223. doi:10.1080/08916930701694667.
157. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim K-W, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood.* 2009;113(4):963 LP-972. doi:10.1182/blood-2008-07-170787.
158. Wang Y, Li L, Moore BT, Peng X-H, Fang X, Lappe JM, Recker RR, Xiao P. MiR-133a in Human Circulating Monocytes: A Potential Biomarker Associated with Postmenopausal Osteoporosis. Huang Q, ed. *PLoS One.* 2012;7(4):e34641. doi:10.1371/journal.pone.0034641.
159. Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng X-HH, Lappe JM, Recker RR, Xiao P. MiR-422a as a Potential Cellular MicroRNA Biomarker for Postmenopausal Osteoporosis. *PLoS One.* 2014;9(5):e97098. doi:10.1371/journal.pone.0097098.
160. Meng J, Zhang D, Pan N, Sun N, Wang Q, Fan J, Zhou P, Zhu W, Jiang L. Identification of miR-194-5p as a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PeerJ.* 2015;3:e971. doi:10.7717/peerj.971.



161. Monteleone NJ, Lutz CS. miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. *Oncotarget*. 2017;8(41):71292-71316. doi:10.18632/oncotarget.19772.
162. Necela BM, Carr JM, Asmann YW, Thompson EA. Differential Expression of MicroRNAs in Tumors from Chronically Inflamed or Genetic (APCMin/+) Models of Colon Cancer. *PLoS One*. 2011;6(4):e18501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018501>.
163. Panwar B, Omenn GS, Guan Y. miRmine: a database of human miRNA expression profiles. Hofacker I, ed. *Bioinformatics*. 2017;33(10):1554-1560. doi:10.1093/bioinformatics/btx019.
164. Ludwig N, Leidinger P, Becker K, Backes C, Fehlmann T, Pallasch C, Rheinheimer S, Meder B, Stähler C, Meese E, Keller A. Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(8):3865-3877. doi:10.1093/nar/gkw116.
165. Hao C, Yang S, Xu W, Shen JK, Ye S, Liu X, Dong Z, Xiao B, Feng Y. MiR-708 promotes steroid-induced osteonecrosis of femoral head, suppresses osteogenic differentiation by targeting SMAD3. *Sci Rep*. 2016;6:22599. <http://dx.doi.org/10.1038/srep22599>.
166. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017;169(3):381-405. doi:10.1016/j.cell.2017.04.001.
167. Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, Ohba S, Ikeda T, Saito T, Shinoda Y, Kawasaki Y, Ogata N, Hoshi K, Akiyama T, Chen WS, Hay N, Tobe K, Kadowaki T, Azuma Y, Tanaka S, Nakamura K, Chung U II, Kawaguchi H. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling. *PLoS One*. 2007;2(10). doi:10.1371/journal.pone.0001058.

168. Mukherjee A, Rotwein P. Selective Signaling by Akt1 Controls Osteoblast Differentiation and Osteoblast-Mediated Osteoclast Development. *Mol Cell Biol.* 2012;32(2):490-500. doi:10.1128/MCB.06361-11.
169. Mukherjee A, Wilson EM, Rotwein P. Selective Signaling by Akt2 Promotes Bone Morphogenetic Protein 2-Mediated Osteoblast Differentiation . *Mol Cell Biol.* 2010;30(4):1018-1027. doi:10.1128/MCB.01401-09.
170. Peng X, Xu P-Z, Chen M-L, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 2003;17(11):1352-1365. doi:10.1101/gad.1089403.
171. Zhang Y, Wang N, Ma J, Chen XC, Li Z, Zhao W. Expression profile analysis of new candidate genes for the therapy of primary osteoporosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(3):433-440.
172. Hottiger MO. SnapShot: ADP-Ribosylation Signaling. *Mol Cell.* 2015;58(6):1134.e1. doi:10.1016/j.molcel.2015.06.001.
173. Robaszekiewicz A, Qu C, Wisnik E, Ploszaj T, Mirsaidi A, Kunze FA, Richards PJ, Cinelli P, Mbalaviele G, Hottiger MO. ARTD1 regulates osteoclastogenesis and bone homeostasis by dampening NF- $\kappa$ B-dependent transcription of IL-1 $\beta$ . *Sci Rep.* 2016;6:21131. <http://dx.doi.org/10.1038/srep21131>.
174. Robaszekiewicz A, Valkó Z, Kovács K, Hegedűs C, Bakondi E, Bai P, Virág L. The role of p38 signaling and poly(ADP-ribosyl)ation-induced metabolic collapse in the osteogenic differentiation-coupled cell death pathway. *Free Radic Biol Med.* 2014;76:69-79. doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.027>.

175. Robaszkiewicz A, Erdélyi K, Kovács K, Kovács I, Bai P, Rajnavölgyi É, Virág L. Hydrogen peroxide-induced poly(ADP-ribosyl)ation regulates osteogenic differentiation-associated cell death. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(8):1552-1564. doi:<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.567>.
176. Beranger GE, Momier D, Rochet N, Carle GF, Scimeca J. Poly(adp-ribose) Polymerase-1 Regulates Tracp Gene Promoter Activity During RANKL-Induced Osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2008;23(4):564-571. doi:10.1359/jbmr.0711111.
177. Wang C, Qu C, Alippe Y, Bonar SL, Civitelli R, Abu-Amer Y, Hottiger MO, Mbalaviele G. Poly-ADP-ribosylation-mediated degradation of ARTD1 by the NLRP3 inflammasome is a prerequisite for osteoclast maturation. *Cell Death Dis.* 2016;7(3):e2153. doi:10.1038/cddis.2016.58.
178. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand P-O, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon A-M, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin A-C, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G. A physical and functional map of the human TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 2004;6:97. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1086>.
179. Karin M, Delhase M. The I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol.* 2000;12(1):85-98. doi:<https://doi.org/10.1006/smim.2000.0210>.
180. Matsushita R, Hashimoto A, Heumatology EXR. Enhanced expression of mRNA for FK506-binding protein 5 in bone marrow CD34 positive cells in patients with rheumatoid arthritis. 2010:87-90.

181. Blin-Wakkach C, Wakkach A, Rochet N, Carle GF. Characterization of a Novel Bipotent Hematopoietic Progenitor Population in Normal and Osteopetrotic Mice. *J Bone Miner Res.* 2004;19(7):1137-1143. doi:10.1359/JBMR.040318.
182. Kimura M, Nagai T, Matsushita R, Hashimoto A, Miyashita T, Hirohata S. Role of FK506 binding protein 5 (FKBP5) in osteoclast differentiation. *Mod Rheumatol.* 2013;23(6):1133-1139. doi:10.1007/s10165-012-0809-4.
183. Lu B, Jiao Y, Wang Y, Dong J, Wei M, Cui B, Sun Y, Wang L, Zhang B, Chen Z, Zhao Y. A FKBP5 mutation is associated with Paget’s disease of bone and enhances osteoclastogenesis. *Exp Mol Med.* 2017;49(5):e336. doi:10.1038/emm.2017.64.
184. Böhm C, Hayer S, Kilian A, Zaiss MM, Finger S, Hess A, Engelke K, Kollias G, Krönke G, Zwerina J, Schett G, David J-P. The  $\alpha$ -Isoform of p38 MAPK Specifically Regulates Arthritic Bone Loss. *J Immunol.* 2009;183(9):5938 LP-5947. <http://www.jimmunol.org/content/183/9/5938.abstract>.
185. Inoue T, Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. Regulation of p38 MAPK by MAPK Kinases 3 and 6 in Fibroblast-Like Synoviocytes. *J Immunol.* 2005;174(7):4301 LP-4306. <http://www.jimmunol.org/content/174/7/4301.abstract>.
186. Boyle DL, Hammaker D, Edgar M, Zaiss MM, Teufel S, David JP, Schett G, Firestein GS. Differential Roles of MAPK Kinases MKK3 and MKK6 in Osteoclastogenesis and Bone Loss. Heymann D, ed. *PLoS One.* 2014;9(1):e84818. doi:10.1371/journal.pone.0084818.
187. Garmilla-Ezquerria P, Sañudo C, Delgado-Calle J, Pérez-Nuñez MI, Sumillera M RJ. Analysis of the Bone MicroRNome in Osteoporotic Fractures Materials and Methods. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(1):30-37. doi:10.1007/s00223-014-9935-7.

188. De-Ugarte L, Serra-Vinardell J, Nonell L, Balcells S, Arnal M, Nogues X, Mellibovsky L, Grinberg D, Diez-Perez A, Garcia-Giralt N. Expression profiling of microRNAs in human bone tissue from postmenopausal women. *Hum Cell*. 2018;31(1):33-41. doi:10.1007/s13577-017-0181-y.
189. Dvornyk V, Liu Y, Lu Y, Shen H, Lappe JM, Recker RR, Deng H, Lei S. Effect of Menopause on Gene Expression Profiles of Circulating Monocytes: A Pilot in vivo Microarray Study. *J Genet Genomics*. 2007;34(11):974-983. doi:10.1016/S1673-8527(07)60110-6.
190. Maasalu K, Laius O, Zhytnik L, Kõks S, Prans E, Reimann E, Märtson A. Featured Article: Transcriptional landscape analysis identifies differently expressed genes involved in follicle-stimulating hormone induced postmenopausal osteoporosis. *Exp Biol Med*. 2017;242(2):203-213. doi:10.1177/1535370216679899.
191. Liu Y-Z, Maney P, Puri J, Zhou Y, Baddoo M, Strong M, Wang Y-P, Flemington E, Deng H-W. RNA-sequencing study of peripheral blood monocytes in chronic periodontitis. *Gene*. 2016;581(2):152-160. doi:10.1016/j.gene.2016.01.036.
192. Wu X, Liu T, Fang O, Dong W, Zhang F, Leach L, Hu X, Luo Z. MicroRNA-708-5p acts as a therapeutic agent against metastatic lung cancer. *Oncotarget*. 2015;7(3):2417-2432. doi:10.18632/oncotarget.6594.
193. NICHOLSON GC, MALAKELLIS M, COLLIER FM, CAMERON PU, HOLLOWAY WR, GOUGH TJ, GREGORIO-KING C, KIRKLAND MA, MYERS DE. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL). *Clin Sci*. 2000;99(2):133 LP-140. doi:10.1042/cs0990133.