



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACION DE MIRNAS ASOCIADOS A LA VARIACIÓN DE LA DENSIDAD
MINERAL ÓSEA EN MONOCITOS CIRCULANTES DE SANGRE PERIFÉRICA DE
MUJERES POSMENOPÁUSICAS

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ROGELIO FRANK JIMÉNEZ ORTEGA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. RAFAEL VELÁZQUEZ CRUZ
FACULTAD DE MEDICINA

CÓMITE TUTOR

DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MÉXICO NOVIEMBRE 2020.



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.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
OSTEOPOROSIS.....	2
ANTECEDENTES HISTÓRICOS	2
CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS.....	4
DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS	6
Rayos X convencionales.	7
Absorciometría de un solo fotón (SPA).....	7
Absorciometría de doble fotón (DPA).	8
Tomografía cuantitativa computarizada (QCT).	8
ÍNDICE T-Score.....	10
FACTORES DE RIESGO DE LA OSTEOPOROSIS.....	11
Menopausia	11
Edad	12
Genética	12
Masa corporal	13
Estilo de vida	14
Ingesta de calcio.....	14
Vitamina D	14
Tabaco.....	15
Alcohol	15
Predicción de individuos con riesgo elevado de fractura. FRAX®.	15
La capacidad de evaluar la fuerza del esqueleto mediante el uso de técnicas radiológicas como la DXA, dio lugar a que la OMS definiera a la osteoporosis en términos de la DMO, que junto al T-score son usados como una referencia de diagnóstico y de intervención, siendo el principal abordaje para evaluar el riesgo de fractura. Si bien es una técnica probada, existen varios problemas con el uso exclusivo de las pruebas de DMO en la evaluación de riesgo de fractura.....	15
Limitaciones de FRAX®.....	17
REMODELADO ÓSEO.....	18
Osteoclastos	18
Osteoblastos	20
Osteocitos	21
Células T y células B	22
Megacariocitos.....	23
Osteomacs.....	23
Remodelado óseo.....	24
Fase de activación.....	24
Fase de reabsorción	25
Fase reversa.....	26
Fase de formación	27
Fase de mineralización.....	28
EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO	29

MicroRNAs (miRNAs).....	34
Funciones de los miRNAs	34
Biogénesis de los miRNAs	35
ANTECEDENTES	39
MiRNAs en osteoblastogénesis.....	39
Monocitos como modelo en el estudio de osteoclastos	42
miRNAs en osteoclastos	44
Estudios en líneas celulares.....	44
Estudios en modelos animales.....	45
Estudios en monocitos humanos.....	46
JUSTIFICACIÓN	51
OBJETIVOS	51
Objetivo general	51
Objetivos particulares	51
MATERIAL Y MÉTODOS.....	52
Población y diseño del estudio	52
Aislamiento de monocitos (CD14 ⁺).....	53
Perfil de miRNAs	53
Expresión de genes del microarreglo	54
Análisis de datos de microarreglos.....	54
Análisis RT-qPCR.....	54
Análisis bioinformático	55
Análisis funcional de vías de señalización	56
Análisis Estadístico.....	56
Ensayo de gen reportero	57
Clonación de la región 3'UTR en el vector pMIR-Target.....	58
Líneas celulares estables	59
Ensayo MTT	60
Ensayo de herida.....	61
Ensayo de migración e invasión por Transwell	61
RESULTADOS.....	62

Enriquecimiento de monocitos	62
Evaluación del enriquecimiento de monocitos por citometría de flujo	63
Obtención de RNA y evaluación por número de integridad del RNA (RIN)	64
Análisis de microarreglos	65
Control de Calidad	65
Genes blancos predichos de miRNAs asociados a osteoporosis	71
Redes de interacción de los genes blancos y los miRNAs	71
Predicción y verificación de genes blancos	73
Ensayo de gen reportero	76
Ensayo MTT	78
Ensayo de Herida	79
Análisis de migración por el método de transwell	84
Ensayos de invasión celular por transwell.....	88
<i>DISCUSIÓN</i>	92
<i>REFERENCIAS</i>	104

RESUMEN

La osteoporosis es una enfermedad sistémica que se caracteriza por la pérdida de masa ósea y deterioro de la microarquitectura del hueso, aumentando la fragilidad y el riesgo de fractura. Esta enfermedad se origina por alteraciones en el Remodelado óseo, donde una mayor actividad de los osteoclastos (reabsorción ósea) supera la actividad de los osteoblastos (formación ósea) conduciendo al desarrollo de huesos porosos susceptibles a fracturas. Un modelo ampliamente utilizado en el estudio de la osteoporosis son los monocitos circulantes, ya que son células precursoras de osteoclastos y tienen la capacidad de expresar marcadores característicos de estas células, tales como: Interleucina 1 (IL1), Interleucina 6 (IL6) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α). Por otro lado, los microRNAs (miRNAs), son una clase de RNAs pequeños, no codificantes, que regulan la expresión pos-transcripcional de sus genes blancos. Estas moléculas juegan un papel importante en múltiples procesos biológicos como: migración, invasión, diferenciación, muerte celular, entre otros y en los últimos años se ha propuesto como reguladores de enfermedades asociadas al metabolismo óseo como la osteoporosis. El objetivo de este trabajo fue identificar miRNAs diferencialmente expresados en monocitos circulantes de sangre periférica de mujeres posmenopáusicas con DMO normal y DMO baja.

A través de la tecnología de los microarreglos GeneChip miRNA 4.0 y HGU 133 plus 2.0 de Affymetrix se identificaron miRNAs diferencialmente expresados. A través de un análisis bioinformático se realizó la búsqueda de genes blancos de cada miRNA seguido de una comparación entre los genes blancos y los genes sub-expresados encontrados en el microarreglo HGU133 plus 2.0. Los genes que resultaron significativos fueron sometidos a un análisis de vías de señalización para identificar procesos asociados al metabolismo óseo y osteoporosis. Los miRNAs, así como sus respectivos genes blancos con un papel importante en el metabolismo óseo fueron validados por RT-qPCR.

Se identificaron 3 miRNAs sobre-expresados en el grupo de baja DMO: miR-1270, miR-548x-3p y miR-8084. Algunos de los genes blancos de cada miRNA mostraron un papel importante en vías de señalización asociadas al metabolismo óseo como IRF8 el cual es un gen blanco de miR-1270 con una función anti osteoclastogénica, cuya regulación mediada por miR-1270 promovería la constante diferenciación de osteoclastos y por lo tanto el desarrollo de huesos porosos característicos de la osteoporosis.

INTRODUCCIÓN

OSTEOPOROSIS

De acuerdo con el consenso realizado el pasado 27 al 29 de marzo del año 2000 por los institutos nacionales de la salud (NIH) sobre prevención, diagnóstico y terapia de la osteoporosis (OP), esta enfermedad se define como un trastorno esquelético caracterizado por una resistencia ósea comprometida que predispone a un mayor riesgo de fractura [1]. Anteriormente se pensaba que la OP era parte del ciclo natural del envejecimiento de las mujeres sin considerar edad o género. Sin embargo, esta enfermedad es en gran parte prevenible debido a los grandes avances científicos en la comprensión de sus causas, diagnóstico y tratamiento. Gracias a esto, ahora se sabe que la salud ósea es un proceso que debe optimizarse a lo largo de la vida tanto en hombres como en mujeres ya que existen múltiples factores que influyen en la salud ósea durante distintas etapas de la vida y son esenciales para prevenir el desarrollo de esta enfermedad y sus devastadoras consecuencias.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La OP es una enfermedad tan antigua como la historia del ser humano, la primera concepción patológica registrada se origina en el siglo XIX por patólogos alemanes. En estos registros se distinguen tres tipos de enfermedades óseas: osteomalacia, osteoporosis y osteítis fibrosa quística [2]. Sin embargo, la primera descripción de OP data del siglo VII a manos del médico bizantino Paulus Aegineta quien realizó la primera caracterización de esta enfermedad en su enciclopedia *Epitome, Hypomnema* o *Memorandum* la cual tuvo fuerte influencia en los estudios de medicina de la época. Más adelante, en 1597 esta descripción de huesos porosos fue nuevamente caracterizada y mejorada por el italiano Marcus Donatus y fue hasta 1751 que el profesor de anatomía francés Joseph-Guichard Du Verney en su obra *Traité de maladies des os*, describe un trastorno en el que la concavidad de los cuerpos vertebrales invaden el disco intervertebral (actualmente conocida como nódulo de Schmorl), atribuyendo este proceso y el consecuente aumento de la cifosis vertebral a la fragilidad ósea, que es la consecuencia patológica de la osteoporosis [3].

A principios del siglo XX el término “osteoporosis” fue acuñado por el patólogo germano-francés Lobstein quien originalmente la nombro como “ortogénesis imperfecta” sin embargo, aún no se consideraba esta enfermedad como una entidad clínica, sino que se relacionaba con problemas de mala absorción, hiperparatiroidismo, obstrucción biliar, entre otras causas. Es hasta 1941 que se comienza a definir esta enfermedad como una entidad propia, basada en una definición anatómica-patológica que se describe como un trastorno en el que hay carencia de tejido óseo, si es que el tejido existente se encuentra totalmente calcificado, lo cual permite diferenciarla de la osteomalacia en la que hay un retraso o ausencia de mineralización de la matriz mineral ósea. Estos antecedentes permitieron abrir el camino para el estudio etiológico, diagnóstico y terapéutico de la OP [2].

Actualmente el conocimiento que se tiene sobre la naturaleza de la OP es solo parcial, lo que explica que aún no dispongamos de una definición completa de la misma y por lo tanto resulte difícil el establecimiento de sus criterios diagnósticos. Además de la definición propuesta por NIH 2010, la mayoría de los autores coincide en definir la OP como “una disminución de la masa ósea por unidad de volumen” y lo que realmente dificulta generalizar esta definición, es evaluar lo que se puede considerar como masa ósea normal, ya que esta varía fisiológicamente según edad, sexo, origen étnico etc.

La característica diferencial de la OP radica en la disminución de la densidad ósea a nivel de tejido esponjoso que conlleva a una disminución y adelgazamiento de las fibrillas, las cuales proporcionan una mayor transparencia radiológica del hueso. De este modo, la pérdida de tejido esponjoso sería la causa de fracturas a nivel vertebral, mientras que la pérdida de tejido óseo compacto sería la causa de fracturas de los huesos largos. Tomando en cuenta lo anterior, podemos considerar a la OP como una disminución de masa ósea, hasta el punto de poner al paciente en riesgo de sufrir una fractura espontánea tras un traumatismo mínimo [2].

Esta definición se asocia a un concepto cuantitativo relacionado con la densidad ósea y a uno cualitativo asociado a la alteración de la arquitectura del hueso. A pesar de esto, durante toda la década de los 90's predominó el concepto cuantitativo que vino a ser reforzado en 1994 por un grupo de expertos de la organización mundial de la salud (OMS) para establecer una clasificación de valor práctico que actualmente se encuentra vigente. Esta clasificación consiste en comparar la masa ósea cuantificada por densitometría de un individuo determinado con la media del pico de masa ósea que se alcanza al final de la juventud denominado como T-score del cual se hablara más adelante [4].

Esta propuesta se aceptó rápidamente de forma generalizada permitiendo definir los conceptos de osteopenia y osteoporosis sin fractura, de este modo es posible detectar individuos en riesgo para así tener la posibilidad de prevenir y tratar esta enfermedad oportunamente. Lo anterior se vio reforzado por el hecho de que la disminución de la masa ósea es un determinante muy importante del riesgo de fractura. Sin embargo, un inconveniente que ha generado esta clasificación de la OMS es la creación del subgrupo denominado osteopenia, un concepto más académico que real debido a que es una situación teórica y conceptualmente epidemiológica, en la que la densidad mineral ósea no es ni normal ni osteoporótica [5].

Un ejemplo de esta situación es el estudio OFELY, en el que el 48% de las fracturas de una población de 671 mujeres posmenopáusicas se produjeron en mujeres con osteopenia mientras que el 44% de estas fracturas se produjeron en las que tenían criterios densitométricos de osteoporosis [6]. Por lo que es importante tener en cuenta que el riesgo de fractura no viene determinado solo por la masa ósea, sino que otros factores como la edad, sexo, tratamientos farmacológicos, origen étnico y antecedentes hereditarios pueden predisponer la misma o mayor incidencia de fractura sobre el individuo que la padece, sin necesidad de una densidad mineral ósea baja.

CLASIFICACIÓN DE LA OSTEOPOROSIS

Existen muchas clasificaciones de la OP basadas en diferentes criterios como: extensión anatómica (localizada y generalizada), edad de inicio (juvenil, del adulto, posmenopáusica, senil), etiología (primaria, secundaria), etc. La clasificación clásica de la OP diferencia a la OP primaria en dos tipos: 1) Posmenopáusica (tipo I) y senil (tipo II).

1.3.1 Osteoporosis primarias

Constituye el grupo más amplio, incluye los casos de OP en los que no se identifica ninguna enfermedad que la justifique directamente.

1.3.2 Osteoporosis idiopática juvenil y Osteoporosis del adulto joven

Afecta a niños o adultos jóvenes de ambos sexos con función gonadal anormal. La OP idiopática juvenil es un trastorno raro que se inicia entre los 8 y 14 años. Se manifiesta por la aparición brusca de dolor óseo y de fracturas con traumatismos mínimos. El trastorno remite por si solo en muchos casos y la recuperación ocurre de forma espontánea en un plazo de 4 ó 5 años.

La OP idiopática del adulto joven se observa en varones jóvenes y mujeres premenopáusicas en las que no se objetiva ningún factor etiológico. El comienzo del trastorno en algunas mujeres aparece con el embarazo o poco después. Estas mujeres presentan disminuciones de la DMO del hueso trabecular que pueden permanecer baja durante muchos años. La terapia con estrógenos no es adecuada en este tipo de OP. La evolución es variable y a pesar de que los episodios de fracturas recurrentes son característicos, no se produce un deterioro progresivo en todos los afectados [7].

Osteoporosis posmenopáusica (tipo I).

Ocurre en un sub-grupo de mujeres posmenopáusicas de 51 a 75 años y se caracteriza por una pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular (alta remodelación ósea). Las fracturas de los cuerpos vertebrales y de la porción distal del radio son complicaciones frecuentes. Se observa disminución de la actividad PTH para compensar el aumento de la reabsorción ósea. El tratamiento antirreabsortivo es eficaz para frenar la pérdida ósea [8].

Osteoporosis senil (tipo II)

Se detecta en algunas mujeres y varones de más de 70 años como consecuencia de un déficit de la función de los osteoblastos (bajo remodelado óseo). Otros factores etiopatogénicos son: sedentarismo-inmovilización, mala absorción intestinal de calcio y trastornos nutricionales que ocasionan déficit de vitamina D e hiperparatiroidismo secundario. Se asocia con fracturas de cuello femoral, porción proximal del humero y pelvis, por afectarse tanto el hueso cortical como el trabecular. El tratamiento antirreabsortivo es menos eficaz en este tipo de OP, tal y como cabe esperar por su mecanismo patogénico [9].

Osteoporosis secundarias

Se clasifican en este grupo todos los casos de OP que son consecuencia o una manifestación acompañante de otras enfermedades o de su tratamiento. La mayoría de estas causas se describen en la tabla 1. La importancia de identificarlas adecuadamente radica en que esto nos permite llevar a cabo una terapia etiológica. Además, estas entidades patológicas deben tenerse en cuenta como factores de riesgo de OP [10].

Tabla 1. Causas de osteoporosis secundaria

<p>1. Enfermedades endocrinológicas</p> <p>a) Estados hipogonadales Insensibilidad a los andrógenos Trastornos de conducta alimentaria Amenorrea de los atletas Trastornos de conducta alimenticia Hiperprolactinemia Panhipopituitarismo Menopausia precoz Síndrome de Turner o Klinefelter</p> <p>b) Patologías endocrinas Acromegalia Insuficiencia suprarrenal Enfermedad de Cushing Diabetes mellitus tipo 1 Hiperparatiroidismo Déficits nutricionales (Ca, Vit. D, Mg, etc.).</p>	<p>5. Miscelánea</p> <p>Alcoholismo Amiloidosis Sarcoidosis Fibrosis quística Insuficiencia cardiaca congestiva Enfisema Enfermedad renal terminal Hipercalcemia idiopática Esclerosis múltiple Nutrición parental Anorexia nerviosa</p>
<p>1. Enfermedades gastrointestinales</p> <p>Enfermedad celiaca Gastrectomía Mala-absorción Enfermedad inflamatoria intestinal Cirrosis biliar primaria Enfermedad Hepática grave Insuficiencia pancreática exocrina</p>	<p>6. Trasplante de órganos</p> <p>Trasplante de médula Trasplante de riñón, hígado, corazón o pulmón.</p>
<p>2. Trastornos genéticos</p> <p>Hemocromatosis Hipofosfatasa Ontogénesis imperfecta Síndrome de Ehlers-Danlos Síndrome de Marfan Síndrome de Menkes Síndrome Riley-Day Porfirias Enfermedad de depósito</p>	<p>7. Drogas</p> <p>Anticoagulantes: heparina y cumarínicos Anticomieles Ciclosporina y tacrolimus Drogas citotóxicas Glucocorticoides y ACTH Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas Metotrexate</p>
<p>3. Trastornos hematológicos</p> <p>Mieloma múltiple Leucemias y linfomas Mastocitosis sistémica Anemia perniciosa</p>	<p>8. Enfermedades reumáticas</p> <p>Artritis reumatoide Espondilitis anquilosante</p>

DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS

Los pacientes con OP pueden permanecer asintomáticos o presentar dolor en huesos y músculos. La fractura es la principal manifestación clínica de la OP, afecta principalmente a la región proximal del fémur, vertebra, húmero y extremidad distal del radio [11], mientras que las fracturas de cadera son las más graves y las vertebrales las más frecuentes de cuantificar (solo el 30% presentan síntomas).

Actualmente existen muchas técnicas disponibles en el área de detección radiológica de la osteopenia y la osteoporosis, estas incluyen:

Rayos X convencionales. Este método ha sido ampliamente abandonado y generalmente tiene participación solo en casos ocasionales en los cuales una insospechada pérdida de densidad de masa ósea puede ser detectada durante el transcurso de otra investigación no relacionada.

Para que el uso de rayos X pueda ser utilizado como un método de detección, es necesaria una pérdida de un 20-50% de masa ósea por área, antes del desarrollo de la osteopenia. Incluso con una pérdida anual de 23% de masa ósea, tendrían que pasar muchos años antes de que la radiografía convencional pueda ser una herramienta de diagnóstico eficaz, por lo que muchos años de terapia potencial se perderían [12].

Recientemente el refinamiento de la absorciometría radiográfica (RA) ha hecho posible el análisis de una imagen convencional. Procesos computarizados y el uso de un estándar de la densidad del aluminio sobre la película, han permitido la corrección de la variabilidad de la imagen para evaluar el estado de la densidad ósea, esto es comparable en precisión a los resultados obtenidos con las técnicas más novedosas y sofisticadas. Sin embargo, actualmente la RA ha demostrado ser una técnica simple, de bajo costo y de bajo riesgo para la determinación de la DMO, así como para su uso como herramienta de visualización y monitoreo de la OP. Por lo que es posible que la mejora y la investigación posterior a la RA aumentaran su utilidad en los próximos años [13].

Absorciometría de un solo fotón (SPA). Este es uno de los métodos más antiguos, pero sigue siendo un método confiable, relativamente barato y relativamente preciso. Aunque el SPA también implica una exposición muy baja a la radiación, este método puede medir el contenido de mineral óseo de áreas del radio, cubito y calcáneo, las cuales se correlacionan bien con mediciones en columna vertebral. La pérdida de masa ósea en columna vertebral se produce mucho antes y las fracturas de compresión espinal pueden ocurrir mucho antes en pacientes que aun presentan medidas periféricas normales.

El SPA se ha podido comparar favorablemente con la absorciometría dual de rayos X (DEXA) en mujeres con OP establecida. Sin embargo, el SPA emplea una fuente de yodo¹²⁵ (I^{125}) o americio 241 (Am^{241}), lo cual hace difícil defender su uso de frente a los avances realizados con dispositivos que emplean un tubo de rayos X. Por otro lado, el SPA

no puede distinguir entre hueso cortical (radio y cubito) del hueso trabecular y no puede ser usado para medir la masa ósea en la cadera o la columna [14].

Absorciometría de doble fotón (DPA). DPA emplea una fuente de gadolinio-153 (Gd^{153}) el cual emite fotones en dos niveles de energía diferentes permitiendo una mejor discriminación entre tejido óseo y tejido blando. Este método ha sustituido en gran medida al SPA como un procedimiento estándar, pero a su vez ha sido desplazado por el desarrollo de la absorciometría dual de rayos X. El DPA es relativamente preciso con baja exposición a la radiación. Esto es particularmente útil para mediciones en espina lumbar y localizaciones intertrocanterías, dos áreas muy susceptibles a fracturas. Los sitios con fracturas preexistentes y las calcificaciones de tejidos blandos pueden confundir los resultados. Esta tecnología es relativamente lenta en comparación con otros métodos, la DPA lateral es una técnica que puede medir la DMO de cuerpos vertebrales L2-L4 sobre una proyección lateral y esto puede ser útil para detectar la pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas [15].

Tomografía cuantitativa computarizada (QCT). El refinamiento de la QCT ha permitido la evaluación independiente de la densidad del área trabecular y cortical dentro del mismo hueso. El QCT utiliza una fuente de energía única o dual de rayos X y un calibrador estándar. A diferencia del DPA, la QCT es poco afectada por la presencia de calcificaciones de tejidos blandos y otros artefactos. Esta técnica podría ser preferible sobre la absorciometría dual de rayos X (DEXA) para medir la DMO de columna vertebral. Sin embargo, tiene ciertas desventajas clínicas, como: una mayor exposición a la radiación y un mayor costo. Otra desventaja es que los valores de referencia son creados a partir de valores normales de una población local que previamente tiene que ser examinada para generar una base de datos. Los dispositivos QCT que están disponibles comercialmente están diseñados para ser aplicados en radio distal y al cubito. Además, tienen las ventajas de realizar una medición precisa y un costo mucho más bajo [16].

Ultrasonografía. La técnica de ultrasonido (US) aún no se considera del todo como una técnica para el diagnóstico de la OP y hasta cierto punto todavía se encuentra en fase experimental. El ultrasonido cuantitativo (QUS) es un método alternativo recientemente introducido para evaluar la integridad del esqueleto en sitios periféricos de fácil acceso. Actualmente se realiza sobre el calcáneo, rotula, tibia, dedo y antebrazo. La información

sobre el material y las propiedades estructurales del hueso se obtienen estimando y contando las diferencias entre la onda sonora transmitida en un hueso y la onda emergente después de la interacción con el hueso [17].

Estudios *in vivo* han reportado la habilidad de QUS para diferenciar entre sujetos con y sin fracturas, así como predecir el riesgo de sufrir fracturas. Sin embargo, se ha demostrado que QUS puede llegar a ser inexacto en la identificación de baja DMO en mediciones de cadera y columna de mujeres posmenopáusicas comparado con el DEXA [18].

Absorciometría dual de rayos X (DEXA). El DEXA es una tecnología que ha remplazado en gran medida a la DPA y es considerado como el método estándar de oro para la medición de la DMO. El DEXA es similar al DPA en la técnica transmisión de escaneo, pero la fuente de radio nucleótidos es remplazada por un tubo de rayos X [19], lo que permite que este método sea más preciso que el DPA con mejor resolución de imagen y sensibilidad diagnóstica comparable con otras tecnologías. Por otro lado, también tiene la ventaja de realizar un examen completo en un tiempo de 2-5 minutos, mucho más corto en comparación con 20-40 minutos que son necesarios en el DPA. Esto tiene una particular ventaja para mediciones en espina lumbar y áreas próximas al fémur. Además, la exposición de los pacientes a la radiación es relativamente baja. El DEXA es quizás la mejor herramienta de absorciometría actualmente disponible, sin embargo, existen varias limitaciones en las mediciones del DEXA. Los resultados de las pruebas para definir el estado real de la DMO y proporcionar un diagnóstico de fractura válido, debe ser evaluado con recientes guías propuestas por la OMS. La OMS define como baja DMO cuando las mediciones se encuentran en un rango de entre 1 y 2.5 desviaciones estándar (DE) por debajo de la referencia media. La DMO por debajo de 2.5 DE es compatible con la osteoporosis. Sin embargo, se ha demostrado que incluso una disminución de 1 DE en la DMO puede estar asociada con 1.5 veces mayor riesgo relativo de fractura [20].

Con base en lo anterior podemos deducir que existe una importante limitación práctica para realizar un diagnóstico de la OP, así como para estimar adecuadamente el riesgo de que se complique con fracturas. Actualmente el concepto propuesto por NIH en el consenso de 1994 se mantiene vigente e integra dos características: la cantidad de masa ósea (componente cuantitativo) y el concepto resistencia-fragilidad ósea (componente cualitativo).

El componente cuantitativo involucra la DMO, la cual se expresa en unidades de gramos de mineral por unidad de superficie (g/cm^2) y como se mencionó anteriormente se puede

estimar por una amplia variedad de técnicas siendo el estándar de oro la DEXA. El componente cualitativo se refiere a la microarquitectura del tejido óseo y solo es posible objetivar a través de métodos invasivos como la biopsia ósea, la cual no es aplicable a la práctica clínica. Por esta razón y debido a que la DMO representa cerca del 70% de la resistencia del hueso. En la práctica habitual, aunque no sea del todo correcto se tiende a equiparar la resistencia ósea con la DMO, debido a que la disminución de la misma se asocia fuertemente a la aparición de fracturas [7]. De acuerdo con los criterios diagnósticos de la OP que están basados en criterios epidemiológicos, se toma en cuenta la evolución e incidencia de la masa ósea con la edad (datos evaluados con el DEXA) y la prevalencia de las fracturas osteoporóticas en mujeres posmenopáusicas, así se definen cuatro categorías:

- Normal: cuando la DMO es superior a -1 DE en el índice T.
- Osteopenia: cuando la DMO se sitúa entre -1 y -2.5 DE en el índice T.
- Osteoporosis: cuando la DMO es inferior a -2.5 DE en el índice T.
- Osteoporosis grave o establecida: cuando el criterio de osteoporosis se incluye la presencia de fracturas (Figura 1).

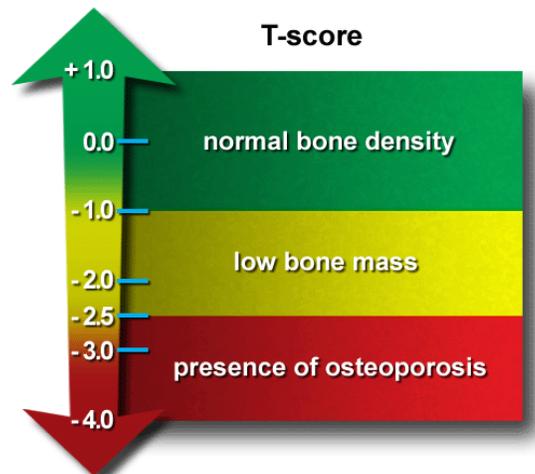


Figura 1.0. Se muestra el índice de t-score donde de 1 a -1 desviaciones estándar es un rango normal, de -1 a -2.5 desviaciones estándar es un rango intermedio denominado osteopenia y menor a -2.5 desviaciones estándar es osteoporosis con susceptibilidad a fractura.

ÍNDICE T-Score

El índice T toma como referencia la DMO de la población joven del mismo sexo cuando se alcanza el pico máximo de masa ósea. Este valor máximo se alcanza aproximadamente a los 35 años manteniendo la tasa de síntesis y de reabsorción equivalente. De este modo se

mantiene constante la masa esquelética hasta los 40 años donde se observa una lenta reducción de la DMO en ambos sexos (aproximadamente 0.3-0.5 % al año).

Por otro lado, la puntuación en la escala Z relaciona los valores de DMO de un individuo con los correspondientes a su mismo grupo de edad, sexo y origen étnico. El valor Z tiene un especial interés cuando se establecen criterios terapéuticos, sobre todo en edades avanzadas [21].

Actualmente esta clasificación densitométrica se considera universalmente aceptada como criterio diagnóstico, a pesar de que es una clasificación que plantea varias limitaciones, ya que solo es adecuada para mujeres posmenopáusicas de origen caucásico y no toman en cuenta el componente cualitativo del hueso. Su aplicación principal es en columna y cadera y pueden existir interferencias en la medición por patología degenerativa o calcificaciones vertebrales [21,22].

FACTORES DE RIESGO DE LA OSTEOPOROSIS

A través de estudios epidemiológicos se han identificado muchos marcadores y factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar OP. Aunque actualmente tienen baja sensibilidad y baja especificidad, estos se han considerado en el abordaje de la prevención, diagnóstico y tratamiento de la OP. Muchos autores han trabajado en el desarrollo de métodos que ayuden en la identificación de factores de riesgo de baja masa ósea y así poder evaluar el carácter predictivo de la OP para facilitar la sospecha diagnóstica de esta enfermedad. Aunque se sabe que unos de los principales factores de riesgo con mayor peso específico son: más de 10 años de menopausia, antecedente de fractura previa, historia familiar de OP y la edad, aun no se dispone de ningún tipo de cuestionario o prueba que este validado para uso clínico.

Menopausia

Es la condición de riesgo más importante asociada a la OP [23]. La edad media en la que se presenta la menopausia es a los 49 años mientras que la esperanza de vida ha aumentado hasta superar los 80 años. Esto condiciona a las mujeres a pasar más de la tercera parte de su vida con menopausia, circunstancia que justifica que la prevalencia de la OP haya aumentado de forma notable en los últimos años. La disminución de estrógenos supone un descontrol a la actividad de los osteoclastos y esto conlleva a una pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular (alto remodelado óseo). Esta actividad de los osteoclastos junto con el hecho de que el pico de masa ósea en la mujer es más

precoz que en los hombres, justifica en gran medida que la OP sea mucho más frecuente en el sexo femenino. El riesgo es mayor cuanto más precoz es la edad de la menopausia y mucho más intenso cuando la deprivación hormonal es brusca, como es el caso de la menopausia quirúrgica [7].

Edad

Es un factor de riesgo independiente para desarrollar OP, pero se encuentra fuertemente asociado con la menopausia en la mujer. En el hombre la edad es un factor de riesgo más específico ya que en edades superiores a los 75 años la proporción mujeres/hombres con OP tiende a igualarse, pasando de 8:1 en edades jóvenes a 1:2 en edades avanzadas. Por otro lado, con la edad también se producen múltiples condiciones fisiopatológicas: menor actividad osteoblástica (formación de tejido óseo), menor absorción intestinal de calcio, defectos nutricionales, carencia de vitamina D, baja exposición solar y sedentarismo, por mencionar algunos. También es importante resaltar que la edad no solo influye en el descenso fisiológico de la calidad del hueso a partir del pico máximo de masa ósea de un adulto joven, sino que es un factor de riesgo independiente de la masa ósea para que se produzcan fracturas.

Genética

Aunque la OP es más frecuente en hijas de madres osteoporóticas, no se ha podido establecer un patrón de transmisión genética específico de la enfermedad. La influencia de la carga genética parece evidente en lo referente al pico de masa ósea alcanzado en las primeras décadas de vida. Por el contrario, este factor parece menos importante en la pérdida de masa ósea a lo largo de la vida, donde los factores adquiridos tienen mucha más importancia, y esto es más marcado cuanto más edad tiene el paciente. De ahí la importancia de controlar los hábitos de vida en la prevención de la enfermedad osteoporótica [24].

De acuerdo a lo reportado por Lazcano E, 2009. Los factores genéticos determinan la DMO y el pico de masa ósea entre los 20 y 30 años de edad, así como la pérdida de DMO después de la menopausia. En este trabajo se observó la correlación de la DMO por sitio anatómico entre abuelas, madres y nietas mexicanas. En esta relación se observó una alta correlación de DMO entre las tres generaciones, lo que indica una influencia genética de mineralización ósea. Las tendencias de composición corporal se transmiten a las hijas y

aunque este factor podría estar influenciado por factores hereditarios, es importante considerar que las características del estilo de vida son compartidas.

Los autores observaron una fuerte asociación de la DMO de distintas regiones óseas entre abuelas y madres y a su vez entre madres e hijas. Esta correlación de DMO entre generaciones podría explicarse por factores como hábitos dietéticos y de estilo de vida; los hallazgos de diferencias en la predicción entre diferentes sitios anatómicos sugieren la influencia de factores genéticos. Estudios similares mostraron que los hijos de madres con antecedentes familiares de osteoporosis presentaron disminución en la DMO, sugiriendo que la DMO presenta una tendencia hereditaria entre las generaciones, lo que se explica por la predisposición genética y su interacción con factores ambientales. Estos datos corroboran la fuerte correlación entre los descendientes directos que, aunque continúa siendo positiva, disminuye para la segunda generación. Comprender los mecanismos por los cuales los factores genéticos regulan la DMO y otros fenotipos relacionados con la osteoporosis tienen implicaciones importantes para la práctica clínica [25].

Masa corporal

Las mujeres que presentan un índice de masa corporal (IMC) bajo ($< 19 \text{ Kg/m}^2$) tienen menor DMO lo cual parece estar relacionado al desarrollo de la OP debido a una menor actividad osteoblástica y una mayor actividad osteoclástica derivada de una menor producción de estrona por falta de panículo adiposo [26].

Es probable que el IMC sea un predictor de la osteoporosis ya que puede servir como un evaluador de la composición corporal. De acuerdo a lo reportado por Asomaning et al. 2006. El IMC podría asociarse con el desarrollo de osteoporosis ya que los individuos con bajo IMC tienen escasos depósitos de grasa corporal y bajos niveles de estrógenos los cuales están asociados a prevenir la pérdida de tejido óseo. Por otro lado, la grasa corporal podría amortiguar una caída y prevenir fracturas. Existen pocas investigaciones al respecto y la mayoría han evaluado otros factores de riesgo. En este trabajo los autores observaron una relación directa entre el IMC y el riesgo de osteoporosis en un grupo de mujeres posmenopáusicas. Las mujeres con menor IMC mostraron un riesgo significativamente mayor de desarrollar osteoporosis. Esta relación se mantuvo constante después de ajustar por las variables de edad, estado de salud actual, uso previo de calcio y vitamina D. Los autores proponen 2 mecanismos para explicar la relación entre el IMC, la osteoporosis y el riesgo de fractura: primero, la grasa corporal protege indirectamente la pérdida ósea al

brindar una fuente y un depósito de conversión periférica de androstenediona, el metabolito activo del estrógeno (estrón). Cuando el depósito es deficiente, aumenta el índice de recambio óseo que determina la mayor pérdida ósea. Segundo, se estima que los individuos obesos alcanzan mayor grado de DMO cuando son jóvenes en comparación con sujetos delgados. Estos individuos son menos propensos a presentar OP durante la vejez. Por lo tanto, los autores concluyen que, si bien no debe recomendarse la obesidad o el sobrepeso como una estrategia para mantener la DMO, la relación estrecha entre la baja DMO y el IMC reducido destacan la importancia de no permitir que los pacientes ancianos presenten peso inferior al recomendado [27].

Estilo de vida

Es fundamental para conservar la masa ósea. Engloba aspectos que tienen que ver con la dieta, los hábitos tóxicos y la actividad física. Son factores que influyen con poco peso específico cada uno, pero de forma persistente a lo largo de la vida y potenciándose entre sí [28].

Ingesta de calcio

La ingesta de calcio en la dieta es necesaria para un metabolismo óseo normal. Durante la etapa de desarrollo del esqueleto condiciona el pico máximo de masa ósea. El adulto sano con ingesta inadecuada de calcio tiene incrementada la pérdida de masa ósea. Estudios en poblaciones han reportado un menor número de fracturas en áreas geográficas con mayor ingesta de calcio. La ingesta recomendada de calcio depende de la edad, circunstancia individual (embarazo, lactancia, crecimiento, menopausia, etc.) pero oscila alrededor de 1.000-1.200 mg/día [29].

Vitamina D

Junto con la PTH, la vitamina D es uno de los factores más importantes en la homeostasis fosfo-cálcica. Las necesidades de la vitamina D están entre 400-800 U.I. diarias. En condiciones recomendables, una dieta variada y una exposición moderada a la luz solar es suficiente. Solo es necesario suplementarla en situaciones deficitarias: algunos ancianos aislados, latitudes con poca incidencia de luz solar, cuadros de mala absorción. Tanto las dietas hiperproteicas como las dietas vegetarianas muy estrictas se han asociado a osteopenia [29].

Tabaco

Diversos estudios epidemiológicos han reportado una relación entre el consumo de cigarrillos y una disminución de la DMO, una mayor incidencia de fractura vertebral y de cadera, además de ser las más recurrentes y precisar más tiempo para su curación. Se habla de un efecto tóxico directo del tabaco, disminuyendo la actividad osteoblástica del hueso. Por otro lado, se sabe que el tabaco disminuye la absorción intestinal de calcio, pero el mecanismo etiopatogénico más importante es consecuencia de su efecto antiestrogénico. Sin embargo, también existen reportes que sugieren que la asociación entre el consumo de cigarrillos y los trastornos del metabolismo óseo son falsas y que las diferencias que se observan son debidas a los distintos factores demográficos y de estilo de vida entre fumadores y no fumadores (las mujeres fumadoras son más delgadas, más sedentarias, consumen más alcohol y tienen la menopausia más precoz que las no fumadoras) [30].

Alcohol

Es el toxico más perjudicial. El consumo crónico de alcohol tiene efecto directo depresor sobre la actividad del osteoblasto y se asocia con alteraciones del metabolismo mineral óseo del calcio, fosforo y magnesio, este último altera el metabolismo de la vitamina D provocando alteraciones endocrinas y nutricionales [31].

De acuerdo con lo anterior, podemos concluir que la osteoporosis es una enfermedad multifactorial donde los factores ambientales pueden favorecer el desarrollo de esta patología. Algunos de los factores que se mencionaron pueden provocar alteraciones en un proceso denominado remodelado óseo, donde una mayor actividad de reabsorción mediada por los osteoclastos supera la actividad de formación mediada por los osteoblastos conduciendo al desarrollo de huesos porosos susceptibles a fracturas.

Predicción de individuos con riesgo elevado de fractura. FRAX®.

La capacidad de evaluar la fuerza del esqueleto mediante el uso de técnicas radiológicas como la DXA, dio lugar a que la OMS definiera a la osteoporosis en términos de la DMO, que junto al T-score son usados como una referencia de diagnóstico y de intervención, siendo el principal abordaje para evaluar el riesgo de fractura. Si bien es una técnica probada, existen varios problemas con el uso exclusivo de las pruebas de DMO en la evaluación de riesgo de fractura. La principal dificultad reside en que la DMO por si sola

posee baja sensibilidad, de tal manera que la mayoría de las fracturas por osteoporosis se producirán en individuos con valores de DMO por encima del umbral de osteoporosis, generalmente en el rango de osteopenia (T-score inferior a -1 y mayor a -2.5 DE ver figura 1.0). En los últimos 15 años, se llevaron a cabo numerosas investigaciones para identificar otros factores que contribuyen al riesgo de fractura, diferentes a la DMO. Ejemplos de ellos son edad, sexo, fractura previa, antecedente familiares de fractura y factores de riesgo relacionados con el estilo de vida, tales como inactividad física y tabaquismo. Algunos de estos factores de riesgo son parcial o completamente independientes de la DMO (es decir, brindan información sobre el riesgo de fractura más allá de la información que proporciona la DMO en sí), y el uso combinado de dichos factores de riesgo podría incrementar la información proporcionada por la DMO por sí sola. Por el contrario, algunos factores de riesgo significativos dependientes de la DMO pueden, en principio, usarse para evaluar el riesgo de fractura ante la falta de pruebas de DMO. Por tal motivo, es probable que la consideración de factores de riesgo bien validados, con o sin DMO, mejore la predicción de fractura y la selección de los individuos más apropiados para recibir tratamiento.

Mediante el trabajo conjunto de numerosos investigadores líderes de todo el mundo, el Centro Colaborador de la OMS cotejó información sobre los factores de riesgo de fractura de 12 cohortes (grupos) de base poblacional estudiadas prospectivamente en diferentes territorios geográficos. El seguimiento comprendió alrededor de 250.000 pacientes por año en 60.000 hombres y mujeres, durante el cual se registraron más de 5.000 fracturas. Este exclusivo compendio de datos permitió examinar varios factores de riesgo de fractura individuales y sus interrelaciones con otras variables de riesgo, principalmente, edad y DMO.

En el modelo final de FRAX®, el riesgo de fractura de hombres y mujeres se calcula a partir de la edad, el índice de masa corporal (IMC) computado según altura y peso, y las variables de riesgo independientes, tales como fractura previa por fragilidad, antecedentes de fractura de cadera en los progenitores, tabaquismo actual, uso prolongado de glucocorticoides orales en alguna oportunidad, artritis reumatoide, otras causas de osteoporosis secundaria y consumo diario de alcohol equivalente a 3 o más unidades por día. También se puede ingresar la DMO del cuello del fémur (cadera), preferentemente como un T-score. Es importante tener en cuenta que, tanto en hombres como en mujeres, el T-score debe obtenerse a través de la base de datos NHANES III para mujeres caucásicas entre 20 y 29 años de edad.

La incorporación de FRAX® en la práctica médica para identificar pacientes con riesgo elevado y para informar las decisiones de tratamiento se compara con el abordaje ampliamente utilizado en el manejo de la enfermedad coronaria. El acceso a la medición de la DMO varía notablemente, y se puede proponer un simple esquema de manejo para acomodar los sistemas de salud con acceso variable a la DMO. El tamaño del grupo intermedio en el cual se recomendaría una prueba de DMO, variará por región y país. En países sin acceso a DXA, el grupo intermedio no existiría, mientras que será más significativo en países con acceso limitado. Esto requiere considerar la probabilidad de fractura en la cual llevar adelante la prueba de DMO (umbrales de evaluación), así como también umbrales de tratamiento (un umbral de intervención). En aquellos países donde es posible recomendar el screening (por ejemplo, en mujeres de 65 años o mayores en los EE. UU.), porque se dispone ampliamente de la DXA, el grupo intermedio incluirá, en su mayoría, mujeres, y solo se requerirán umbrales de intervención.

Limitaciones de FRAX®

Si bien FRAX® es una herramienta bien validada existen una serie de limitaciones que deberán ser tenidas en cuenta por aquellos médicos que la utilicen. Por ejemplo, varios de los factores de riesgo clínicos identificados no consideran la respuesta a la dosis, sino que dan las relaciones de riesgo para una dosis o exposición promedio. El consumo de alcohol y el uso de glucocorticoides (esteroides) son buenos ejemplos. Existen pruebas sólidas de que el riesgo asociado con el consumo excesivo de alcohol y el uso de glucocorticoides es mayor a dosis más altas y su aplicación requiere del criterio médico. Asimismo, el riesgo de fractura aumenta progresivamente con el número de fracturas previas; si bien es obviamente importante, esta limitación debe ser dejada de lado fácilmente por el criterio médico, dado que no es necesario que un algoritmo del sistema informe la decisión de tratar a un paciente con antecedentes de numerosas fracturas. En la actualidad, la herramienta FRAX® limita la DMO a aquella que se mide en el cuello del fémur, ya que hay gran cantidad de información disponible sobre este sitio del esqueleto. Cuenta con la ventaja de que para cualquier edad y DMO, el riesgo de fractura es aproximadamente el mismo en hombres y mujeres. Por tal motivo, el T-score surge de un estándar de referencia único (la base de datos NHANES III para mujeres caucásicas entre 20 y 29 años), tal como se ha recomendado ampliamente. Por último, la versión actual de FRAX® no incorpora factores de riesgo relacionados con caídas, aun cuando se sabe que las caídas constituyen un factor

de riesgo significativo. Por ello, es importante tener en cuenta que el riesgo de fractura puede estar, en cierta medida, subestimado cuando existen antecedentes de caídas [32].

REMODELADO ÓSEO

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra en constante adaptación a lo largo de la vida de los vertebrados hasta alcanzar y preservar el tamaño del esqueleto, forma e integridad estructural, manteniendo así la homeostasis mineral. La remodelación y la modelización son dos procesos que sustentan el desarrollo y mantenimiento del sistema esquelético. El modelado óseo es responsable del crecimiento y la adaptación mecánica del hueso, requiere un delicado balance entre los procesos de formación y reabsorción ósea los cuales se encuentran globalmente coordinados de forma independiente y en distintos lugares anatómicos. El remodelado óseo es responsable por la renovación y reparación del hueso dañado para mantener la integridad del esqueleto adulto y homeostasis mineral. Estos eventos deben mantenerse estrechamente coordinados y requieren la sincronización de las actividades de múltiples participantes celulares para que los procesos de reabsorción y de formación ocurran secuencialmente en la misma ubicación anatómica y así preservar la masa ósea.

Osteoclastos

Los osteoclastos son células mieloides terminalmente diferenciadas que están adaptadas únicamente para remover el tejido de la matriz ósea mineralizada. Estas células tienen distinta morfología y características fenotípicas que se utilizan rutinariamente para identificarlas, como: multinuclearidad, expresión de fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) y receptor de la calcitonina (CALC1) [33]. El factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), también conocido como factor estimulante de colonias de macrófagos y el ligando del receptor activador nuclear NF- κ B (RANKL), son citosinas críticas requeridas para la supervivencia, expansión y diferenciación de células precursoras de osteoclastos *in vitro* (Figura 2.0) [34]. En modelos *in vivo* los requerimientos de estas citosinas han sido demostrados en modelos de ratón que carecían de CSF-1 funcional y RANKL. El ratón *op/op* tiene una inserción espontánea de timidina y un posterior cambio de marco de lectura que crea un codón de paro en el gen *csf-1* y carece de un CSF-1 funcional, resultando en el desarrollo de la OP [35]. *Tnfs11* es el gen que codifica para RANKL y su ablación genética en ratones induce el desarrollo de osteopetrosis. El fenotipo osteopetrotico en estos

modelos de ratón fue causado por la ausencia completa de osteoclastos (aunque solo fue una ausencia transitoria en ratones op/op). La osteoprotegerina (OPG) es una proteína soluble que funciona como anzuelo de RANKL, un fisiológico regulador negativo para la osteoclastogénesis. La pérdida de la OPG funcional en ratón, resulta en animales con osteoporosis (huesos frágiles) debido a que la expresión RANKL/OPG determina el grado de diferenciación y función de los osteoclastos [36].

Una cascada de factores de transcripción es requerida para dirigir la diferenciación de células mieloides a osteoclastos. La expresión del factor de transcripción PU.1 en etapas tempranas de la diferenciación de células mieloides es esencial para el desarrollo de osteoclastos y otras células mieloides maduras. Los ratones que carecen de PU.1 no tienen la capacidad de desarrollar osteoclastos y macrófagos. Por otro lado, la diferenciación *in vitro* de osteoclastos correlaciona con el aumento de la expresión de PU.1 [37]. El factor de transcripción AP-1 compuesto por c-Fos también es esencial para la osteoclastogénesis. Ratones deficientes de c-Fos son osteopetroticos y carecen de osteoclastos, sin embargo, han aumentado su número de macrófagos [38]. Esto implica que el requerimiento para c-Fos es secundario para PU.1 y aunque es esencial para osteoclastogénesis, c-Fos no es necesario para la diferenciación de macrófagos. La pérdida de c-Fos transporta a los precursores mieloides lejos de un destino de osteoclastos y los re-direcciona a comprometerse como macrófagos.

Los factores de transcripción MITF (Factor de transcripción asociado a microftalmia) y NFATc1 (Factor nuclear de células t activadas, citoplasmático 1) son también requeridos para la formación de osteoclastos y expresión de genes osteoclásticos funcionalmente relevantes, incluidos la fosfatasa acida resistente al tartrato [39], catepsina K y el receptor de calcitonina [40,41]. Aunque PU.1, MITF y c-Fos trabajan en conjunto con NFATc1 para orquestar la diferenciación terminal de los osteoclastos y su función, NFATc1 es un interruptor crítico ya que su presencia es necesaria y suficiente para que se produzca la osteoclastogénesis [42].

A pesar del conocimiento que se tiene sobre los factores de transcripción implicados en la osteoclastogénesis, en ensayos *in vivo* el precursor fisiológico de osteoclastos en ratones y humanos sigue siendo difícil de alcanzar. Una de las características que definen a los precursores de osteoclastos es la expresión de c-Fms y RANK (Receptor Activador de NF- κ B), que son los receptores cognados para CSF-1 y RANKL respectivamente [43]. Sin embargo, en experimentos *in vivo* muchas células murinas de linaje mieloides pueden diferenciarse a osteoclastos en diferentes estadios de su desarrollo [44]. La continua

identificación de la población definitiva de precursores de osteoclastos *in vivo* en ratones y humanos sigue siendo desconocida. Ciertamente, una característica de los precursores de osteoclastos es la expresión de c-Fms y RANK [43], que son los receptores diana de CSF-1 y RANKL. Sin embargo, en experimentos *in vitro* muchas células mieloides murinas pueden diferenciarse a osteoclastos [45].

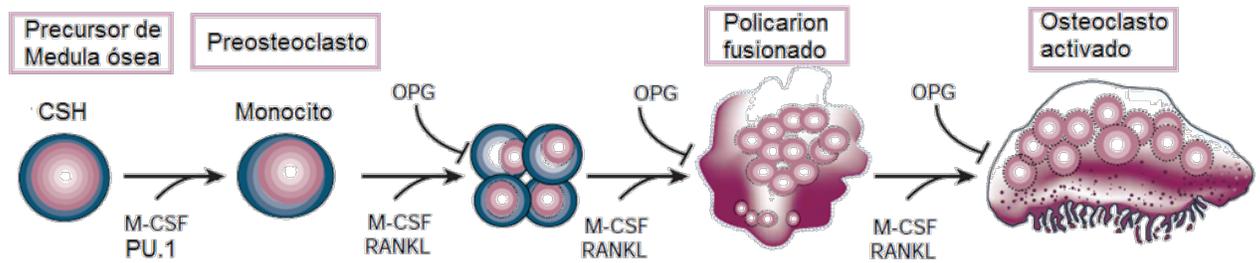


Figura 2.0. Osteoclastogénesis. En este modelo se muestran a las células madre hematopoyéticas (CSH) que son estimuladas por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y activadas por factores de transcripción como PU.1 para ser diferenciadas a monocitos, los cuales son liberados al torrente sanguíneo y viajan por la sangre hasta ser químicamente atraídos a las unidades de remodelado óseo, donde en presencia del M-CSF y el ligando del receptor NF- κ B (RANKL) que son citocinas necesarias en todas las etapas de diferenciación de osteoclastos, comenzarán a fusionarse hasta formar un polícarion (célula multinucleada) o pre-osteoclasto y posteriormente un osteoclasto maduro con la capacidad de reabsorber tejido óseo. Existe una tercera citocina que es la osteoprotegerina (OPG) que puede fungir como un anzuelo de RANKL y evitar el proceso de diferenciación en cualquiera de sus etapas.

Osteoblastos

Los osteoblastos son células especializadas en la formación de tejido óseo que expresan receptores de la hormona paratiroidea (PTH), además tienen varias funciones importantes en el remodelado óseo como: la expresión de factores osteoclastogénicos, producción de proteínas de la matriz ósea y mineralización [46].

Las células osteoblásticas comprenden una diversa población de células que incluyen: células inmaduras de linaje osteoblasto y diferenciadores además de osteoblastos maduros productores de la matriz ósea. En estudios *in vitro*, la heterogeneidad fenotípica de los osteoblastos se asocia con la diferenciación celular [47]. Las etapas de diferenciación osteoblástica también influyen en la contribución funcional de estas células en la remodelación ósea *in vivo*. Ratones deficientes de osteoblastos también son deficientes en osteoclastos [47]. Sin embargo, la depleción condicionada de osteoblastos maduros *in vivo*

solo retrasa la formación ósea mientras que la reabsorción se mantiene activa [48]. Estos datos sugieren que los osteoblastos inmaduros dirigen la osteoclastogénesis mientras que los osteoblastos maduros realizan la producción de la matriz y funciones de mineralización. Los osteoblastos se desarrollan de células madre pluripotentes mesénquimales que tienen el potencial para diferenciarse en: adipocitos, miocitos, condrocitos y osteoblastos, bajo la dirección de una serie bien definida de factores de transcripción. La diferenciación de los osteoblastos es controlada por el factor de transcripción maestro *RUNX2* (Factor de transcripción relacionado con *Runx2*), también conocido como *CBFA1* (Factor de unión al núcleo A1) (Figura 3.0) [49]. Ratones con *RUNX2* atenuado presentan un esqueleto cartilaginoso y carecen completamente de tejido mineralizado debido a la detención de la maduración osteoblástica [50].

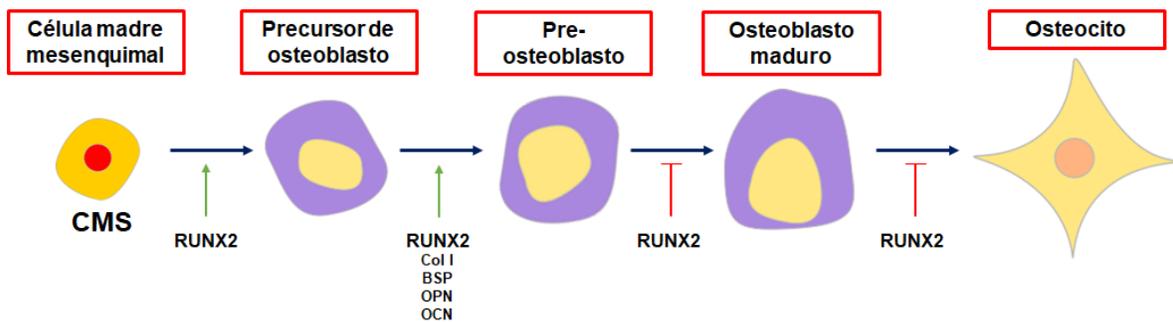


Figura 3.0. Osteoblastogénesis. La diferenciación de osteoblastos es activada por el factor de transcripción *RUNX2* en células madre mesénquimales (CMS) y más tarde por osterix (OSX). Durante el proceso de diferenciación de osteoblastos, *RUNX2* está involucrado en la expresión de genes de la matriz ósea como colágeno tipo I (*Col I*), osteopontina (*OPN*), sialoproteína ósea (*BSP*) y osteocalcina (*OCN*). Más adelante, durante la maduración del hueso, *RUNX2* es desregulado dando lugar a una célula progenitora de osteoblasto, la cual se diferencia a un pre-osteoblasto sin la capacidad de formar tejido óseo nuevo. Posteriormente, esta célula se diferencia a un osteoblasto maduro con la capacidad de formar tejido óseo y por último esta célula puede diferenciarse de forma terminal en un osteocito con cuya función es mecanosensora o de quimiotaxis.

Osteocitos

Durante la formación ósea, una subpoblación de osteoblastos experimenta su último nivel de diferenciación y queda envuelta por células osteoides no mineralizadas, a estas células se les denominan osteocitos osteoidales [51]. Después de la mineralización de la matriz ósea las células atrapadas se denominan osteocitos y forman una red que se extiende a lo largo del hueso mineralizado. Los osteocitos se mantienen en cavidades llenas de líquido

(lagunas) dentro del hueso mineralizado y son muy abundantes, representando del 90-95% de todas las células óseas. Por otro lado, estas células tienen largas dendritas que se extienden a lo largo de los canalículos (túneles) dentro de la matriz mineralizada para interactuar con otros osteocitos dentro del hueso mineralizado y con osteoblastos de la superficie ósea [52]. Los osteocitos responden a la carga mecánica y se cree que forman una red celular que puede detectar daños mecánicos y microdías (grietas o fracturas microscópicas dentro del hueso mineralizado) de hueso que se acumula como resultado de la carga esquelética normal y la fatiga [53].

Células del sistema inmune involucradas en el remodelado fisiológico del hueso

A pesar de la estrecha localización anatómica del hueso con la medula ósea, se ha subestimado el diálogo sobre el sistema esquelético y el sistema inmunitario. El interés en la regulación de las células inmunes de la dinámica ósea se centró inicialmente en enfermedades patológicas. Por ejemplo, las células T activadas han estado implicadas en enfermedades patológicas que dan como resultado la destrucción del hueso, incluyendo pérdida de masa ósea inducida por ovariectomía [54]. Los mastocitos se han relacionado con la fibrosis de la medula ósea, que se produce en el hiperparatiroidismo crónico [55]. Sin embargo, cada vez es más claro que las células inmunes también participan en la homeostasis ósea durante la fisiología normal.

Células T y células B

Los linfocitos T y B son componentes centrales del sistema inmune adaptativo que facilitan el reconocimiento y la destrucción de patógenos. Los ratones deficientes de células B o T tienen huesos osteoporóticos, lo que sugiere que estas células inmunitarias participan en el mantenimiento de la homeostasis ósea durante la fisiología basal [56].

Mecánicamente las células B maduras producen más del 50 % de la OPG total derivada de la medula ósea, lo que contribuiría significativamente a restringir la osteoclastogénesis durante la fisiología normal. Sin embargo, el papel de las células T durante la regulación de la remodelación ósea es menos claro. Estos datos están basados en estudios realizados en ratones nocaout de CD40 y ratones nocaout de CD40L deficientes en células T, los cuales presentan osteoporosis. Se ha propuesto que las células T trabajan cooperativamente con las células B y mejoran la producción de OPG por co-estimulación CD40/CD40L. Sin embargo, la relevancia de este mecanismo para la homeostasis de la remodelación ósea sigue siendo poco clara dado que la activación de las células T es necesaria para a

expresión de CD40L y que hay muy pocas células T activadas en la medula ósea bajo condiciones basales [56].

Megacariocitos

Son células que se derivan de células madre hematopoyéticas, los megacariocitos residen dentro de la medula ósea y producen trombocitos (plaquetas) que son esenciales para la coagulación sanguínea normal. Los ratones transgénicos deficientes de los factores de transcripción GATA-1 y NF-E2 (Factor nuclear derivado de eritroides 2) implicados en la diferenciación de megacariocitos han aumentado el número de megacariocitos y el volumen elevado de hueso [57]. Megacariocitos *in vitro* están asociados a mejorar la proliferación y diferenciación de osteoblastos, expresan RANKL, OPG y secretan un factor anti-osteoclastogénico soluble desconocido [58]. En general, estos datos sugieren que los megacariocitos tienen el potencial de dirigir tanto la reabsorción como la formación de tejido óseo en el proceso de remodelación del hueso. Sin embargo, la expresión de GATA-1 o NF-E2 no está restringida en megacariocitos y se requieren estudios *in vivo* para confirmar el papel de estas células en la remodelación fisiológica del hueso.

Osteomacs

Los Osteomacs son macrófagos de tejidos residentes en o sobre células de superficies del endostio y periostio. Los macrófagos del tejido residente componen ~10-15% de la mayoría de los tejidos y son importantes para el desarrollo del tejido óseo, homeostasis y reparación del hueso. En ratones, los Osteomacs se identifican utilizando la proteína macrófago pan F4/80, que no se expresa en osteoclastos y su localización anatómica es estrechamente próxima a la superficie ósea. En el hueso humano, los Osteomacs pueden ser identificados por la expresión del marcador mielóide CD68, su morfología característica y distintiva es estrellada y su localización es próxima a la superficie del hueso [59].

En estudios *in vitro*, los Osteomacs son requeridos para la diferenciación total y funcional que incluye la mineralización de osteoblastos. *In vivo*, los Osteomacs forman una cubierta sobre los osteoblastos productores de la matriz ósea madura en sitios del remodelado óseo, una localización anatómica ideal desde la cual regulan este proceso. El desgaste de los macrófagos *in vivo* da como resultado la pérdida total de Osteomacs endostales y sus osteoblastos asociados, lo que sugiere que los Osteomacs son necesarios para mantener activos los osteoblastos maduros [44].

Remodelado óseo

El remodelado óseo es un proceso que ocurre a lo largo de varias semanas y es realizado por grupos de osteoclastos que reabsorben hueso y osteoblastos formadores de tejido óseo, estos se encuentran dentro de estructuras anatómicas temporales conocidas como unidades multicelulares básicas (BMUs) que atraviesan y se anclan en una capa de células para crear compartimientos de remodelación ósea [60]. El fenotipo de una célula del osteoma forma parte de los compartimientos del hueso y del proceso de remodelado óseo, en seres humanos parece ser una célula de revestimiento óseo mientras que en el ratón el osteoma atraviesa BMUs durante la remodelación ósea fisiológica [61].

Funcionalmente se ha propuesto que la estructura de la cubierta y el compartimento subsecuente de la remodelación del hueso genera un microambiente para facilitar la reabsorción de tejido óseo mediado por osteoclastos y la formación de tejido óseo mediado por osteoblastos asegurando un cambio neto mínimo en el volumen óseo durante la remodelación fisiológica del hueso [62].

Una BMU activa, consiste en una fuente principal de hueso reabsorbido por los osteoclastos. Las células reversas presentan un fenotipo poco claro, su función es cubrir la superficie del hueso recién expuesto por la reabsorción del osteoclasto y preparar la superficie para la deposición del hueso de remplazo. Por otro lado, los osteoblastos ocupan la parte trasera de las BMUs donde secretan y depositan la matriz ósea no mineralizada (osteoides). De este modo dirigen la formación y posteriormente la mineralización en el hueso laminar maduro. La disposición espacial y temporal de las células dentro de las BMUs es crítica para el remodelado óseo ya que asegura las distintas fases y secuencias de este proceso. Las fases del proceso de remodelado son cinco: activación, reabsorción, inversión, formación y finalización, las cuales se muestran en la figura 4.0 y se discuten a continuación.

Fase de activación

El primer nivel del remodelado óseo involucra la detección de una señal de inicio del remodelado. Esta señal puede tomar algunas formas. Ejemplo: Una deformación mecánica sobre el hueso que resulta en una alteración estructural o acción hormonal (ejemplo: estrógenos o PTH) sobre células del hueso en respuesta a más cambios sistémicos en la homeostasis. La actividad diaria ejerce una tensión mecánica continua sobre el esqueleto y se cree que los osteocitos detectan cambios en esta tensión física y lo traducen en señales biológicas que inician el remodelado óseo [52]. El daño a la matriz ósea o la inmovilización de las extremidades induce el proceso de apoptosis de los osteocitos y un consecuente

aumento de la osteoclastogénesis [63]. Bajo condiciones basales, los osteocitos secretan el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) el cual inhibe la osteoclastogénesis. La apoptosis focal de osteocitos disminuye los niveles locales de TGF- β , eliminando las señales inhibitoras de la osteoclastogénesis y permitiendo la formación de osteoclastos [64]. La hormona paratiroidea (PTH) es una señal endocrina del remodelado óseo generada para mantener la homeostasis del calcio. La PTH es secretada por las glándulas paratiroideas en respuesta a la reducción de calcio sérico y actúa periféricamente sobre riñón, hueso e indirectamente sobre el intestino delgado manteniendo la homeostasis de calcio en suero. En el microambiente del hueso la PTH activa a un receptor acoplado a proteínas G transmembranales de siete dominios, el receptor PTH sobre la superficie de células osteoblásticas [65].

La unión de PTH a estos receptores activa la proteína quinasa A, quinasa C y vías de señalización de calcio intracelular en estas células [66] lo que induce una cascada de respuestas transcripcionales que producen la secreción modulada de moléculas reclutadoras de precursores de osteoclastos, induciendo la diferenciación y activación de estas células dando lugar al establecimiento del proceso de reabsorción ósea.

Fase de reabsorción

Los osteoblastos responden a señales generadas por osteocitos o directamente por la activación de señales de reclutamiento de precursores de osteoclastos hacia los sitios de remodelado. En respuesta al proceso de remodelado inducido por la PTH, los osteoblastos producen la citosina MCP-1 (Proteína quimio-atrayente de monocitos 1) *in vivo*, la cual es un quimio-atrayente para células precursoras de osteoclastos y potenciador de RANKL induciendo la osteoclastogénesis *in vitro* [67]. Además, para el reclutamiento de precursores de osteoclastos, los osteoblastos expresan las citosinas maestras de la osteoclastogénesis: CSF-1, RANKL y OPG que también son moduladas en respuesta a la PTH. La expresión de OPG es reducida y la producción de CSF1 y RANKL es incrementada para promover la formación de osteoclastos y su subsecuente actividad [68]. Las citosinas CSF-1 y RANKL trabajan en conjunto; CSF-1 promueve la proliferación y supervivencia de precursores de osteoclastos y dirige la propagación, motilidad y organización del citoesqueleto en células maduras [69]. RANKL también promueve la proliferación de precursores de osteoclastos y adicionalmente coordina la diferenciación de precursores de osteoclastos a osteoclastos multinucleados, promueve la actividad de reabsorción y prolonga la vida de las células maduras [70].

Las metaloproteinasas (MMPs) de matriz incluida la MMP-13, son secretadas por osteoblastos en respuesta a señales de remodelación mecánica y endocrina [71]. Las MMPs degradan el osteoide no mineralizado que recubre la superficie ósea y dejan expuestos los sitios de adhesión RGD (sitios de reconocimiento para integrinas) dentro de la matriz ósea mineralizada que es necesaria para facilitar el acceso de los osteoclastos. Los osteoclastos se anclan a los sitios de unión RGD a través de moléculas integrinas $\alpha_v\beta_3$ creando un microambiente aislado debajo de la célula conocida como “zona sellada”. Iones de hidrógeno son bombeados dentro la “zona sellada” y la disolución de la matriz mineralizada ocurre en este ambiente acidificado produciendo la laguna de reabsorción Howship's [72]. La matriz ósea orgánica restante se degrada posteriormente por un conjunto de enzimas colagenolíticas con un pH bajo (particularmente catepsina K) [73].

Fase reversa

Después de la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos las lagunas de howship's permanecen cubiertas con la matriz de colágeno desmineralizada que no fue digerida. Un tipo de células mononucleares de linaje no determinado elimina los restos de colágeno y prepara la superficie del hueso para la subsecuente formación de tejido óseo mediado por los osteoblastos. Inicialmente se propuso que las células “reversa” eran fagocitos mononucleares basándose en su evaluación morfológica [74]. Sin embargo, recientemente se reportó que las células reversas son de linaje osteoblástico, basándose en su morfología celular, expresión positiva de fosfatasa alcalina y la ausencia del marcador monocito macrófago MOMA-2 (Anticuerpo Monocito + Macrófago 2) sobre estas células.

De acuerdo con la última caracterización de células osteomacs F4/80⁺ y su asociación con BMUs, se debe realizar una evaluación más detallada de las células reversa debido a que los macrófagos y las células F4/80⁺ son capaces de expresar fosfatasa alcalina y MOMA-2 [75]. Desde una perspectiva funcional, una probable explicación es que las células osteomacs y mesénquimales trabajan juntas para facilitar los eventos durante la fase reversa. Los osteomacs probablemente son responsables de la eliminación de los desechos de la matriz durante la fase reversa, de hecho, los macrófagos tienen la capacidad de producir MMPs, las enzimas requeridas para la degradación de la matriz son células fagocíticas y pueden producir osteopontina la cual es incorporada dentro del tejido mineralizado [76]. Sin embargo, las células madre mesénquimales están idealmente mejor equipadas para depositar la matriz de colágeno junto con la osteopontina las líneas de recubrimiento dentro de la laguna de howship.

Por último, el papel final de las células reversa podría ser el de recibir o producir señales de acoplamiento que permitan la transición de la reabsorción a la formación del hueso dentro de las BMU.

Fase de formación

La naturaleza de las señales de acoplamiento que coordinan la transición y dirección de la formación ósea, específicamente en los sitios de reabsorción sigue siendo controvertida.

Inicialmente se propuso que la (s) molécula (s) de acoplamiento se almacenan en la matriz ósea y se liberan durante la reabsorción ósea. Factores de crecimiento similares a la insulina I y II y TGF- β parecen ser una señal clave para el reclutamiento de células madre mesénquimales en los sitios de reabsorción ósea [76]. Por otro lado, en ratones y seres humanos que tienen osteoclastos funcionalmente defectuosos, incapaces de reabsorber hueso, la formación ósea mediada por los osteoblastos se conserva, incluso en ausencia de factores de crecimiento vinculados a la matriz ósea, estas observaciones han llevado a la hipótesis de que los osteoclastos producen el (los) factor (es) de acoplamiento [67]. Se han propuesto varios mecanismos de acoplamiento que incluyen la molécula soluble esfingosina 1-fosfato y el complejo de señalización bidireccional EphB4-ephrina-B2 anclado a la célula. La esfingosina 1-fosfato es secretada por los osteoclastos e induce el reclutamiento de precursores osteoblásticos que promueven la supervivencia de los osteoblastos maduros [77].

Los receptores EphB4 son expresados en osteoblastos mientras que en los osteoclastos se expresa el ligando ephrin-B2. Por otro lado, la señalización mediada por EphB4 en osteoblastos potencia la diferenciación osteogénica y señalización de la fase reversa a través de la ephrina-B2 mientras que en los precursores de osteoclastos suprime la diferenciación osteoclástica a través de la inhibición de la cascada osteoclastogénica c-Fos/NFATc1 [78]. Este complejo de señalización EphB4-ephrina-B2 proporciona una única oportunidad para activar simultáneamente la formación e inhibir la reabsorción ósea en este punto crítico de transición del proceso de remodelado. Sin embargo, las restricciones anatómicas dentro de las BMU median que el contacto directo de la célula entre el osteoclasto y el osteoblasto no sea siempre posible, de hecho, el reclutamiento de osteoblastos y los residuos de la matriz continúan mucho después de que los osteoclastos hayan desocupado los sitios de reabsorción. Por lo tanto, algunos mecanismos incluidos el contacto directo y señales solubles pueden ser necesarios para lograr el acoplamiento.

La estimulación mecánica y la señal endocrina PTH pueden ejercer señales de formación ósea a través de osteocitos bajo condiciones de reposo, los osteocitos expresan esclerotina, una molécula soluble que se une a LRP5/6 e impide directamente la vía de señalización Wnt, un inductor de la formación ósea [79]. La tensión mecánica en el hueso y la señalización por PTH a través de receptores de PTH en osteocitos, inhiben la expresión de esclerotina, eliminando la inhibición de la vía de señalización Wnt y permitiendo la formación de hueso dirigida por Wnt a través de la interacción del receptor y correceptor LRP5 [80]. Esta vía de señalización anabólica es fundamental para establecer la DMO basal, sin embargo, los detalles de cómo la deformación mecánica y la señalización por PTH ejercen efectos opuestos en fases tempranas y tardías de la remodelación ósea fisiológica aún quedan pendientes por determinar.

Una vez que las células stem mesénquimales o progenitoras de osteoblastos son atraídos a las lagunas de reabsorción, estas se diferencian y secretan moléculas que finalmente forman el hueso de remplazo. El colágeno tipo I es el componente orgánico primario del hueso. Las proteínas no colagenosas, incluyendo proteoglicanos, proteínas glicosiladas tales como fosfatasa alcalina inespecífica de tejido, proteínas de unión a integrinas (SIBLING), proteínas que contienen Gla (proteína Gla de matriz y osteocalcina) y lípidos que componen el material orgánico remanente. Para que el hueso asuma su forma final, la hidroxiapatita se deposita en el nuevo tejido osteoide. El mecanismo preciso de la mineralización sigue por dilucidarse, sin embargo, la fosfatasa alcalina inespecífica de tejido, fosfodiesterasa de nucleótido pirofosfatasa y ANK (anquilosis progresiva) están implicados en la generación de la concentración extracelular óptima de fosfato inorgánico que permite proceder a la mineralización [81].

Fase de mineralización

Cuando se ha remplazado una cantidad de hueso igual al reabsorbido, el ciclo de remodelado concluye. Las señales de terminación que informan a la maquinaria de remodelación para que dejen de funcionar son en gran parte desconocidas. Sin embargo, un nuevo rol sobre la actividad de los osteocitos está surgiendo. La pérdida de expresión que se produjo para iniciar el proceso de formación mediado por osteoblastos, es posible que se reconstituya hacia el final del ciclo de remodelación. Posterior a la mineralización, los osteoblastos maduros sufren apoptosis, se convierten en un tipo de célula de revestimiento óseo o quedan incrustados dentro de la matriz mineralizada y completan su

diferenciación en osteocitos. El entorno de la superficie ósea se restablece y se mantiene hasta que se inicie el próximo ciclo de remodelación ósea.

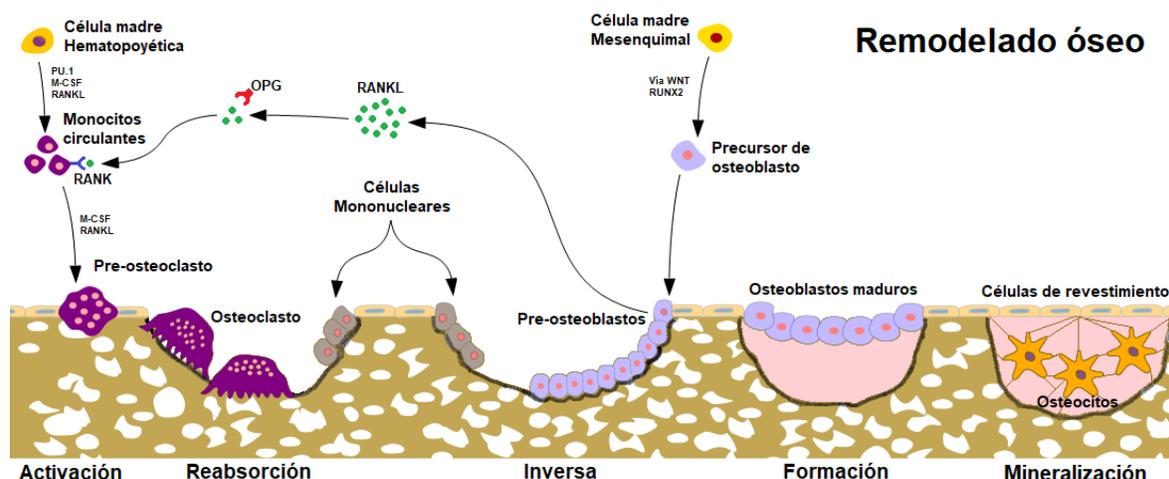


Figura 4.0. Remodelado óseo, se muestran las 5 fases de este proceso: activación, reabsorción, inversa, formación y mineralización.

EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO

En los últimos años en México se ha formado un modelo polarizado de transición epidemiológica, en el que las enfermedades con etiología infecciosa coexisten con enfermedades degenerativas crónicas. Los principales factores que contribuyen a esta transición son el aumento en la expectativa de vida, la disminución de la mortalidad, el aumento de la población de edad avanzada (65 años o más) y el impacto económico [82].

En México existen dos datos bibliográficos sobre la cantidad de individuos con OP y osteopenia, los cuales utilizaron la densitometría ósea central como método diagnóstico y los criterios de la Organización mundial de la salud para clasificación. El primer estudio se realizó en tres diferentes zonas geográficas de México en el que Delezé *et al.* 2000. compararon la DMO femoral y de columna lumbar de 4,460 mujeres de entre 20 y 69 años de zonas urbanas [83]. Los resultados mostraron que existe una variación significativa de la DMO en diferentes regiones de México. Las mujeres de la región norte del país presentaron una DMO más alta en columna lumbar que las mujeres del centro o sur. Sin embargo, estas mujeres fueron significativamente más altas y corpulentas que las mujeres de las regiones centro y sur. Estos datos sugieren que las diferencias entre distintas

regiones geográficas tienen variación según la región de la población estudiada (Figura 5.0).

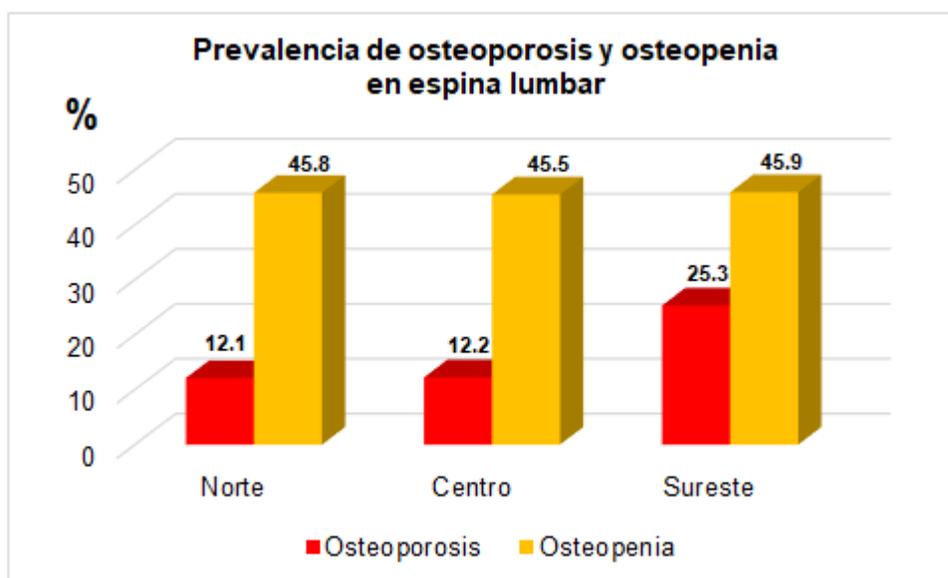


Figura 5.0. Prevalencia de osteoporosis y osteopenia en espina lumbar de mujeres de entre 20 y 69 años de tres regiones geográficas de México, Norte, Centro y Sureste.

El segundo estudio se basó en una muestra aleatoria utilizada para el estudio LAVOS en mujeres mexicanas y el estudio de la prevalencia de fractura vertebral en hombres. En este estudio se utilizó una muestra aleatoria de 807 hombres y mujeres que se realizaron una densitometría ósea de columna lumbar y de fémur. Los resultados mostraron que para mediciones de columna lumbar el 9% y 17% de hombres y mujeres respectivamente presentaron osteoporosis. Por otro lado, el 30% y 43% de hombres y mujeres respectivamente presentaron osteopenia. Los resultados totales del fémur revelaron que el 6% de hombres y el 16% de mujeres presentaron OP y el 56% y el 41% de mujeres presentaron osteopenia.

Los casos de fractura de cadera registrados en el año 2000 se recabaron en todos los hospitales de atención terciaria de los dos sistemas de salud más importantes en la ciudad de México. El instituto Nacional del Seguro social (IMSS) y la secretaria de Salud (SS). Los diagnósticos fueron validados a través de la revisión de casos. 169 mujeres y 98 hombres por cada 100,000 individuos sufren fracturas de cadera todos los años y estas cifras incrementan en forma exponencial con la edad en ambos sexos.

En México, el riesgo de sufrir una fractura de cadera a los 50 años fue de 8.5% en mujeres y 3.8% en hombres, en otras palabras 1 de cada 12 mujeres por 1 de cada 20 hombres mayores de 50 años sufrirán una fractura de cadera en la edad adulta [82]. De acuerdo a un estudio reportado por Maggi, *et al.* 1991. México presenta una tasa intermedia de fracturas de cadera con respecto a otros países; las tasas más altas se registran en Suecia, Whites, Olmsted y EE.UU., mientras que las tasas más bajas en China continental y Turquía [84]. La figura 6.0 muestra la incidencia promedio de fracturas de cadera entre los años 2000 y 2006 por edad y sexo. Recientemente se demostró que las tasas de fracturas de cadera específicas por edad y sexo entre 2000 y 2006 tanto para hombres como para mujeres, aumentaron 1% por año, este mismo informe incluye proyecciones hasta el año 2050 donde los cambios demográficos estimados para México indican que la cantidad anual de fracturas de cadera aumentará de 29.3% en 2005 a 155.8% (estimado) en 2050. Si la incidencia específica relacionada con la edad de las fracturas de cadera continúa en aumento, esta se incrementará en un 46% adicional (Figura 7.0) [85].

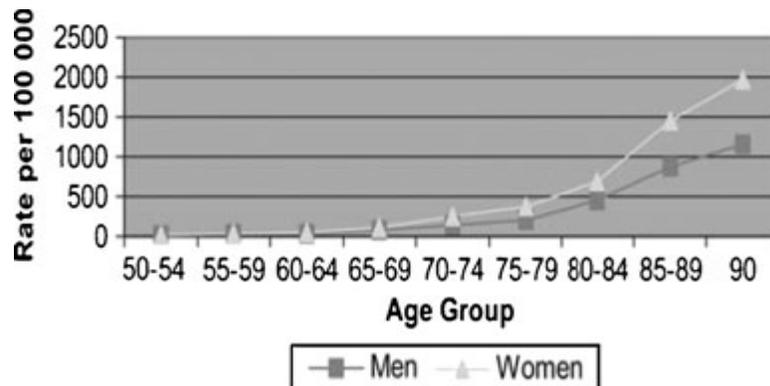


Figura 6.0. Tasa de incidencia específicas de edad y sexo de fracturas de cadera en México.

Los costos económicos directos de las fracturas de cadera estimado para el 2006 según la incidencia anual proyectada de las fracturas de cadera en México, supero levemente los 97 millones de dólares. Este cálculo fue basado en la existencia de cerca de 22,000 casos de fractura de cadera con un costo individual por evento de 4,365.50 dólares [86]. Es importante mencionar que el tiempo de hospitalización promedio por fractura de cadera es diferente en cada institución. El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), tiene el promedio más alto con 10.7 días por evento, la Secretaria de Salud tiene un promedio de

9.3 días y las instituciones privadas un promedio de 5.2 días [82]. En un estudio anterior, el IMSS analizó la frecuencia y los costos de la atención hospitalaria relacionados con las fracturas, en un período de dos años (2000-2001) utilizando las altas hospitalarias y los datos de los grupos de diagnóstico relacionados para calcular los costos de las fracturas de cadera, las fracturas distales de antebrazo y las fracturas vertebrales. El costo promedio por cada caso de las fracturas mencionadas fue de 5,101.63 dólares. En este mismo estudio, se reportó que el costo de la atención hospitalaria por fracturas de cadera en mujeres posmenopáusicas fue de 36, 593,271 dólares en un periodo de dos años [87]. Actualmente en México no existen estudios que analicen los costos indirectos de las fracturas de cadera y otras fracturas por fragilidad. Dado que existe poca información sobre los costos que representan las enfermedades musculo esqueléticas, resulta difícil demostrar su carga e impacto en el sistema de salud. Existe la necesidad de realizar estos estudios de modo que puedan ser comparados con otros grupos de enfermedades y ser priorizados en el contexto del sistema de salud.

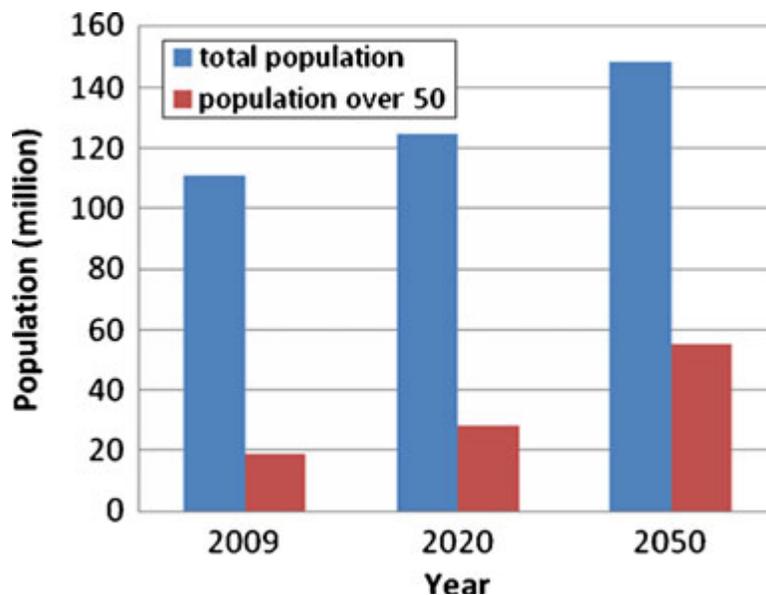


Figura 7.0. Proyección de la población mexicana hasta el 2050.

Fractura vertebral y otras fracturas por fragilidad

Resultados del estudio LAVOS mostraron la prevalencia radiográfica de las fracturas vertebrales en mujeres mayores de 50 años de cinco países de América Latina mediante el uso de la metodología estándar previamente reportada en el estudio de fracturas

osteoporóticas de Estados Unidos (SOF) y en el estudio prospectivo europeo de osteoporosis (EPOS). La prevalencia general en mujeres mexicanas fue del 19.2%, la tasa más alta entre los cinco países del estudio (Argentina, Brasil, Colombia, México y Puerto Rico). Una de las principales preocupaciones es que las fracturas vertebrales son subestimadas en gran medida. Las bases de datos consultadas incluían salas de emergencia y consultas con especialistas en todos los centros médicos del país pertenecientes al IMSS. Desafortunadamente ninguno de estos centros de salud contaba con informes confiables sobre fracturas vertebrales. Una explicación posible de esta tendencia es que las fracturas vertebrales no son diagnosticadas en ningún nivel de atención médica y probablemente sean reportadas como espondiloartrosis o lumbago.

El diagnóstico oportuno de las fracturas vertebrales posibilita el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad subyacente y la consecuente prevención de futuras fracturas. A través de las bases de datos de la división de informática del IMSS, se analizó la frecuencia de otras fracturas osteoporóticas principales en hombres y mujeres mayores de 50 años. De acuerdo con la información bibliográfica, las fracturas de muñeca son el tipo de fracturas comunicadas con más frecuencia, seguidas por las fracturas de cadera, humero y pelvis.

Actualmente en México, existen cerca de 409 equipos de absorciometría dual de rayos x (DXA). El 85% de estos equipos se encuentran en el sector privado. La sociedad Mexicana de Metabolismo Óseo y Mineral (AMMOM), que ofrece el curso de certificación en densitometría ósea en forma anual, comunica el uso de no más de 300 equipos para medir densidad mineral ósea en centros donde se realiza este tipo de estudios y solo algunos técnicos obtuvieron la certificación otorgada por la sociedad Internacional de Densitometría Clínica u otros exámenes [88].

El costo de una densitometría ósea en México oscila entre 18 y 131 dólares, dependiendo del servicio (privado o estatal). Actualmente no se conoce con exactitud la cantidad de densitómetros óseos en México. En 2008, se calcula un aproximado de 16,724,525 personas mayores de 50 años, desde entonces solo se contaba con 1.8 a 2.3 equipos por cada millón de individuos. El desequilibrio de este recurso es notable, debido a que la mayor parte de la población mexicana utiliza los centros médicos estatales donde solo se encuentra una pequeña porción de los densitómetros óseos (15%) del país [88].

Si bien, la masa ósea puede estimarse midiendo la DMO a través de la densitometría dual de rayos X (DXA), su medición no captura todos los factores de riesgo de fractura. Los

cambios cuantitativos en el recambio esquelético se pueden evaluar de manera fácil y no invasiva mediante la medición de marcadores bioquímicos, séricos y urinarios que pueden ser productos de desecho o marcadores de algún proceso en la homeostasis del hueso [89]. Por otro lado, como se mencionó a lo largo de esta tesis, algunas enfermedades esqueléticas frecuentes como la osteoporosis o la artrosis, tienen una clara tendencia a la agregación familiar, sugiriendo que su componente hereditario es importante. Sin embargo, se ha estimado que la herencia explica del 50-80% de la variabilidad de la masa ósea y estudios enfocados a identificar variables alélicas en genes candidato apenas explican una pequeña proporción de ese componente hereditario. Por esta razón los componentes epigenéticos pueden contribuir a explicar ese fenómeno, ya que estos permiten adaptar la expresión de los genes a las condiciones ambientales. Estos mecanismos incluyen a la metilación del ADN, modificaciones pos-transcripcionales de las histonas, la estructura general de la cromatina y los RNAs no codificantes que incluyen a los microRNAs (miRNAs), los cuales pueden ser monitoreados de forma no invasiva a través de sangre y fluidos biológicos [90].

MicroRNAs (miRNAs)

Existen múltiples tipos de RNAs pequeños que han evolucionado en células de eucariontes para suprimir material genético y transcrito no deseado. Los RNA pequeños se definen por su longitud y su asociación con proteínas de la familia argonauta (AGO). En mamíferos, se clasifican en tres clases: microRNAs (miRNAs), siRNAs y RNAs que interactúan con PIWI (piRNA). Los factores de transcripción, proteínas de unión al RNA y miRNAs son un conjunto de factores que actúan coordinadamente para regular redes de expresión importantes en las funciones celulares [91]. Después de la transcripción el mRNA está sujeto al proceso de splicing, exportación al núcleo y poliadenilación, seguido del inicio de la traducción y elongación. Cada uno de estos procesos representa un punto en el cual la expresión puede ser regulada, permitiendo un ajuste en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales. Los miRNAs son RNAs cortos (aproximadamente de 22 nucleótidos), no codificantes, que regulan la transcripción, poliadenilación y traducción de un mRNA blanco [92].

Funciones de los miRNAs

Los miRNAs representan una clase abundante de RNAs pequeños, no codificantes, altamente conservada, con la función de regular la expresión pos-transcripcional de los mRNAs. En organismos complejos, los miRNAs regulan una amplia gama de procesos

biológicos incluyendo la proliferación, diferenciación, metabolismo, división celular y apoptosis (muerte celular programada). Por otro lado, estas moléculas están implicadas en muchas enfermedades, como: múltiples tipos de cáncer [93], enfermedades cardiovasculares [94], enfermedades metabólicas [95], Diabetes [96] y enfermedades del metabolismo óseo [97]. Por otro lado, estas moléculas se han propuesto como potenciales biomarcadores para la detección temprana, monitoreo y diagnóstico de múltiples enfermedades como cáncer [98], cardiovasculares [99], diabetes [100], lupus [101] y osteoporosis por mencionar algunos [102].

Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs consta de algunos pasos que son: la transcripción, procesamiento del miRNA primario (pri-miRNA), transporte al citoplasma, procesamiento del precursor del miRNA (pre-miRNA), selección de la cadena, transcrito blanco y destino de la transcripción. Esta serie de pasos ayuda a que solo los RNAs con las estructuras y secuencias correctas puedan regular la expresión génica.

Los genes que transcriben a un miRNA se encuentran en todos los cromosomas humanos a excepción del cromosoma "Y". Los promotores de genes que codifican a proteínas, así como los promotores de los miRNAs son regulados por factores epigenéticos y factores de transcripción. Los genes de los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II o III de genes de miRNAs independientes o de los intrones de genes que codifican a proteínas.

El producto inicial de la transcripción de un gen de miRNA es el transcrito primario (pri-miRNA) el cual podría tener una longitud de algunos cientos de nucleótidos. Múltiples miRNAs podrían ser co-transcritos en un solo pri-miRNA. En el extremo 3' del pri-miRNA se agrega un Cap o capuchón (7meG) y es poliadenilado, al igual que los transcritos de mRNA. Los transcritos en tándem de varios miRNAs junto con genes que codifican a proteínas permite que los genes se expresen juntos, estos pueden interactuar dentro de una misma vía o a través del entrecruzamiento de vías [103].

En mamíferos, los pri-miRNAs son procesados dentro del núcleo a través del complejo de la región crítica del gen 8 del síndrome Drosha-Di George (DGCR8). Drosha es una RNasa tipo III endonucleasa y DGCR8 se cree que recluta y une al transcrito [104]. Las secuencias que preceden la región 5' y al extremo 3' terminal del pri-miRNA forman un tallo imperfecto que es reconocido por DGCR8, lo que permite a Drosha cortar aproximadamente 11pb de distancia [105]. El pri-miRNA al ser procesado por el complejo Drosha-DGCR8 da origen al

precursor de un miRNA maduro (pre-miRNA), el cual es una horquilla de aproximadamente 60-100 nucleótidos.

El pre-miRNA es transportado del núcleo al citoplasma por Exportin5 y Ran-GTP [106]. Los transcritos exentos de este proceso son los intrones cortos que contienen precursores de miRNAs llamados “mirtrons” (Figura 8.0). Algunos mirtrons empalmados y no ramificados pueden evitar el procesamiento por Drosha y acceder a la ruta canónica de procesamiento de los miRNAs después de la exportación nuclear [107].

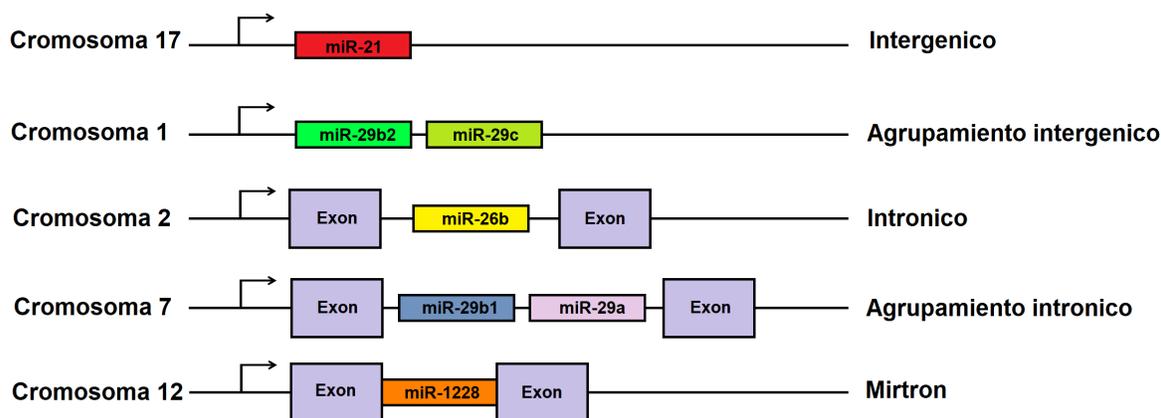


Figura 8.0. Organización genómica de genes de microRNAs. Los genes de los miRNAs pueden ser inter-génicos (solos o agrupados), en un intrón de un RNA no codificante, de un gen que codifica a una proteína (solos o agrupados) o pueden ser mirtrons (parte de un intrón corto de algún gen).

Más adelante los pre-miRNAs son procesados por la proteína de unión a ARN en respuesta a activación trans (TRAP) [108]. Por otro lado, Dicer es una RNasa tipo III endonucleasa y se cree que TRBP recluta y se une al pre-miRNA para estabilizar la interacción de Dicer-RNA. Existen varios requisitos para el reconocimiento y escisión del RNA dúplex por Dicer [109], Por ejemplo, solo los miRNAs dúplex con mismatches formaran un eficiente complejo con Dicer/Ago1. Los mismatches en la región semilla o 3' terminal, promueven el desenrollamiento del RNA dúplex mientras que el bucle terminal puede promover la renovación de la enzima [109,110]. La escisión por Dicer produce un miRNA dúplex de aproximadamente de 21 nucleótidos que se incorporan en el complejo de silenciamiento de RNA inducido (RISC). El RISC incluye a Dicer, TRBP, PACT (Proteína activadora de PKR), y una de las cuatro proteínas Ago [111].

El miRNA dúplex es separado por helicasas en dos cadenas simples, la cadena guía madura (Figura 9.0) y la cadena complementaria del miRNA [109]. La selección de la

cadena guía depende de los primeros nucleótidos en el extremo 5' y de que la proteína Ago se encuentre presente en RISC [112]. Los miRNAs son típicamente degradados por el complejo RISC, aunque se cree que algunos miRNAs regulan negativamente la expresión génica, como un miRNA maduro. Se desconoce porque algunos miRNAs son funcionales. Una hipótesis es que las cadenas podrían usarse de forma diferente en respuesta a señales extracelulares o intracelulares para regular un conjunto más diverso de genes que codifican a una proteína según sea necesario, otra hipótesis es que la selección de cadenas podría ser específica de ciertos tejidos [113]. Una vez que RISC contiene la cadena guía, este alinea los nucleótidos complementarios con la región 3'UTR del mRNA blanco. La mayoría de los sitios de unión de un miRNA se encuentran dentro de la región 3'UTR, aunque hay algunos miRNAs en la región 5'UTR de un mRNA [114]. Parece haber una base biológica para la interacción preferencial de miRNAs con la región 3'UTR. Los datos sugieren que los sitios de unión de miRNAs dentro de la región codificante de un transcrito son menos eficaces para regular la represión traduccional. Esto es probablemente debido a la capacidad de los complejos ribosómicos para anular e inhibir la interacción miRNA-RISC con el (los) sitio (s) de unión potencial (es) [115]. Relativamente existen pocos sitios funcionales de unión a miRNAs en la región 5'UTR de un transcrito. La actividad de reconocimiento del ribosoma puede ser perjudicada por la interacción del miRNA-RISC con la región 5'UTR, sugiriendo que habría una inhibición eficaz de la expresión del gen. Aunque la ubicación general de un sitio de unión a un miRNA dentro de un transcrito ayuda a definir el grado de represión mediado por un miRNA, otros factores contribuyen a su eficiencia. Estos factores incluyen la secuencia contexto del sitio de unión del miRNA, el número de sitios dentro del mRNA, la estructura local del RNA y la distancia entre los sitios blancos [116]. El grado de alineamiento de bases entre el miRNA y el mRNA blanco, determina el destino de la transcripción. Es de particular importancia la interacción entre la región "semilla" del miRNA (2-8 nucleótidos) y el extremo 3' del sitio de unión al transcrito del mRNA. La región semilla determina la unión de un miRNA, si existe una unión perfecta entre el miRNA y el mRNA blanco, el mRNA sufre de una escisión por la endonucleasa Ago2, posiblemente en cuerpos de procesamiento del mRNA (cuerpos P) [117]. La unión imperfecta de los miRNAs a sus mRNA blancos desencadena la represión traduccional [117]. Para la mayoría de los mRNA, el inicio de la traducción se produce cuando el 5'-cap m7GpppN es reconocido por eIF4E, un componente de factor de inicio de la traducción eIF en eucariontes. Este complejo también incluye eIF4G, el cual interactúa con eIF3 para reclutar la subunidad ribosomal 40S y la proteína de unión poliadenilada 1 (PABP1). La

interacción de eIF4G con eIF4E y PABP1 físicamente junta los extremos 5' y 3' del mRNA estimulando el inicio de la traducción al aumentar la afinidad de eIF4E por el 5'cap. Los factores de activación *Trans*, que unen la 3'UTR inhiben la traducción por reclutamiento de proteínas que bloquean la interacción eIF4E-eIF4G o que se unen a la 5', lo que impide el ensamblaje del complejo de iniciación del ribosoma 40S [118]. Algunos estudios han mostrado que este es el caso de los componentes del RISC, específicamente las proteínas Ago [119].

El dominio central de la familia de proteínas Ago tiene algunas secuencias homologas a el dominio de unión al Cap eIF4E. Mutaciones en los dominios de las proteínas Ago suprimen la represión traduccional del m7G mRNA, sugiriendo que las proteínas Ago pueden competir con el eIF4E para inhibir la traducción [120].

Los miRNAs también pueden reprimir la traducción pos-iniciación, el complejo miRNA-RISC puede unirse a la traducción activa de un mRNA, reduciendo la elongación del péptido o potenciando la terminación de la traducción. Como un componente del RISC, proteínas Ago 1, 3 y 4 regulan la inhibición post-iniciación [121]. Estudios iniciales de blancos de miRNAs sugieren que solo los niveles de proteínas de blancos regulados fueron disminuidos mientras que los niveles de los mRNA blancos no se vieron afectados. Sin embargo, la alteración de la expresión de miRNAs en células o tejidos causa cambios significativos en los perfiles de expresión de los mRNA blancos, sugiriendo que los miRNAs pueden inducir la desestabilización del mRNA [122]. En eucariontes la degradación del mRNA puede ocurrir cuando existe un acortamiento de la cola de poli (A). Como parte del RISC, las proteínas Ago 1, 3 y 4 se piensa que reprimen la traducción al promover la degradación mediada por la cola de poli (A). Por otro lado, la función de los miRNAs en los cuerpos P, es secuestrar los transcritos blancos para almacenarlos, eliminar el m7G, desadenilarlo y degradarlo [117].

Interesantemente, los cuerpos P, podrían también actuar como un espacio de almacenamiento temporal o reprimir traduccionalmente los mRNA. Ya que la mayoría de los componentes de los cuerpos P se encuentran dispersos en el citosol, es probable que la represión por estas proteínas sea iniciada en el citosol y los mRNA suprimidos se agregan para formar los cuerpos P. Los gránulos de estrés son otro tipo de cuerpos que contienen mRNA reprimidos y son acumulados en respuesta a condiciones de estrés o inhibición general de la traducción [123].

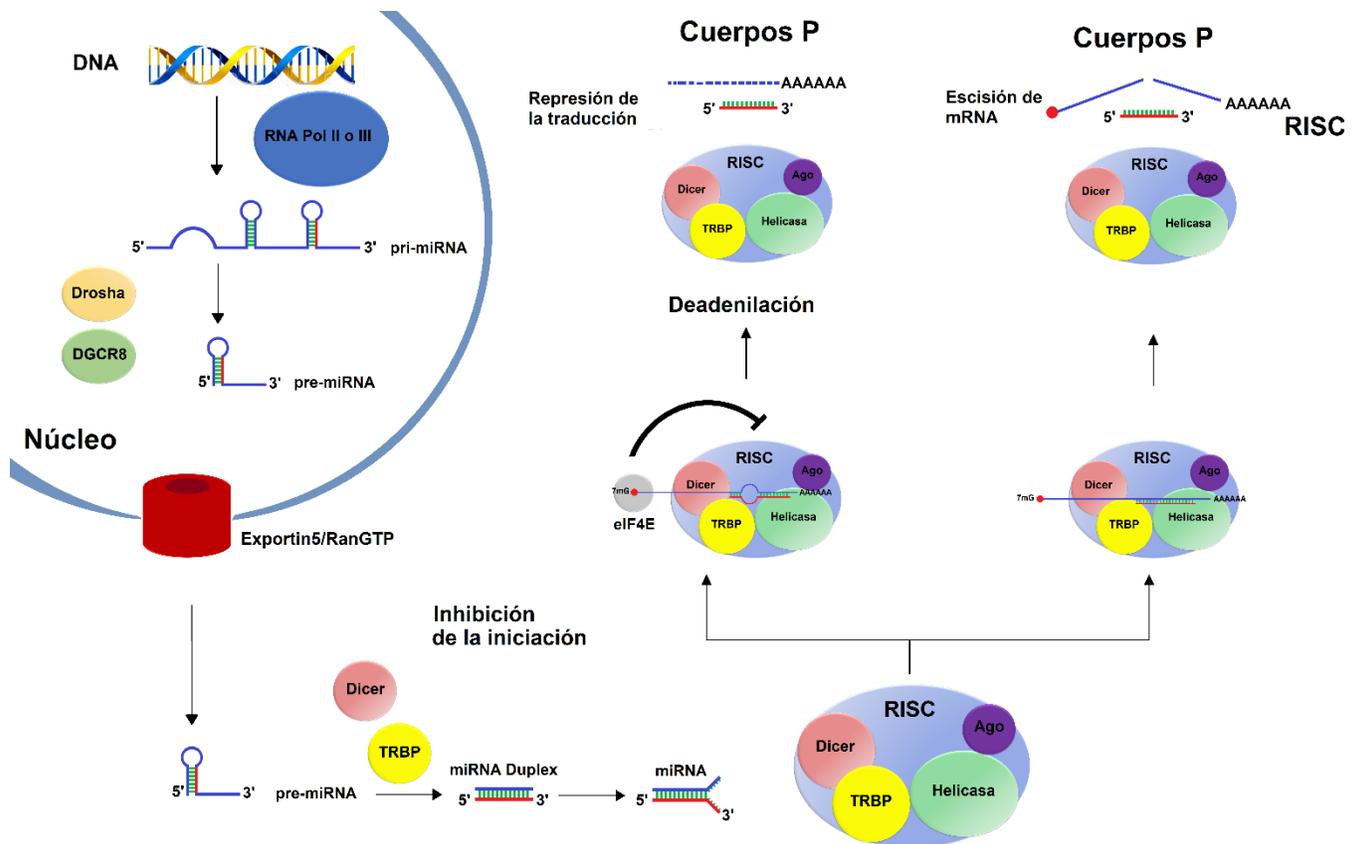


Figura 9.0. Biogénesis de miRNAs. Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II o III en un miRNA primario (pri-miRNA), el cual es procesado por Drosha/DGCR8 en un miRNA precursor (pre-miRNA). La cadena del miRNA maduro se muestra en color rojo, el pre-miRNA es transportado del núcleo al citoplasma por Exportin 5, donde es procesado por Dicer/TRBP (proteína de unión a RNA Dicer-TAR) en un miRNA dúplex. El RNA dúplex es separado por una helicasa y la cadena madura (rojo) es incorporada en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Dependiendo de la complementariedad del miRNA con un mRNA blanco, el RISC podrá regular la expresión de su gen blanco por represión de la traducción o degradación del mRNA.

ANTECEDENTES

MiRNAs en osteoblastogénesis

Las células madre mesénquimales (CMM), son células pluripotentes que tienen potencial para autorrenovarse y diferenciarse en varios linajes de tejidos mesénquimales, entre ellos los osteoblastos. Ambos procesos son regulados por mecanismos genéticos y epigenéticos. En la última década, estudios indican que dentro de los mecanismos epigenéticos se encuentran los miRNAs, los cuales tienen una función mediadora en procesos de proliferación y diferenciación de CMM. Por ejemplo: miR-133 es expresado en tejido

cardíaco adulto y músculo esquelético, se ha observado que este miRNA es sobreexpresado durante la diferenciación de mioblastos en la línea celular C2C12 [124]. Se ha demostrado que miR-133 es desregulado en presencia de proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) en la línea celular C2C12, sugiriendo que miR-133 podría tener un papel adicional en la inhibición de osteoblastos [125]. Por otro lado, se demostró que la sobreexpresión de miR-133 o miR-135 bloquea la inducción mediada por BMP-2 de marcadores osteoblásticos tales como: fosfatasa alcalina (ALP), osteocalcina y *HOXA10*. Por otro lado, estudios demostraron que *Runx2* es blanco de miR-133 y *Smad5* de miR-135. La baja regulación de estos dos miRNAs por BMP-2 tiene un papel importante en la regulación positiva de *Runx2* y *Smad5* durante la diferenciación osteogénica. De forma similar, miR-206 disminuye en respuesta a BMP-2 en células C2C12 durante la diferenciación de osteoblastos murinos primarios [126]. Otros estudios en líneas celulares muestran que las secuencias de los miRNAs maduros miR-141 y miR-200a son muy similares y la expresión de estos miRNAs disminuye en células osteoblásticas MC3T3-E1 tratadas con BMP-2. MiR-141 y miR-200a parecen ser reguladores negativos de la diferenciación de osteoblastos ya que su sobreexpresión inhibe este proceso. *Dlx5* (Distal-less homeobox 5) es un factor de transcripción maestro de la osteogénesis y su región 3'UTR tiene dos potenciales sitios de unión para miR-141 y miR-200a [127]. En líneas celulares donde se sobreexpresan miR-141 o miR-200a, los niveles de proteína *Dlx5* disminuyeron, dado que *Dlx5* activa la transcripción de osterix, un factor de transcripción crucial en la diferenciación de osteoblastos. Es posible que la represión de miR-141 y miR-200a inducida por BMP-2 aumente indirectamente la expresión de osterix y promueva la osteoblastogénesis [128]. Otro miRNA implicado en osteoblastogénesis es miR-208 el cual se demostró que disminuye en presencia de BMP-2 [127]. La sobreexpresión de miR-208 antagoniza la diferenciación osteoblástica mediada por BMP-2 de células MC3T3-E1 y osteoblastos primarios de ratón. El factor de transcripción osteogénico *Ets1* es un blanco de miR-208, su función es estimular la transcripción de la osteopontina y *Runx2*. Por lo tanto, BMP-2 disminuye la expresión de miR-208 permitiendo la regulación de *Ets1* promoviendo la diferenciación osteoblástica.

Estudios en modelos animales muestran que en células mesénquimales de ratón ST2, la expresión de miR-125b disminuye después de seis días de tratamiento con BMP-4. Por otro lado, miR-125b tiene un efecto negativo en la diferenciación osteoblástica, su sobreexpresión disminuye la actividad de ALP mientras que en ratón knockout de miR-125b

incrementa la expresión de ALP [129]. Por otro lado, *Runx2* también puede ser regulado negativamente por algunos miRNAs como miR23a/27a/24-2 en osteoblastos murinos [130]. Este conjunto de miRNAs es sobre-regulado durante la diferenciación de los osteoblastos de rata, pero solo miR-23 parece unirse a la región 3'UTR de *Runx2*.

Estudios en humanos han mostrado que los miRNAs miR-199a y miR-346 son regulados positivamente durante la diferenciación osteoblástica o adipogénica de CMM humanas [131]. Estos miRNAs regulan negativamente al factor inhibidor de la leucemia (LIF), un marcador de la múltipotencia de CMM humanas y están asociados con el estado no comprometido de las células madre embrionarias y adultas. De hecho, la expresión de LIF disminuye a medida que disminuye la plasticidad de las células madre. Por otro lado, la inhibición de LIF por miR-199a y miR-346 en CMM humanas, probablemente contribuyan a la inducir la diferenciación osteoblástica. Por otro lado, una de las familias de miRNAs asociadas a la osteoblastogénesis mejor caracterizada es la de miR-29, la cual está implicada a la función de los osteoblastos, estos miRNAs son importantes reguladores positivos de la diferenciación de osteoblastos. La expresión de los miembros de la familia de miR-29 es baja durante las primeras fases de deposición de la matriz durante la osteoblastogénesis. Un bajo nivel de expresión de miR-29a es necesario ya que este miRNA podría regular genes formadores de la matriz ósea incluidos *COL1A1*, *COL3A1* y osteonectina (ON) [132]. La co-regulación de la osteonectina y las proteínas de colágenos fibrilares no es inesperada ya que la osteonectina juega un papel crítico en la regulación de la formación de fibrillas de colágeno [133]. Más adelante, la expresión de miR-29 incrementa a medida que la matriz madura y los osteoblastos alcanzan la maduración terminal [134]. La sobre expresión de miembros de la familia miR-29, promueven la diferenciación osteoblástica, mientras que la disminución de miR-29 disminuye los marcadores de diferenciación [135]. Actualmente se sabe que la vía de señalización WNT canónica es un regulador positivo crítico de la diferenciación de osteoblastos que induce rápidamente la expresión de miR-29a y 29c [136].

Dado que la activación de la vía de señalización WNT canónica tiende a aumentar durante la diferenciación de osteoblastos, es posible que esta vía desempeñe un papel en el aumento de la expresión de miR-29 que ocurre durante la diferenciación de osteoblastos [137]. Además, miR-29a modula la vía de señalización WNT canónica en un ciclo de retroalimentación positiva, para promover la diferenciación de osteoblastos humanos [136].

Un miRNA que también ha sido implicado en la osteoblastogénesis es miR-27. Se ha observado que este miRNA aumenta durante la diferenciación de los osteoblastos, regulando negativamente la poliposis adenomatosa coli (APC) y favoreciendo la osteoblastogénesis. Cuando la osteoblastogénesis no se encuentra activa por señalización de la vía WNT, APC es parte de un complejo inhibidor que se une a β -catenina evitando su translocación al núcleo. Estos datos sugieren que miR-27 podría promover la osteoblastogénesis a través de la regulación de APC permitiendo la activación de la señalización por WNT [138]. En la tabla 2.0 se muestran los miRNAs asociados a la osteoblastogénesis. Sin embargo, estudios sobre miRNAs asociados a la osteoclastogénesis son limitados.

Monocitos como modelo en el estudio de osteoclastos

Estudios dirigidos a identificar el rol de los miRNAs en osteoclastogénesis son relativamente limitados principalmente por el difícil acceso a estas células. Sin embargo, los monocitos circulantes son células importantes que participan en el proceso de osteoclastogénesis como precursores de osteoclastos, se obtienen de forma relativamente sencilla, pueden diferenciarse *in vitro* a osteoclastos maduros [139] y pueden secretar factores característicos de los osteoclastos como: interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) [140,141]. Algunos estudios han reportado a los monocitos como un modelo potencial para el estudio de osteoclastos y desarrollo de enfermedades como la osteoporosis, a nivel de proteínas [142], a nivel genético en la búsqueda de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociados al desarrollo de la osteoporosis [143] y a nivel de RNA no codificante, por ejemplo: de la Rica *et al.* 2015. En el que se realizó un análisis de los cambios de expresión de miRNAs durante la diferenciación de osteoclastos partiendo de monocitos humanos primarios, observando la rápida sobre regulación de dos grupos de miRNAs, miR-212/miR-132 y miR-99b/let-7e/miR-125a. Se demostró que estos miRNAs regulan negativamente genes monocito específicos y genes inmunomoduladores como: *TNFAIP3*, *IGF1R* e *IL15*. La depleción de estos miRNAs inhibe la diferenciación de osteoclastos y sobre regula la expresión de sus genes blancos. Un dato importante es que los autores también describen al factor nuclear kappa B (NF-kB) como un regulador de la expresión de estos dos grupos de miRNAs en el proceso de diferenciación de monocitos humanos a osteoclastos [144]. Más adelante se describe la participación de algunos miRNAs que han sido implicados en osteoclastogénesis.

Tabla 2.0. Antecedentes de MiRNAs asociados a osteoblastogénesis

miRNAs	Especie	Blancos	Expresión miRNA endógeno	Función del miRNA	Enfermedades relacionadas	Referencias
miR-133	C2C12	<i>Runx2</i>	Sobre-expresión regula osteoblastogénesis	Bloquea la expresión de marcadores osteoblásticos	No se mencionan	[125]
miR-135	C2C12	<i>Smad5</i>	Sobre-expresión regula osteoblastogénesis	Bloquea la expresión de marcadores osteoblásticos	No se mencionan	[145]
miR-206	humano	<i>ALP</i>	Sobre-expresión inhibe la función de los osteoblastos	Regula la diferenciación y función de osteoblastos pericondriales	Osteoporosis	[126]
miR-141	MC3T3-E1	<i>Dlx5</i>	Disminuye en células osteoblásticas MC3T3-E1	Inhibe la diferenciación de osteoblastos	Osteoporosis	[127]
miR-200a	MC3T3-E1	<i>Dlx5</i>	Disminuye en células osteoblásticas MC3T3-E1	Inhibe la diferenciación de osteoblastos	Osteoporosis	[127]
miR-208	MC3T3-E1	<i>Ets1</i>	Regula la diferenciación osteoblástica	estimula la transcripción de la osteopontina y Runx2	Osteoporosis	[146]
miR-125b	ST2	<i>ALP</i>	La expresión disminuye bajo el estímulo de BMP-4	Regula negativamente la diferenciación de osteoblastos	No se menciona	[129]
miR-210	ST2	<i>ALP</i>	La expresión incrementa bajo el estímulo de BMP-4	Regula negativamente la diferenciación de osteoblastos	No se menciona	[147]
miR-26a	Humano	<i>SMAD1</i>	Disminuye la regulación de la vía BMP	Regula la osteoblastogénesis	Osteoporosis	[71]
miR-199a	Humano	<i>LIF</i>	La sobre regulación activa la diferenciación de células embrionarias	Regula positivamente la osteoblastogénesis	No se menciona	[131]
miR-346	Humano	<i>LIF</i>	La sobre regulación activa la diferenciación de células embrionarias	Regula positivamente la osteoblastogénesis	No se menciona	[131]
miR-29	Humano	<i>COL1A1, COL3A1 y osteonectina (ON)</i>	La sobre expresión favorece la diferenciación de células madre a osteoblastos	Regulación positiva de la osteoblastogénesis	No se menciona	[132]

miRNAs en osteoclastos

Estudios dirigidos a identificar el rol de los miRNAs en osteoclastogénesis son relativamente limitados. Sin embargo, la deleción de Dicer de células tipo específico en diferentes niveles de la osteoclastogénesis destaca la importancia de los miRNAs en la función de los osteoclastos. Por ejemplo, la deleción de Dicer en osteoclastos maduros utilizando un transgén Cre dirigido a un promotor de catepsina K en ratones con alelos Dicer atenuados, resulta en el incremento de la masa ósea del compartimiento trabecular, debido a un incremento en el número de osteoclastos [148]. En un modelo de osteoclastogénesis *in vitro* este proceso fue suprimido, sugiriendo un fenómeno celular autónomo. Un dato interesante es que la deleción de Dicer en osteoclastos maduros también resultó en una disminución de la tasa de formación ósea, indicando una disminución general en el remodelado óseo. Estos autores reportan que el análisis de expresión de miRNAs en microarreglos muestra cambios en los perfiles de expresión de miRNAs en precursores de osteoclastos tratados por 24 horas con M-CSF/RANKL para inducir la osteoclastogénesis. En este estudio, la expresión de miR-302 fue estimulada aproximadamente 1.8 fold-change y fue implicado en pluripotencialidad de células stem hematopoyéticas [149].

Estudios en líneas celulares

Estudios en líneas celulares muestran la participación de miRNAs en precursores de osteoclastos. miR-146 inicialmente fue identificado en la línea celular THP-1. El incremento de la expresión de miR-146 por estimulación de lipopolisacáridos (LPS) depende de NF- κ B el cual controla la señalización de citocinas asociadas a la muerte celular a través de un circuito de retroalimentación negativa y supresión de los niveles de expresión de las proteínas *TRAF6* y receptor de IL-1 asociado a cinasa 1 [150]. Ambas moléculas son importantes en la osteoclastogénesis. Otro miRNA implicado en osteoclastogénesis es miR-144-3p. Este miRNA ha sido asociado a múltiples tipos de cáncer. Ensayos *in vitro* mostraron que la transfección de un mimic miR-144-3p en líneas celulares de mieloma múltiple (MM) y suero de pacientes inhibe su proliferación, formación de colonias y promueve el arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 [151]. En el metabolismo óseo, miR-144-3p fue detectado en suero de pacientes con osteoporosis. De acuerdo a este estudio miR-144-3p está implicado en la osteoclastogénesis a través de la regulación de RANK en vertebrados. La expresión interrumpida de miR-144-3p en monocitos circulantes humanos cambia la actividad de TRAP y genes específicos de OC como: TRAP, CTSK y NFATc1, afectando procesos como formación, proliferación y apoptosis. Estos datos sugieren que miR-144-3p regula la homeostasis del hueso y por lo tanto representa un nuevo candidato

terapéutico para el tratamiento de la osteoporosis [152]. Estudios en la línea celular RAW264.7 de ratón mostraron que la sobre expresión de miR-223 inhibe completamente la formación de células multinucleadas TRAP⁺ [153]. Estudios con microarreglos para detectar la expresión de miR-223 maduro en la línea celular RAW264.7 tratadas con RANKL y TNF- α muestran que miR-223 tiene una regulación negativa durante la diferenciación de osteoclastos [154]. En resumen, la regulación de miR-223 disminuye durante la diferenciación de osteoclastos. Por lo tanto, es posible inhibir la diferenciación y maduración de este tipo de celular, así como la erosión ósea a través de la regulación positiva de miR-223.

Estudios en modelos animales

En modelos animales, uno de los miRNAs más estudiados por su asociación a la osteoclastogénesis es miR-21. Previamente este miRNA fue asociado al metabolismo óseo en un modelo *in vitro* como promotor de la osteogénesis [155]. Estudios en un modelo de ratón miR-21^{-/-} mostraron la función de este miRNA como regulador de la osteoclastogénesis. En este modelo se observó que la expresión de RANKL es promovida mientras que la expresión de OPG es suprimida. Este efecto fue confirmado por cambios correspondientes en la expresión de mRNA de RANKL y OPG en osteoblastos de ratón miR-21^{-/-} y en la secreción de RANKL y OPG en medio de cultivo. Por lo tanto, los autores infieren que el incremento posnatal de la masa ósea trabecular en ratones con miR-21^{-/-} no es atribuida a cambios en la osteoclastogénesis [156]. Sin embargo, otros reportes muestran a miR-21 involucrado en osteoclastogénesis inducida por RANKL en macrófagos de medula ósea de ratón. En estudios previos, miR-21 fue involucrado en la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL en macrófagos de medula ósea de ratón. Factores de transcripción para la osteoclastogénesis como: c-Fos y PU.1 desencadenan la transcripción de miR-21 a través de los sitios de unión a AP-1 y PU.1 en el promotor miR-21 [157]. Por otro lado, también se ha reportado que miR-21 regula la formación de osteoclastos a través de un bucle positivo de retroalimentación que involucra a c-Fos/miR-21/PDCD4 (muerte celular programada 4). En este proceso, el factor de transcripción de la osteoclastogénesis c-Fos sobre-regula la expresión de miR-21, luego disminuye la regulación de la expresión de la proteína PDCD4, la cual a su vez reprime la inhibición inducida por PDCD4 a c-Fos promoviendo la osteoclastogénesis inducida por RANKL [158]. Estos autores también descubrieron que miR-21 juega un papel importante en el control de los estrógenos ya que estos inducen la apoptosis de los osteoclastos e inhiben la osteoclastogénesis [159]. Los estrógenos regulan negativamente la biogénesis miR-21 de modo que los niveles de la

proteína FasL (ligando de Fas), un gen blanco de miR-21 aumentan su expresión después de la transcripción y por lo tanto inducen la apoptosis de los osteoclastos [160].

Otro miRNA identificado en modelos animales es miR-124. Sin embargo, su papel en la osteoclastogénesis es poco claro. Tang *et al.* 2017 a través de un modelo de ratón ovariectomizado y normal obtuvieron monocitos circulantes de medula ósea que fueron estimulados con *RANKL* y *M-CSF* para ser diferenciados a osteoclastos. En este estudio se encontró que miR-124 no afecta la viabilidad de los monocitos circulantes de medula ósea ya que las células tratadas con mimics miR-124 o inhibidores de miR-124 no revelaron cambios significativos en la viabilidad de las células, sugiriendo que la sobre-regulación o sub-regulación de miR-124 no tiene efectos marcados sobre la proliferación de los monocitos circulantes de medula ósea de ratón. Por otro lado, se observó que las células transfetadas con miR-124 mimics o inhibidores de miR-124 que fueron inducidos a diferenciación a osteoclastos, mostraron que la desregulación de miR-124 estimula notablemente la diferenciación de osteoclastos, la cual fue evidenciada por el incremento en la expresión de genes específicos que son marcadores característicos de la osteoclastogénesis como: *NFATc1* y *TRAP*. Sin embargo, también se observó que la sobre-expresión de miR-124 inhibe significativamente la diferenciación osteoclástica de monocitos circulantes de medula ósea. El análisis bioinformático demostró que *Rab27a* es un gen blanco de miR-124. En reportes previos se ha encontrado que una disminución en la expresión de *Rab27a* muestra una baja actividad de reabsorción de los OC indicando el importante rol de este gen en el mantenimiento y funciones normales de los OC. También se muestra que la depleción de *Rab27a* resulta en fenotipos anormales de los OC. Estos datos sugieren que la sobre-expresión de miR-124 marca una disminución de *Rab27a* lo que perjudica las funciones normales de los OC, lo que indica que miR-124 inhibe la osteoclastogénesis vía supresión de *Rab27a* [161].

Estudios en monocitos humanos

Estudios en monocitos humanos muestran el papel de miRNAs asociados a la osteoclastogénesis. MiR-31 es un miRNA asociado a osteoclastogénesis. De acuerdo a lo reportado por Mizoguchi *et al.*, 2013. Reportaron un modelo de diferenciación de células precursoras hematopoyéticas de medula ósea humanas a osteoclastos maduros bajo el estímulo de *RANKL*. Se observó que miR-31 es sobre-regulado, mientras que bajo el efecto de un antagomir la expresión de miR-31 disminuye e inhibe la osteoclastogénesis. Análisis posteriores mostraron que miR-31 podría controlar la osteoclastogénesis y reabsorción

ósea a través de la organización del cito-esqueleto a través de la regulación del gen *RhoA* el cual está asociado a la formación de fibras de tensión de actina y adhesión focal [162]. La inhibición de *RhoA* por la exoenzima C3 inhibe la formación de anillos de actina y formación de pozos sobre discos de dentina. Por otro lado, la inactivación de *RhoA* por C3 es comparable con la regulación por miR-31 sugiriendo que este miRNA es una molécula crucial en el control del desarrollo y función de los osteoclastos [163].

Inicialmente miR-133a fue asociado a la regulación de procesos de diferenciación en células musculares y en patogénesis de enfermedades miogénicas y del corazón [124]. En el metabolismo óseo se encontró que la sobre expresión de miR-133a en la línea celular osteoblástica *MC3T3* regula la expresión de *RUNX2* (factor de transcripción que orquesta la osteoblastogénesis) y ALP (fosfatasa alcalina), un marcador de la formación de osteoblastos. Estos descubrimientos sugieren que este miRNA tiene un papel importante en la producción y diferenciación de osteoblastos [164]. Estudios en cáncer de hueso determinaron que miR-133a se encuentra desregulado en líneas celulares y en tejido primario de osteosarcoma humano, estos cambios correlacionan significativamente con la progresión de tumores y prognosis en pacientes. Más adelante estudios funcionales mostraron que la restauración de la actividad de este miRNA podría reducir la proliferación celular, promover la apoptosis y suprimir la tumorigenicidad en líneas celulares de osteosarcoma [165]. MiR-133 también ha sido implicado en la regulación de la osteoclastogénesis. En este estudio Wang et al. 2012. compararon la expresión de miR-133a en monocitos de sangre periférica de mujeres posmenopáusicas caucásicas con densidad mineral ósea (DMO) normal contra DMO baja, sus resultados mostraron miR-133a se encuentra sub-regulado en mujeres con baja DMO. El análisis bioinformático demostró que miR-133a regula negativamente 3 genes asociados al metabolismo óseo: *CXCL11*, *CXCR3* y *SLC39A1*, los cuales no parecen tener un papel importante en la osteoclastogénesis. Sin embargo, la sobre regulación de miR-133a en mujeres con baja DMO podría tener un papel como posible biomarcador para la detección de la OP [141].

Otro estudio de identificación de miRNAs en humanos, es el trabajo reportado por Cao *et al.* 2014. En este trabajo se identificó miR-422a como sobre expresado en monocitos circulantes de sangre periférica de mujeres posmenopáusicas con alta DMO. De acuerdo al análisis bioinformático, se identificaron algunos genes blancos relacionados a la osteoclastogénesis incluidos el protooncogén (*CBL*), clúster de diferenciación 226 (*CD226*), Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (*IGF-1*), fosfoproteína asociada con microdominios glicosfingolipidos (*PAG1*) y transductor de ERBB2 (*TOB2*). Este grupo de

trabajo, también demostró una aparente correlación negativa entre cada uno de estos 5 genes y miR-422a, aunque ninguna de las correlaciones alcanzó significancia estadística [166]. Estos estudios sugieren que miR-422a está involucrado en la regulación de osteoporosis posmenopáusica y podría ser un potencial biomarcador de la OP.

Un estudio similar es el reportado por Meng *et al.* 2015. En el que a través de un análisis de microarreglos, identifico el miRNA miR-194-5p sub-expresado en células mononucleares de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, sugiriendo el papel de este miRNA como un posible biomarcador para la detección temprana de esta enfermedad. El análisis bioinformático mostró que este miRNA se encuentra asociado a 19 vías de señalización entre las que destacan: la vía de señalización TGF-beta, vía de señalización Wnt, vía de señalización MAPK, vía de señalización Toll-like receptor, vía de señalización Jak-STAT y vía de señalización T cell receptor, algunas de las cuales ya se han reportado como asociadas al metabolismo óseo [167].

Otro miRNA asociado a la regulación de la osteoclastogénesis es miR-503. Se muestra que la sobre expresión de este miRNA en monocitos circulantes humanos de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis regula al ligando del receptor activador del factor nuclear kB (RANKL) evitando la osteoclastogénesis. Por otro lado, el silenciamiento inducido de este miRNA en monocitos circulantes promueve la osteoclastogénesis. Por lo tanto, los autores concluyen que la sobre expresión de este miRNA podría estar asociada al desarrollo de patologías como la osteoporosis [168]. Otro estudio muestra la sub expresión de miR-125a en monocitos circulantes durante la diferenciación a osteoclastos inducida por M-CSF y RANKL. Por otro lado, la sobre expresión inducida de este miRNA en monocitos circulantes estimulados por las citocinas M-CSF y RANKL inhibe la osteoclastogénesis mientras que la inhibición de miR-125a promueve la osteoclastogénesis. El análisis bioinformático de este trabajo mostró que miR-125a regula negativamente la expresión del receptor TNF asociado al factor 6 (TRAF6), un factor de transducción para la señalización RANK/RANKL/NFATc1 que es necesaria para la activación de la diferenciación monocito osteoclasto [169].

Debido a que los miRNAs podrían representar nuevos blancos terapéuticos para el control farmacológico de enfermedades óseas, recientemente algunas investigaciones han revisado la importancia de los miRNAs en la regulación pos-transcripcional del desarrollo del esqueleto [170,171]. Las funciones de algunos miRNAs y su participación en la osteoclastogénesis se resumen en la tabla 3.0, donde se muestra el papel relevante de los

miRNAs en osteoclastos y algunos asociados a enfermedades óseas tales como la osteoporosis.

Estos datos sugieren que los miRNAs juegan un papel importante en la homeostasis del hueso a través de la regulación de los procesos de reabsorción y formación ósea, mediados por osteoblastos y osteoclastos respectivamente. Alteraciones en los perfiles de expresión de estos miRNAs pueden conducir al desarrollo de enfermedades asociadas al metabolismo óseo como la osteoporosis. Datos en la literatura sugieren que existen algunos fármacos efectivos para el tratamiento de esta enfermedad como: los bifosfonatos (alendronato, risedronato e ibandronato), estos medicamentos son clasificados como antirresortivos óseos y siguen siendo el tratamiento farmacológico más popular y ampliamente utilizado para la OP [172]. Sin embargo, cuando estos fármacos están contraindicados o causan efectos secundarios graves, están disponibles nuevos tratamientos y formas farmacológicas alternativas. Actualmente existe gran dificultad para evaluar la respuesta al tratamiento de la osteoporosis ya que la Densitometría ósea (DXA), considerada como el estándar de oro para el diagnóstico y en el seguimiento de los pacientes, es un método no disponible en los servicios básicos de salud [173]. Por lo que en los últimos años la literatura ha sugerido una alternativa al uso del DXA en la monitorización clínica de pacientes con OP, a través del uso de biomarcadores de reabsorción y formación ósea, como es el caso de los miRNAs.

Tabla 3.0. Antecedentes de MiRNAs asociados a osteoclastogénesis.

miRNAs	Especie	Blancos	Expresión miRNA endógeno	Función del miRNA	Enfermedades relacionadas	Referencias
MiR-302	Línea celular Mioblastos	<i>BMP-2</i>	MC3T3, C2C12	Regula la osteogénesis	Osteoporosis	[174]
MiR-146a	Humano	<i>c-Jun, NFATc1, PU.1 y TRAP</i>	Sobre-regulado en monocitos estimulados con RANKL y M-CSF	Regula la osteoclastogénesis	No se menciona	[175]
MiR-144-3p	Línea celular de Mieloma múltiple	<i>RANK</i>	Sobre-regulado en monocitos	Afecta la formación, proliferación y apoptosis de osteoclastos	Osteoporosis posmenopáusica	[152]
MiR-223	Línea celular	<i>NFI-A</i>	Sub-regulado en RAW264.7	Desregulado durante la diferenciación a osteoclastos	No se menciona	[176]
MiR-21	Ratón	<i>FasL, PDCD4</i>	La sobre-regulación induce osteoclastogénesis por RANKL	Inhibe la apoptosis de los OC y potencia la diferenciación de los OC	Osteoporosis posmenopáusica	[155,156]
MiR-124	Ratón	<i>Rab27a</i>	Sobre-regulado en monocitos	Regula la osteoclastogénesis	Osteoporosis posmenopáusica	[161]
MiR-31	Humano	<i>RhoA</i>	Sobre-regulado bajo el estímulo de RANKL	Regula la osteoclastogénesis	No se menciona	[163]
MiR-133a	Humano	<i>CXCL11, CXCR3, SLC39A1</i>	Sobre-regulado en mujeres posmenopáusicas con baja DMO.	Se sugiere como biomarcador para la detección de la OP	Osteoporosis posmenopáusica	[165]
MiR-422a	Humano	<i>CBL, CD226, IGF-1 PAG1, TOB2</i>	Sobre-regulado en monocitos	Afecta a genes asociados a la osteoclastogénesis	Osteoporosis posmenopáusica	[166]
MiR-194-5p	Humano	<i>Vías de señalización</i>	Sub-regulado en monocitos	Involucrado en vías de señalización asociadas al metabolismo óseo	Osteoporosis posmenopáusica	[167]
MiR-30a	Humano	<i>DC-STAMP, c-Fos y NFATc1</i>	Sobre-regulado en monocitos estimulados con RANKL	Regula la expresión de genes que promueven la osteoclastogénesis	No se menciona	[161]
miR-503	Humano	<i>RANKL</i>	Sobre regulado en monocitos de mujeres con osteoporosis	Regula osteoclastogenesis	Osteoporosis	[168]
MiR-125a	Humano	<i>TRAF6</i>	Dramáticamente desregulado durante la osteoclastogénesis	Inhibe la osteoclastogénesis	Involucrado en enfermedades metabólicas	[169]

JUSTIFICACIÓN

La osteoporosis, es una enfermedad silenciosa que afecta principalmente a mujeres posmenopáusicas. En México, esta enfermedad es considerada como un importante problema de salud pública debido a los altos costos socioeconómicos que genera. A la fecha existen muchos estudios asociados al metabolismo óseo, principalmente en el área de la osteoblastogénesis. Sin embargo, estudios asociados a la osteoclastogénesis son limitados debido al difícil acceso a estas células. Un modelo adecuado para el estudio de la osteoclastogénesis es a través de los monocitos circulantes ya que este tipo de células son precursores de osteoclastos, expresan marcadores característicos de estas células, pueden obtenerse en suficiente cantidad para experimentación y pueden diferenciarse *in vitro* a osteoclastos maduros. Por otro lado, en los últimos años se han descrito a los miRNAs como importantes reguladores en procesos de diferenciación, reorganización del citoesqueleto, proliferación y muerte celular entre otros, donde alteraciones en sus perfiles de expresión pueden desencadenar el desarrollo de múltiples patologías que incluyen al sistema musculo-esquelético. Por lo que en este estudio se buscó identificar miRNAs alterados en monocitos circulantes de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis que puedan jugar un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar miRNAs diferencialmente expresados en monocitos circulantes de sangre periférica de mujeres posmenopáusicas con alta y baja densidad mineral ósea, así como su participación en el metabolismo óseo.

Objetivos particulares

-Identificar miRNAs diferencialmente expresados asociados a la variación de la DMO e identificar sus respectivos genes bancos, así como su participación en el metabolismo óseo.

-Determinar las vías de señalización asociadas al metabolismo óseo en las que los miRNAs como sus respectivos genes bancos se encuentren implicados.

-Proponer un mecanismo a través del cual los miRNAs y sus respectivos genes blancos participen en alteraciones que conduzcan al desarrollo de una baja DMO.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población y diseño del estudio

Este trabajo fue aprobado por el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Instituto Nacional de Medicina Genómica. Todas las participantes fueron informadas acerca del estudio y aceptaron firmar una carta de consentimiento informado. Las mujeres seleccionadas fueron de origen Mestizo-mexicano y fueron reclutadas de la cohorte de estudio “trabajadores de la salud IMSS-Morelos” El cual es un estudio longitudinal que inicio en octubre de 1998 y su objetivo es evaluar la asociación entre factores de estilo de vida y la ocurrencia de enfermedades crónicas. Actualmente, este estudio está formado por 1,026 mujeres de las cuales 425 son mujeres posmenopáusicas con al menos un año del cese de la menstruación [177]. Los procedimientos clínicos, el registro de datos y las prácticas de seguimiento de los participantes han sido estandarizados y validados [178].

Se seleccionaron un total de 12 mujeres mestizo-mexicanas posmenopáusicas, no relacionadas. 6 con DMO normal y 6 con DMO baja (osteoporosis). Los criterios de inclusión fueron los siguientes: T-score de espina o cadera < -2.5 para el grupo de osteoporosis (Distribuciones superiores o inferiores al 20% de DMO correspondiente a edad, sexo, origen étnico) y T-score de espina o cadera > -1.0 para el grupo de DMO normal (Distribuciones superiores o inferiores al 20% de DMO correspondiente a edad, sexo, origen étnico). La DMO (g/cm^2) para espina lumbar (L2-L4) y cadera total fueron medidas usando un equipo de absorciometría de energía dual de rayos X Lunar DPX NT (Lunar Radiation Corp. Madison WI, USA). La calibración estándar del equipo se realizó diariamente usando los ajustes destinados para columna vertebral y cuello femoral de acuerdo a lo recomendado por el fabricante. Para estos ajustes se aseguraron que el coeficiente de variación (CV) estuviera dentro de los estándares operativos normales y que el CV fuera $<1.5\%$.

Todas las mujeres se encontraron en un rango de edad de entre 63–85 años y el estado de la menopausia se determinó por al menos 12 meses del cese de su menstruación. Los criterios de inclusión fueron usados para minimizar los potenciales efectos de algún factor genético no conocido sobre el metabolismo del hueso y determinación de la DMO. Los criterios de exclusión para nuestro grupo de estudio fue que: presentaran enfermedad

cerebro vascular, diabetes mellitus, que manifestaran enfermedad renal crónica por creatinina en suero (>1.9 mg/dl), enfermedad crónica del hígado o alcoholismo, terapia con corticoesteroides, tratamiento con anticonvulsivos, artritis reumatoide, enfermedad de algún órgano endocrino que pudiera afectar la masa ósea, hiperparatiroidismo, tratamiento con bifosfonatos, terapia de remplazo hormonal o cualquier otro factor aparentemente no genético subyacente a la variación de la DMO.

Aislamiento de monocitos (CD14⁺)

A cada individuo se le extrajeron un total de 80 ml de sangre periférica. Las células mononucleares (CMN) fueron obtenidas utilizando el método de gradiente de densidad con Histopaque-19077 (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) de acuerdo al protocolo del fabricante y centrifugando a 400 g durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Los monocitos circulantes CD14⁺ fueron obtenidos a partir de las CMN utilizando perlas magnéticas. Los monocitos nativos fueron aislados utilizando el Kit de selección negativa EasySep Human Monocyte Enrichment (Stemcell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canadá) el cual contiene un coctel de anticuerpos para depletar células T, células B, células asesinas naturales, CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD56, CD66b, CD123, eritrocitos y granulocitos, dejando únicamente monocitos intactos, vírgenes y libres de anticuerpos.

La pureza y viabilidad fue determinada por citometría de flujo con anticuerpos marcados con un fluoróforo, CD14-phycoeritrina (anti-CD14-PE) y CD45-Isotiocianato de fluoresceína (anti-CD45-FITC) (BD, Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA Cat. No. 555574 y 555748 respectivamente). Se utilizaron 1×10^6 monocitos enriquecidos que fueron resuspendidos en 100 μ l de PBS con 2% de suero fetal bovino, 20 μ l de anti-CD14-PE y 20 μ l de anti-CD45-FITC durante 45 minutos a temperatura ambiente en completa oscuridad. El análisis se realizó en un equipo para citometría de flujo FACSAria I utilizando el software FACSDiva versión 6.1.3 (BD Biosciences; San José, CA USA).

Perfil de miRNAs

El RNA total fue aislado de los monocitos enriquecidos utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La integridad del RNA y la cuantificación fueron evaluadas usando un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). Cada RNA que presentara alta calidad y un alto

número de integridad (>8.0) fue tomado en cuenta para este estudio. Se utilizaron 250ng/μl de RNA total que fue marcado con el kit de marcaje Biotina FlashTag HSR (Affymetrix Santa clara, CA USA) y posteriormente hibridado en el microarreglo GeneChip miRNA 4.0 (Cat. No. 902411, Affymetrix), el cual contiene 30,434 sondas de miRNAs maduros, de los cuales 2,578 corresponden a sondas de miRNAs humanos que están presentes en la versión 21 de la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>). El microarreglo fue lavado dos veces con PBS 1X, 0.02% Tween-20 y teñido con Biotina FlashTag HSR para marcar las muestras de RNA a través de la estación de fluido 450 (Cat. No. 901910, Affymetrix), seguido de la digitalización en el GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) de acuerdo al protocolo del fabricante.

Expresión de genes del microarreglo

El microarreglo de expresión GeneChip Human U133 Plus 2.0 (Affymetrix) fue utilizado para evaluar los niveles de expresión de genes del genoma completo. Se utilizaron un total de 500 ng/μl de RNA total para sintetizar cDNA biotinilado utilizando el kit de amplificación GeneChip expression 3' de Affymetrix (Thermo Fisher Scientific, Inc.), el cDNA fragmentado fue utilizado para la hibridación. Posteriormente el escaneo del microarreglo fue realizado usando el GeneChip 3000 7G Scanner (Affymetrix). La intensidad de cada gen fue logarítmicamente transformado a base 2 y fue normalizado utilizando el método de normalización por cuantiles utilizando el lenguaje de programación R y bioconductor (v3.3.3, <https://www.r-project.org/>).

Análisis de datos de microarreglos

Los datos crudos de las plataformas de los microarreglos GeneChip miRNA 4.0 y GeneChip HGU 133 plus 2.0 se procesaron utilizando el método de normalización Robust Multiarray Average (RMA) para la corrección de fondo, normalización por cuantiles y expresión diferencial a través de paquetes affy disponibles en bioconductor v3.3.3. La expresión diferencial fue determinada a través de modelos lineales utilizando paqueterías disponibles en limma Bioconductor v3.5 y los miRNAs fueron clasificados como diferencialmente expresados de acuerdo con un fold-change < -0.5 ó > 0.5 y un valor de $p \leq 0.05$.

Análisis RT-qPCR

El RNA fue extraído de los monocitos utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. 100 ng de RNA total fueron utilizados para sintetizar la primera cadena de cDNA utilizando TaqMan

MicroRNA Reverse Transcription Kit (Cat. No. 4366596 Applied Biosystem; Thermo Fisher Scientific Inc.). De acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los perfiles de expresión para miR-1270 (ID 002807), miR-548x-3p (ID 463079_mat) y miR-8084 (ID 466802_mat) fueron analizados utilizando sondas TaqMan para microRNAs (Applied Biosystem: Thermo Fisher Scientific, Inc.). La qPCR fue realizada en un equipo Applied Biosystem QuantStudio 7 Flex system (Applied Biosystem: Thermo Fisher Scientific, Inc.). Los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a las sondas RNU44 (ID 4427975; Applied Biosystem; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Para IRF8 y GAPDH el análisis de expresión se realizó utilizando cDNA que fue sintetizado de 100ng de RNA total utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem: Thermo Fisher Scientific, Inc.) de acuerdo al protocolo del fabricante. qPCR fue realizado vía sondas TaqMan (ID Hs01128713_m1; Applied Biosystem: Thermo Fisher Scientific, Inc.) en el equipo QuantStudio 7 Flex system (Applied Biosystem: Thermo Fisher Scientific, Inc.).

La cuantificación relativa (RQ) de los miRNAs de cada muestra fue determinada a través del $2^{-\Delta\Delta Cq}$, donde $\Delta Cq = [\text{El promedio del triplicado } Cq \text{ del gen banco miRNA} - \text{el promedio del triplicado } Cq \text{ de los controles endógenos (GAPDH)}]$ y el $\Delta\Delta Cq = [\text{El } \Delta Cq - \text{media } \Delta Cq \text{ de todas las muestras}]$. Los datos de RQ fueron usados para identificar los miRNAs que fueron diferencialmente expresados entre los dos grupos en este estudio vía prueba t-student.

Análisis bioinformático

Para predecir los potenciales genes blancos de cada miRNA diferencialmente expresado, se utilizaron los algoritmos de las siguientes bases de datos: microRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>), miRWalk v2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), PITA v5.0 (<https://omictools.com/pita-tool>) y TargetScan Human v7.0 (http://www.targetscan.org/vert_71/). Los genes blancos que se tomaron en cuenta fueron aquellos predichos por al menos 3 bases de datos. Más adelante, se validaron los resultados *In silico* a través de un análisis de comparación utilizando la lista de los potenciales genes blancos con los datos de expresión del microarreglo HGU133 plus 2.0. Se tomaron en cuenta aquellos genes que cumplieran la prueba de concepto donde si un miRNA se encontraba sobre-expresado el potencial gen blanco se encontrara sub-expresado. Los genes blancos que cumplían la prueba de concepto fueron utilizados para identificar los sitios de unión para miR-1270 y miR-548x-3p de acuerdo a la complementariedad de secuencias del gen blanco en la región 3'UTR utilizando las bases

de datos miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) y TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_71/).

Análisis funcional de vías de señalización

La herramienta bioinformática online STRING v10.0 (www.string-db.org/) fue utilizada para realizar el análisis de enriquecimiento funcional de los potenciales genes bancos de los miRNAs identificados por la selección de la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). El valor del False Discovery rate (FDR) < 0.05 fue seleccionado como un criterio de corte para el análisis de enriquecimiento KEGG. La base de datos PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) fue utilizada para realizar una búsqueda en la literatura sobre las vías de señalización identificadas en este estudio con palabras clave con genes asociados a alteraciones en DMO, monocitos, osteoclastos y osteoporosis. Se utilizó un score de confianza > 7.0 como criterio de corte para cada interacción. Más adelante, un análisis con la herramienta bioinformática Ingenuity Pathway Analysis (IPA) fue utilizado para construir una red de interacción basada en genes y miRNAs reportados en la literatura. Esta herramienta analítica, está basada en conocimiento previo de los efectos esperados entre genes y miRNAs almacenados en la base Ingenuity Knowledge (Qiagen, Inc., Valencia USA).

Análisis Estadístico

Una prueba de T-student fue utilizada como se indica en cada caso. Los datos graficados son representados por media \pm desviación estándar como se indica. Para el análisis estadístico de microarreglos, miRNAs y genes, los archivos con extensión CEL fueron importados al lenguaje de programación libre R. La expresión fue mostrada en log2 transformada en Fold-Change (FC). El paquete limma en bioconductor v3.5 fue utilizado para comparar el grupo normal vs el grupo con osteoporosis. El análisis robusto de multiarreglos (RMA) fue aplicado para la generación de valores de señal relativos y normalización. Para la comparación en la expresión diferencial de genes entre los dos grupos, se utilizó una prueba de T-student moderada que fue utilizada para el cálculo del FDR. Los resultados fueron expresados como el promedio de tres repetidos del FC. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando GraphPad Prism v.6.0 para Mac (GraphPad Software La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com). $p < 0.05$ fue considerado para indicar diferencias estadísticamente significativas.

Ensayo de gen reportero

Las secuencias de los miRNAs maduros hsa-miR-1270 y hsa-miR-548x-3p fueron clonadas en el plásmido pcDNA 6.2 (Invitrogen: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Este plásmido está diseñado para expresión constitutiva en una variedad de líneas celulares de mamíferos. El plásmido pcDNA 6.2-GW/± EmGFP-miR es un vector con las siguientes características: contiene un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) humano para potenciar un alto nivel de expresión del miRNA de un promotor dependiente de una RNA polimerasa II. Contiene regiones 3' y 5' flanqueantes del miRNA para la formación de un pre-miRNA diseñado. Los sitios de clonación contienen 4 nucleótidos adicionales sobre cada cadena de DNA para una clonación dirigida de los oligos ds que codifican al pre-miRNA de interés. Dos sitios attB1 y attB2 que permiten la recombinación basada en la transferencia del gen de interés en cualquier vector de expresión Gateway®. Contiene una señal de poliadenilación timidina quinasa del virus de herpes simple para terminación y poliadenilación del transcrito. Gen de resistencia a la espectinomicina para selección en *E. coli*. Un sitio de origen pUC para mantenimiento de un alto número de copias del plásmido en *E. coli*. Gen de resistencia a la blasticidina para selección en *E. coli* y células de mamífero para generar líneas celulares estables que expresen el miRNA. Adicionalmente, el vector pcDNA 6.2-GW/± EmGFP-miR también contiene una secuencia que codifica una proteína verde esmeralda (EmGFP) para una expresión co-cistronica con el pre-miRNA. (Figura 10.0).

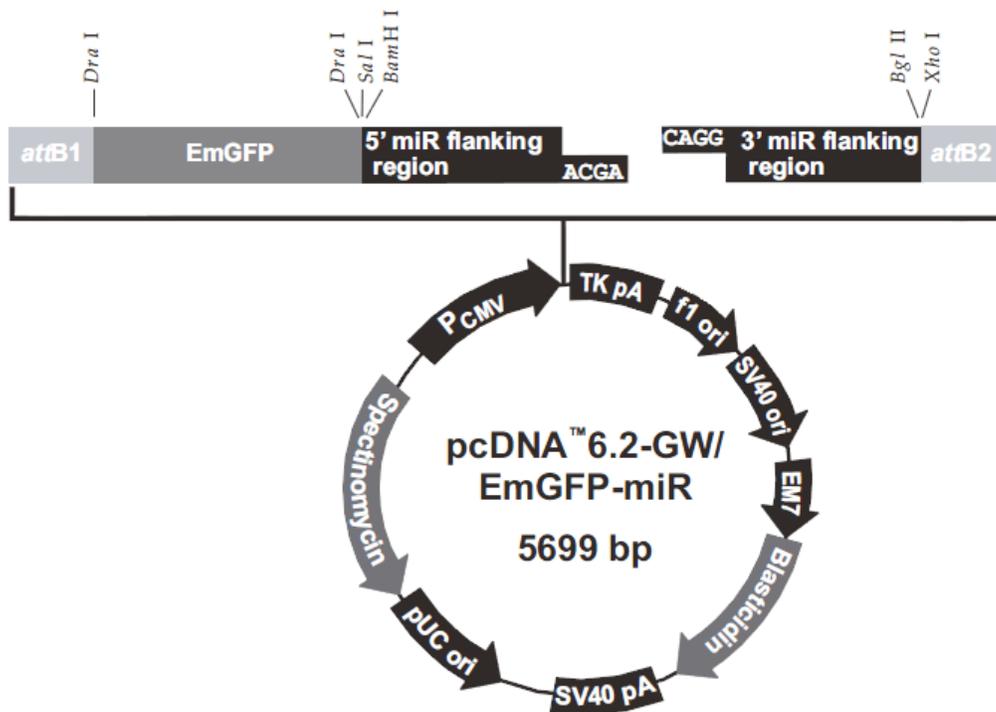


Figura 10.0 Componentes del plásmido pcDNA 6.2-GW/EmGFP.

Clonación de la región 3'UTR en el vector pMIR-Target

pMIR-Target es una construcción con un gen de luciferasa de luciérnaga como reportero y un gen asociado a β -gal. Contiene múltiples sitios de clonación río abajo del codón de paro de luciferasa y permite la inserción de alguna secuencia 3'UTR de interés creando una transcripción quimérica. En presencia de un miRNA apropiado (externo o interno) la maquinaria podría interactuar con las secuencias 3'UTR y causar una reducción en de la actividad de la luciferasa. La expresión de luciferasa con la secuencia 3'UTR es dirigida por un promotor SV40 y se traduce con una secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES). El diseño de IRES no afecta la interacción de miRNAs ni a sus respectivos blancos. Contiene una proteína rojo fluorescente (RFP) bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV) el cual es de mucha ayuda en monitorear la transfección. Este vector también es un plásmido reportero de β -galactosidasa, diseñado para la normalización de la transfección. Finalmente, este vector incluye genes para resistencia a neomicina, kanamicina bajo el control del promotor SV40 y un sitio de origen pUC para selección y mantenimiento de la clonación en *E. coli*. (Figura 11.0).

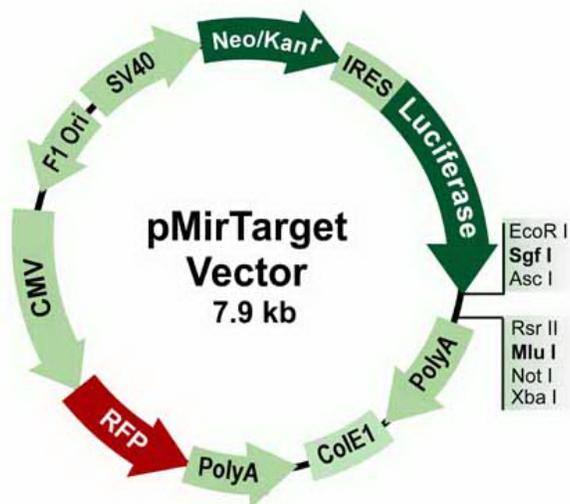


Figura 11.0 Componentes del plásmido pMIR-Target™ Luciferasa

La secuencia de cada uno de los insertos fue validada a través de la secuenciación por el método de Sanger. El sitio de unión para miR-1270 en la región 3'UTR de IRF8 fue eliminado mediante mutación sitio-dirigida empleando el kit QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies). El plásmido que contenía el inserto de cada gen de interés (WT o Mut) fue transfectado transitoriamente en las líneas celulares Saos-2 y U-2OS utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las células fueron colectadas 48h post-transfección. Para medir la actividad de luciferasa se empleó el kit Dual luciferase reporter Assay (Promega) analizando las muestras en un luminómetro GloMax® 20/20 (Promega). La actividad de luciferasa de Renilla, empleada como gen reportero se normalizó contra la intensidad de señal obtenida de la β -galactosidasa empleada como corrección de la eficiencia de transfección del plásmido. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Líneas celulares estables

Para generar líneas celulares estables que expresaran un miRNA de interés primero se determinó la concentración mínima de antibiótico (Blasticidina) requerida para eliminar las células no transfectadas. Se sembraron las líneas celulares de interés (Saos-2 y U-2OS)

hasta alcanzar el 90% de confluencia. Posteriormente se dividieron en 6 placas con aproximadamente 25% de confluencia y se agregaron las siguientes concentraciones de blastidina. 0, 1, 3, 5, 7.5 y 10 µg/ml. Posteriormente se reemplazó el medio selectivo cada 3-4 días y se observó el porcentaje de células vivas. Se cuenta el número de células viables en intervalos regulares para determinar la concentración apropiada de antibiótico que impide el crecimiento dentro de 1-3 semanas después de la adición del antibiótico. Una vez determinada la concentración apropiada de blastidina para la selección, se generó una línea celular estable que expresa la construcción del inserto de interés con el plásmido pcDNA 6.2. Posteriormente se preparó una solución stock de 5-10 mg/ml de blastidina en agua esterilizada y se filtró la solución estéril. Las concentraciones predeterminadas de blastidina se utilizaron en medio completo. Se observó que las células difieren en susceptibilidad a blastidina, por lo tanto, la selección completa requirió de 10 días de crecimiento en medio selectivo.

Ensayo MTT

Para evaluar la viabilidad y proliferación celular usualmente se requieren numerosos ensayos *in vitro* de la respuesta de una población celular a factores externos. En este estudio se utilizó la reducción de sales de tetrazolio que es ampliamente aceptada como una forma confiable de examinar la proliferación celular. El tetrazolio amarillo MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difeniltetrazolio) se reduce mediante células metabólicamente activas, en parte por la acción de las enzimas deshidrogenasas, para generar reductores como NADH y NADPH. El formazán intracelular de color azul es cuantificado en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), de tal forma que la cantidad de células vivas es equivalente a la cantidad de formazán producido. El ensayo de proliferación celular MTT mide la tasa de proliferación celular cuando los eventos metabólicos conducen a apoptosis o necrosis, reduciendo la viabilidad celular. Para cada tipo de células se establece la relación lineal entre el número de células y la señal producida, lo que permite una cuantificación precisa de los cambios en la tasa de proliferación celular.

En cada placa se colocaron de 1000 a 100,000 células, estas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 10µl del agente MTT y se incubaron de 2 a 4 horas hasta que el precipitado morado fuera visible, posteriormente se agregaron 100µl de detergente y se dejaron en oscuridad total durante 2 horas a temperatura

ambiente. Después de transcurrido este tiempo las células fueron leídas en un rango de longitud de onda de 550-600 nm.

Ensayo de herida

Las líneas celulares Saos-2 y U-2OS establemente transfectadas fueron cultivadas en medio DMEM (Sigma, St Louis, Mo., USA), adicionadas con 10% de suero fetal bovino inactivado con calor, 100 U/ml penicilina y 100µg/ml de estreptomina en una temperatura de 37 °C, en atmosfera con 5% de CO₂. Las células en monocapa confluyente (90%) fueron trazadas con una punta de 0.2 ml (amarilla) de forma horizontal. Las células trazadas con la herida fueron monitoreadas durante los tiempos 0, 24h y 48h con un equipo EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific).

Ensayo de migración e invasión por Transwell.

La habilidad de las células Saos-2 y U-2OS de migrar a través de una membrana porosa bajo la influencia de los miRNAs miR-1270 y miR-548x-3p fue evaluada mediante el ensayo transwell (R&D, Minneapolis, USA) de 12 pozos provistos con una membrana de policarbonato con poros de 8µm (Corning, NY, USA). Esta placa consta de dos cámaras, en la cámara inferior se agregaron 500 µl de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). En la cámara superior se sembraron 25x10³ células/ml por 24 horas a 37° C con atmosfera húmeda y 5% de CO₂. Después de 24 horas se procedió a cuantificar las células que atravesaron la membrana mediante fijación con metanol por 20 minutos y posterior tinción con cristal violeta al 0.01% durante 30 minutos. Las células que no atravesaron la membrana fueron removidas utilizando un hisopo estéril, posteriormente se separó la membrana mediante un bisturí y se colocó sobre un portaobjetos. Las células que migraron hacia el lado inferior de la cámara fueron observadas bajo un equipo EVOS FL Imaging System (Thermo Fisher Scientific No. Cat. AMF4300) con un aumento de 10X.

RESULTADOS

Características de la población de estudio

Las características clínicas de los sujetos de estudio se resumen en la tabla 4.0. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad de las mujeres seleccionadas en el presente estudio. Sin embargo, las diferencias fueron identificadas en el peso y talla entre el grupo normal y osteoporosis ($p < 0.05$). La media de edad del grupo normal fue de 66.66 ± 2.73 años, mientras que el grupo con osteoporosis fue de 73.16 ± 7.44 años y la DMO de cadera y espina fueron diferencialmente significativos entre los grupos ($p < 0.001$).

Tabla 4.0. Características de la población de estudio.

Características	Osteoporosis (n=6)	Normal (n=6)	Valor de p
Edad (Años.)	73.16 ± 7.44	66.66 ± 2.73	0.088
Estatura (cm)	146.50 ± 7.28	155.83 ± 5.94	0.036
Peso (kg)	58.75 ± 6.05	69.26 ± 9.49	0.049
IMC	26.16 ± 6.36	28.48 ± 3.08	0.448
Número de hijos	2.83 ± 2.13	5.33 ± 2.06	0.066
Edad de la menarca	12.50 ± 1.97	13.00 ± 0.89	0.589
DMO Espina (g/cm^2)	0.86 ± 0.12	1.15 ± 0.09	< 0.001
t-score Espina	-3.27 ± 0.76	-0.17 ± 0.68	< 0.001
DMO Cadera (g/cm^2)	0.63 ± 0.05	1.13 ± 0.07	< 0.001
t-Score Cadera	-2.97 ± 0.45	1.03 ± 0.56	< 0.001

Nota: Los datos se muestran en media \pm Desviación estándar.

Enriquecimiento de monocitos

Se obtuvieron 80ml de sangre periférica de cada mujer posmenopáusica del grupo normal y del grupo con osteoporosis, esta sangre fue utilizada para separar células mononucleares y posteriormente enriquecer monocitos circulantes CD14⁺ a través del kit de selección negativa EasySep Human Monocyte Enrichment (Stemcell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canadá). El conteo de células mononucleares y de monocitos de ambos grupos se muestra en la tabla 5.0.

Posteriormente una prueba de t-student fue utilizada para evaluar si existían diferencias significativas entre los promedios de CMN de ambos grupos obteniendo un valor de $p = 0.810$ mientras que para monocitos CD14⁺ se realizó la misma prueba obteniendo un valor de $p = 0.620$. Estos resultados muestran que no existen diferencias significativas en el número de CMN y en el número de monocitos CD14⁺ en ambas condiciones. Es importante mencionar que el porcentaje de monocitos obtenidos con respecto al total de CMN es del 7%, lo cual corresponde con lo reportado en la literatura donde el porcentaje de monocitos en sangre total varía de entre el 5-10% [179].

Tabla 5.0. Promedio del conteo de células mononucleares y monocitos CD14⁺.

Mujeres posmenopáusicas Normales			Mujeres posmenopáusicas Osteoporosis		
Progrelab	CMN (millones)	CD14 ⁺ (millones)	Progrelab	CMN (millones)	CD14 ⁺ (millones)
12261	116	5.1	11497	115	6.0
12268	112	7.8	8781	112	6.4
4932	100	6.4	12323	116	6.3
10295	103	6.4	40992	110	6.1
3450	116	5.5	5989	98	5.3
12624	117	9.3	6489	119	8.2
Promedio (X)	10.6	6.7		111.6	6.3
DE	7.3	1.5		7.3	0.9

Nota: DE = Desviación estándar.

Evaluación del enriquecimiento de monocitos por citometría de flujo

Una vez enriquecidos los monocitos CD14⁺, estos fueron evaluados por citometría de flujo a través del marcaje con anticuerpos anti-CD14-PE y anti-CD45-FITC. En la figura 12.0, se muestra un diagrama de citometría de flujo que representa el enriquecimiento de monocitos obtenidos de cada una de las 12 muestras. En el cuadrante superior derecho se observan las células marcadas con anticuerpos anti-CD14-PE y anti-CD45-FITC observando un 95% de enriquecimiento, superando al mínimo esperado de 80%.

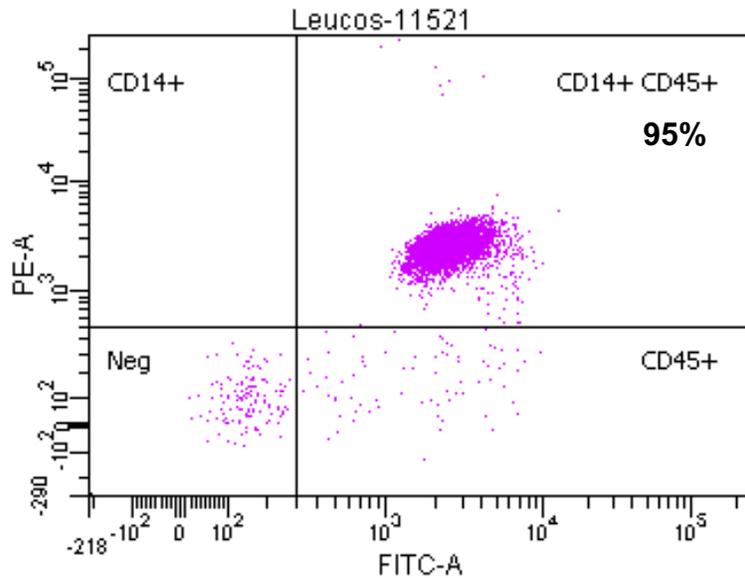


Figura 12.0. Diagrama de citometría de flujo. Se observa un grupo de células CD14⁺ marcadas con anti-CD14-PE y anti-CD45-FITC en el cuadrante superior derecho que representan un 95% de enriquecimiento de monocitos.

Obtención de RNA y evaluación por número de integridad del RNA (RIN)

Una vez enriquecidos los monocitos circulantes de los grupos de mujeres posmenopáusicas normales y con osteoporosis, se obtuvo RNA total de estas células utilizando el método de TRIzol, posteriormente este RNA fue evaluado de acuerdo a su número de integridad con un bioanalizador Agilent NanoChip 2000.

En la figura 13.0 A, se muestra un gel de integridad de RNA donde claramente se observan las bandas correspondientes al RNA 28 y 18S. Por otro lado, en la figura 13.0 B se observa una gráfica de integridad donde el pico correspondiente a 25nt corresponde al RNA de bajo peso molecular (miRNAs) mientras que los picos más altos corresponden al RNA 18 y 28S respectivamente de tal forma que, si estos RNA presentan buena integridad se estima que el RNA de bajo peso molecular también presenta buena integridad.

Es importante mencionar que para la hibridación de microarreglos es necesario contar con RNA de integridad superior a 8, en la tabla 6.0 se muestran los valores de RIN obtenidos para cada una de las muestras correspondientes a los grupos de mujeres normales y con osteoporosis.

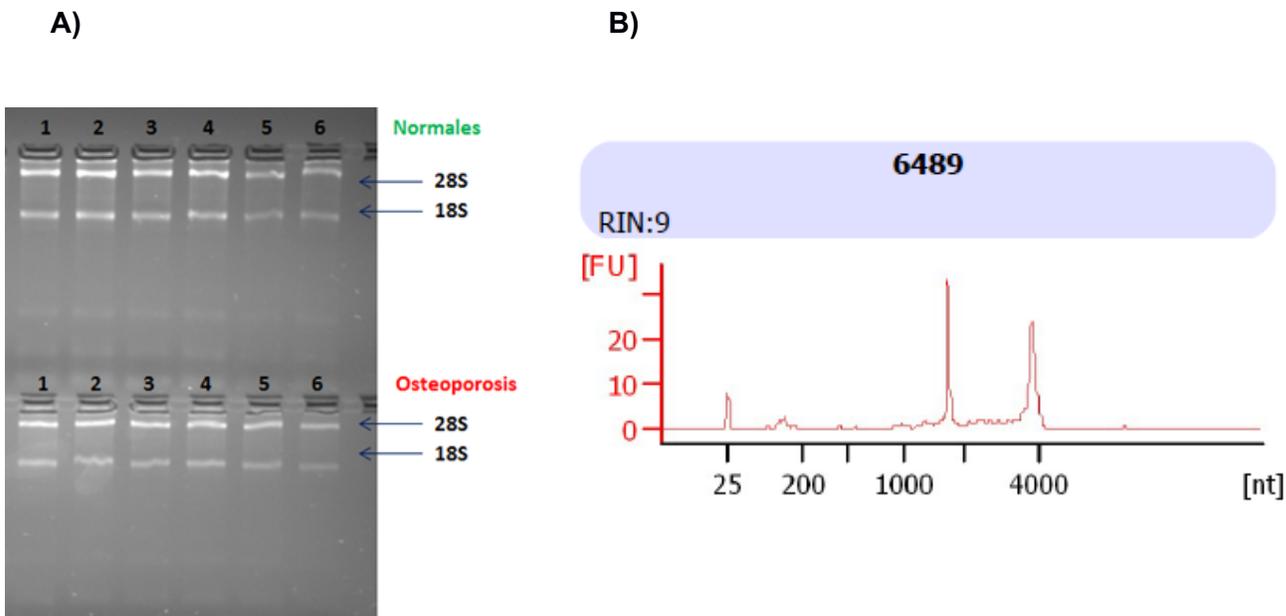


Figura 13.0. A) Gel de integridad de las muestras de RNA correspondientes a los grupos de mujeres posmenopáusicas normales y con osteoporosis, se observan las bandas correspondientes a 28S y 18S respectivamente. B) Se muestra una gráfica de integridad representativa de las muestras de los grupos normales y con osteoporosis.

Tabla 6.0. Número de integridad de RNA de los grupos normales y con osteoporosis.

Mujeres posmenopáusicas Normales		Mujeres posmenopáusicas Osteoporosis	
Progrelab	RIN	Progrelab	RIN
12261	8.8	11497	9
12268	8.2	8781	8.8
4932	8.5	12323	9
10295	9	40992	8.8
3450	9	5989	8.7
12624	9	6489	9

Análisis de microarreglos

Control de Calidad

El primer paso fue realizar un control de calidad de los datos de microarreglos con los que se trabajaron para comprobar que no hubo problemas de hibridación, degradación del RNA o daño físico en la placa del microarreglo, posteriormente se procede a la normalización y análisis de expresión diferencial.

En la figura 14.0 se muestra la intensidad de señal de cada microarreglo a través de histogramas antes (Figura 14.0 A) y después de la normalización (Figura 14.0 B). En rojo

se muestran los microarreglos hibridados con RNA de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis y en verde de muestran los microarreglos hibridados con RNA de mujeres posmenopáusicas normales.

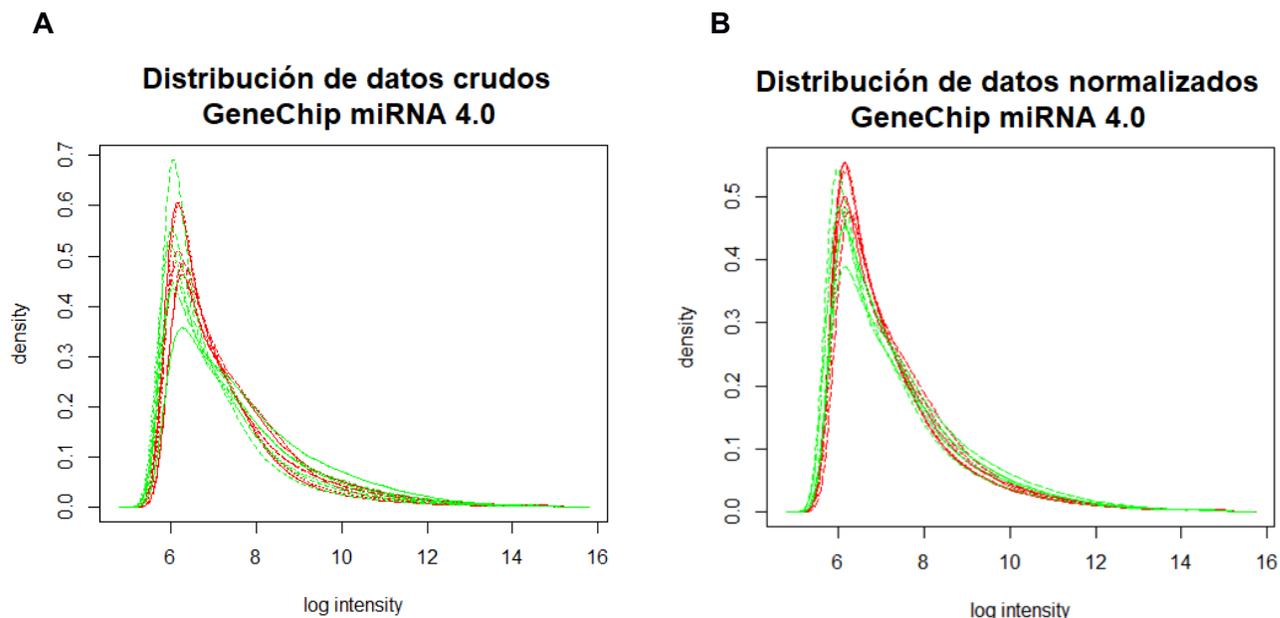


Figura 14.0. A) Se muestran los histogramas de la distribución de datos antes de normalizar. B) Se muestran los histogramas de Datos crudos después de la normalización.

Una vez que hemos confirmado que los datos del microarreglo son de buena calidad pasamos a comprobar que son comparables entre sí, para esto se analizó la distribución global de la fluorescencia en los distintos microarreglos utilizando gráficas de caja (Boxplots).

En la figura 15.0 A, se muestra que la distribución global de los niveles de fluorescencia no es comparable ya que presentan distintos valores medios, mínimos y máximos. Por lo tanto, fue necesario realizar un procesamiento de datos para obtener una estimación de los niveles de expresión de los distintos genes basadas en la fluorescencia de los microarreglos.

El algoritmo utilizado en este procesamiento es el Robust Multiarray Average (RMA) que consta de tres tareas principales: corrección de la fluorescencia para eliminar la señal no específica, normalización entre los distintos microarreglos para eliminar las diferencias técnicas y estimación de los niveles de expresión calculando la media de la fluorescencia

de las distintas sondas que representan un mismo gen. Tras este procesamiento podemos observar en la figura 15.0 B, que los niveles de expresión son comparables entre las distintas muestras.

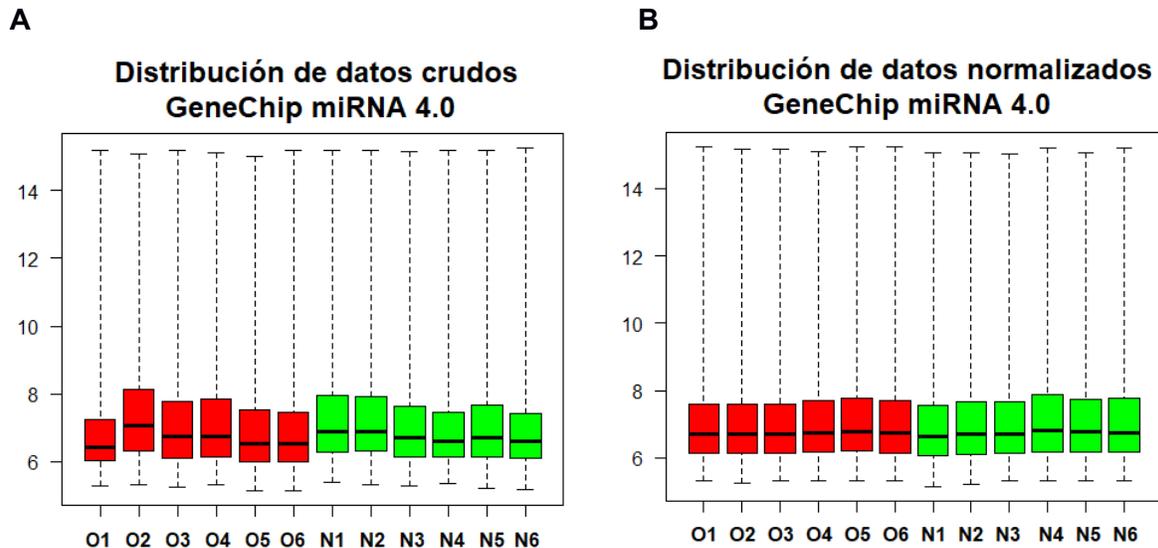


Figura 15.0. Boxplots de datos del GeneChip miRNA 4.0 A) Se muestran la distribución de datos antes de la normalización. B) Se muestra la distribución de datos después de la normalización.

El último control de calidad empleado antes del proceso de normalización, fue estimar el porcentaje de hibridación específica (perfectmatch) con respecto a la hibridación no específica (Mismatch). Esta evaluación es para descartar problemas de hibridación o degradación del RNA empleado, esperando un porcentaje de hibridación no específica menor al 35% (Figura 16.0).

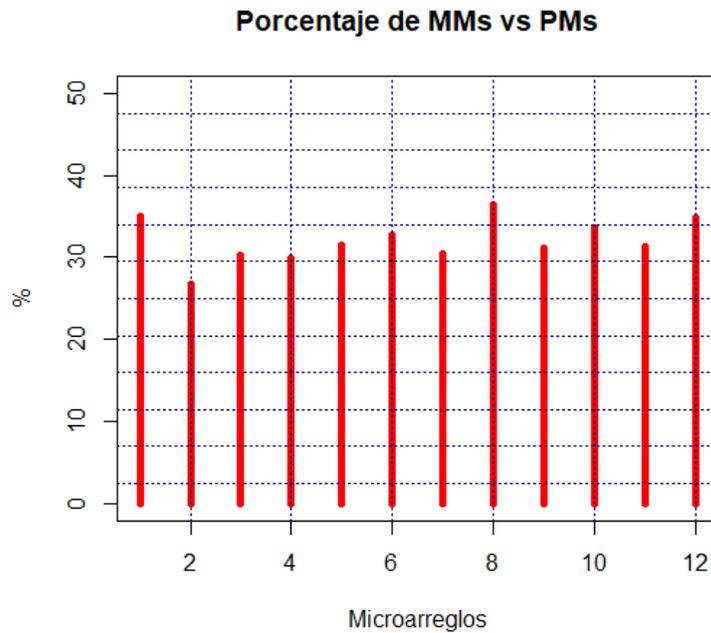


Figura 16.0. Porcentaje de Mismatch vs Perfectmatch. Se muestra el porcentaje de unión no específica en cada una de las 12 muestras correspondientes a los grupos de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis y normales.

Posterior a la evaluación con los controles de calidad, la función del análisis por RMA es normalizar los datos crudos de la lectura de microarreglos y generar una estimación en escala logarítmica (\log_2) de los niveles de expresión para posteriormente realizar el análisis de expresión diferencial.

Es importante señalar que en experimentos de microarreglos, la corrección para pruebas de hipótesis múltiples es de suma importancia. La prueba de False Discovery Rate (FDR) es un método para conceptualizar la tasa de errores tipo I en pruebas de hipótesis nulas cuando se realizan comparaciones múltiples, esto permite evitar resultados falsos positivos en la medida de lo posible. Desafortunadamente después de realizar la corrección de múltiples pruebas por FDR no se encontraron miRNAs que cumplieran con el umbral de significancia estadística como suele indicarse. Sin embargo, para superar esta limitante utilizamos los valores de p como un método de clasificación para seleccionar los miRNAs candidatos que posteriormente fueron sometidos a un proceso de enriquecimiento basado en información obtenida de bases de datos y literatura. Siendo esto un criterio meramente estadístico, se consideró qué al incorporar pruebas biológicas, es posible explicar la

selección de nuestros miRNAs de acuerdo a su relevancia biológica en un enfoque que ya ha sido respaldado por otros estudios [180,181].

Después de utilizar los valores de p como método de selección de los miRNAs candidato, el resultado del análisis de expresión diferencial mostró 35 miRNAs diferencialmente expresados, los miRNAs más relevantes y con valores de p estadísticamente significativos se muestran en un mapa de calor en la figura 17.0. En esta figura destacan los microRNAs miR-1270, miR-548x-3p y miR-8084 (marcados con flecha roja), que se encontraron sobre expresados en el grupo de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis. Mas adelante, en un gráfico de volcán se muestran los 35 miRNAs diferencialmente expresados. Señalando los miRNAs de mayor interés para este estudio.

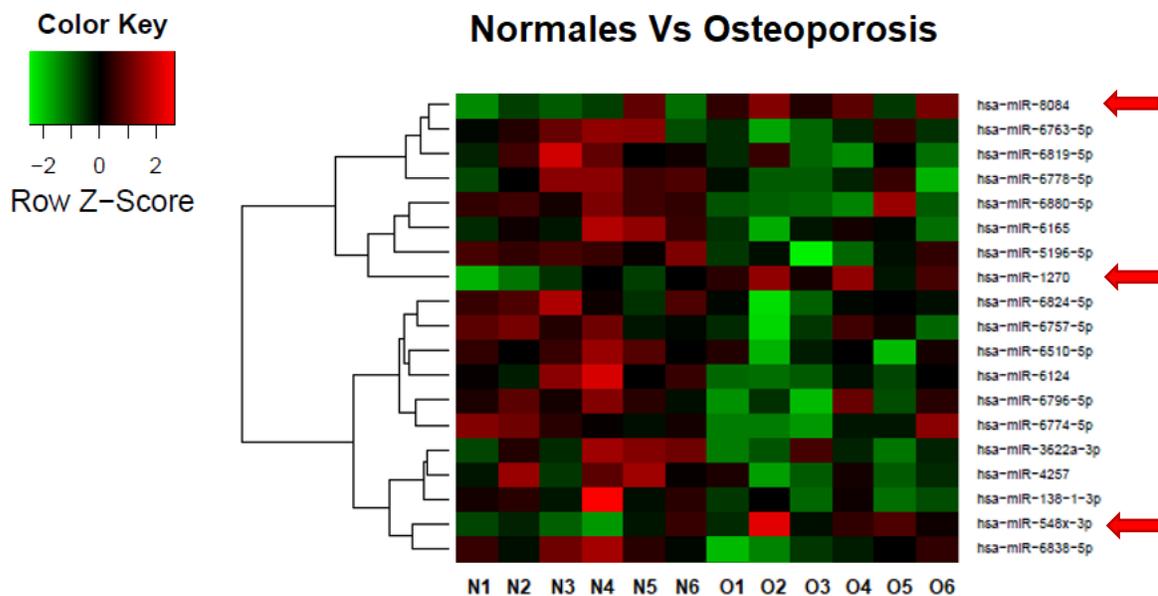


Figura 17.0. Mapa de calor. Se muestran representados con color rojo los valores que se encontraron como sobre expresados y en verde los valores que se encontraron sub expresados en cada grupo. Se observa que en el grupo de osteoporosis se encuentran sobre expresados 3 miRNAs principales miR-8084, miR-1270 y miR-548x-3p.

MiRNAs diferencialmente expresados entre el grupo normal vs osteoporosis.

De acuerdo al perfil de miRNAs obtenidos como diferencialmente expresados del GeneChip miRNA 4.0. No se encontró ningún miRNA asociado al metabolismo óseo previamente reportado. Esto posiblemente al número de muestras con el que se realizó este estudio. Sin

embargo, se reportan tres nuevos miRNAs asociados al metabolismo óseo que podrían tener un papel como potenciales marcadores para la detección temprana de esta enfermedad. En la figura 18.0 se muestran graficados los miRNAs miR-1270, miR-548x-3p y miR-8084 como altamente expresados en el grupo de osteoporosis con un valor de p estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y un valor de Fold-Change > 0.5 .

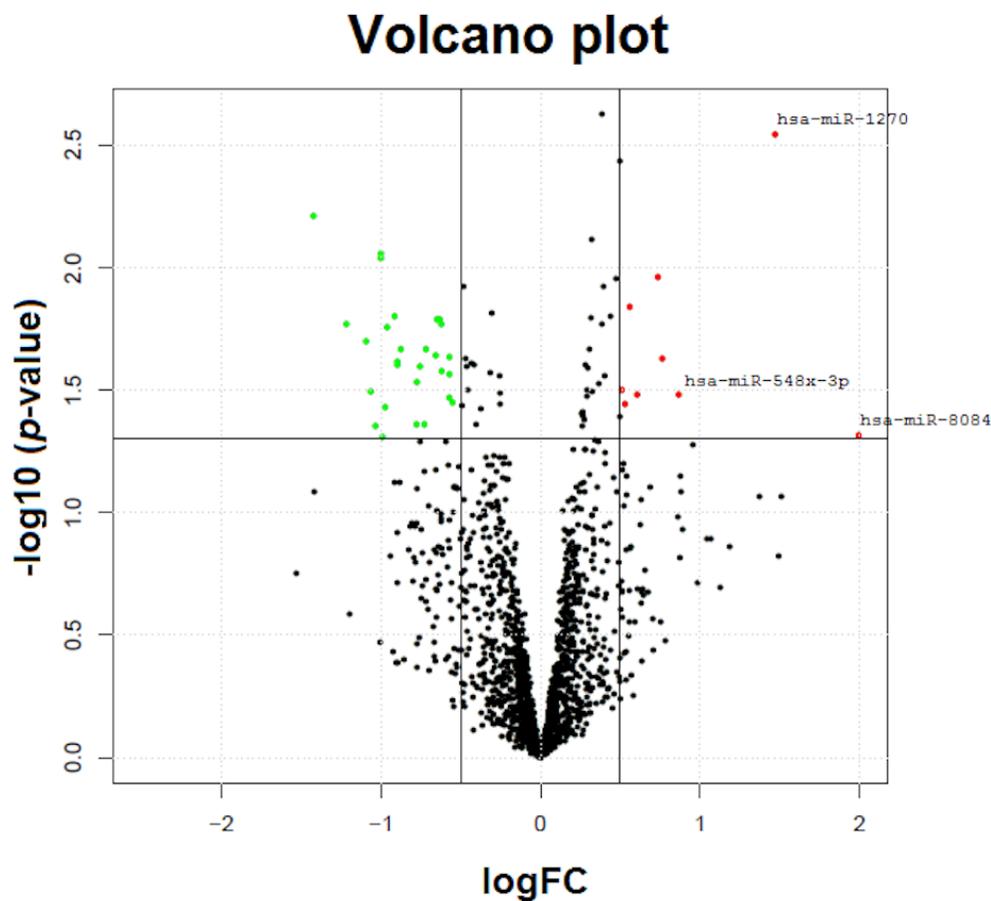


Figura 18.0. Volcano plot de los miRNAs diferencialmente expresados evaluados del análisis de microarreglos en monocitos circulantes de mujeres posmenopáusicas normales y con osteoporosis. El eje Y indica el \log_{10} correspondiente al p-value y eje X correspondiente al Fold-Change (calculado como \log_2 transformado en proporción de expresión entre ambos grupos experimentales).

La tabla 7.0 muestra los 3 miRNAs que fueron sobre-expresados (miR-1270, miR-548x-3p y miR-8084) en el grupo de osteoporosis. Las funciones de estos miRNAs son poco estudiadas y no existen reportes previos asociados con DMO u osteoporosis.

Tabla 7.0. MicroRNAs diferencialmente expresados entre el grupo normal y osteoporosis.

MicroRNA	Fold-Change	Valor-p
hsa-miR-8084	1.999	0.047
hsa-miR-1270	1.483	0.003
hsa-miR-548x-3p	0.861	0.034
hsa-miR-6165	-1.098	0.022
hsa-miR-6824-5p	-1.229	0.016
hsa-miR-6124	-1.427	0.006

Se muestran valores de Fold-Change y *p*-value.

Genes blancos predichos de miRNAs asociados a osteoporosis

El análisis bioinformático mostró 3,857 posibles genes blancos de miR-1270 presentes en al menos tres bases de datos, 1,129 para miR-548x-3p y 417 para miR-8084. Esta lista potencial de genes fue comparada con datos derivados del chip de expresión HGU133 plus 2.0 Affymetrix de monocitos de las mismas muestras que se encontraron sub expresados, asumiendo que se cumpla la prueba de concepto, es decir que si un miRNA se encuentra sobre-expresado su potencial gen blanco se encuentre sub-expresado. La sub-expresión fue definida como un mínimo de < 0.5 de Fold-Change. Usando estos criterios 330 genes putativos sub-expresados fueron identificados para estos 3 miRNAs. El análisis comparativo entre los genes blancos predichos y los genes sub-expresados obtenidos del microarreglo de expresión se muestran en la figura 19.0 A.

Redes de interacción de los genes blancos y los miRNAs

Para explorar la potencial asociación funcional de los miRNAs sub-expresados identificados en este estudio, la lista de los 330 genes blancos fue sometida a la herramienta bioinformática STRING para identificar vías de señalización canónicas. El análisis reveló 16 vías de señalización KEGG sobre-representadas por monocitos osteoclastos y genes relacionados a osteoporosis. Las vías de señalización más enriquecidas para los tres miRNAs son: Quimosina, RAS, PI3K-Akt, Estrógeno, MAPK, AMPK, Insulina, FoxO, Adhesión focal, mTOR, Diferenciación de osteoclastos, ErbB, Wnt, Jak-STAT y NF-kB (Figura 19.0 B).

A

Diagrama de Venn

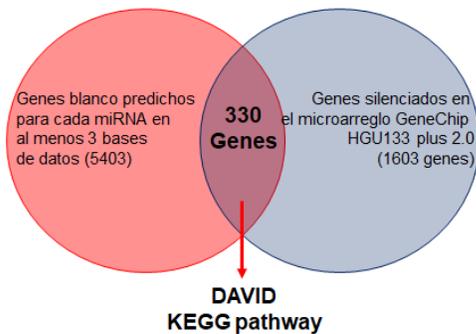
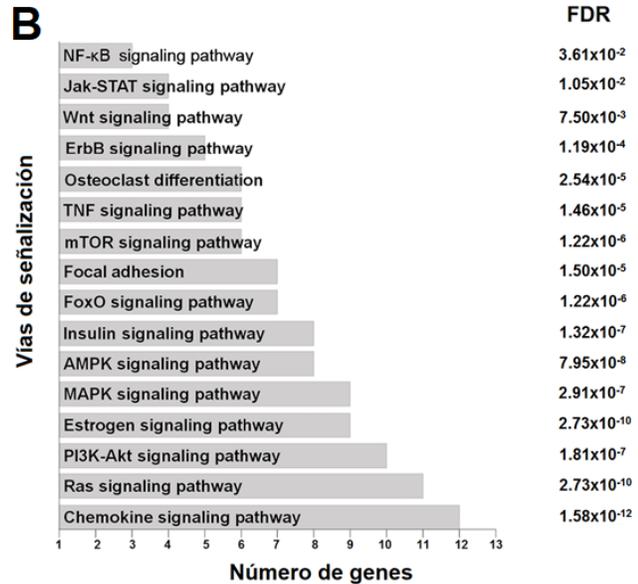
**B**

Figura 19.0. A) Diagrama de Venn. Muestra la base para seleccionar los genes blancos potenciales de los miRNAs miR-1270, miR-548x-3p y miR-8084. Se muestra el análisis comparativo entre los genes blancos predichos y los genes sub-expresados del microarreglo de expresión. B) El análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG de los miRNAs y sus potenciales genes blancos muestran 16 vías de señalización asociadas a metabolismo óseo, osteoclastos y osteoporosis.

Los genes blancos asociados con estas vías de señalización fueron analizados por el software IPA para construir una red de interacción entre los miRNAs miR-1270, miR-548x-3p, miR-8084 y sus respectivos genes blancos. El análisis reveló que miR-1270 presenta interacción con 35 genes blancos, miR-548x-3p con 21 genes blancos y miR-8084 con 5 que se unen a las regiones 3'UTR de 57 potenciales genes blanco (Figura 20.0). Es importante mencionar que un miRNA puede regular a más de un gen blanco y esto se observa en la red de interacción.

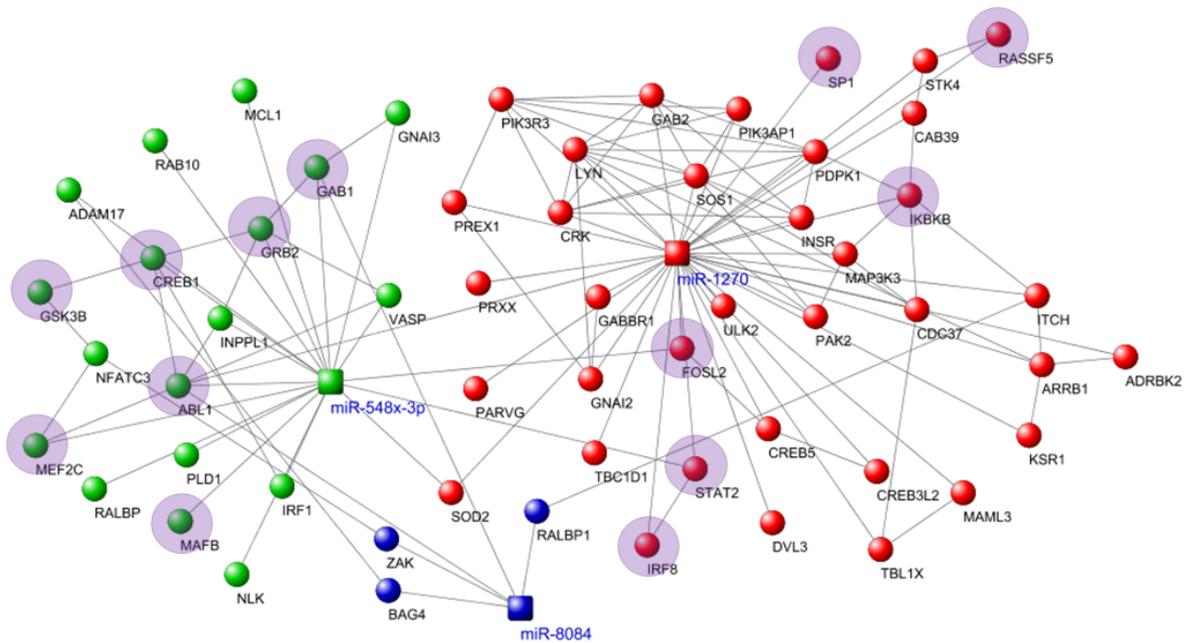


Figura 20.0. Red de interacción de los miRNAs miR-1270, miR-548x-3p y miR-8084 y sus genes blancos. Estos datos revelan la interacción de 57 genes blancos con los tres miRNAs los círculos morados indican los genes asociados al remodelado óseo, *STAT2*, *IRF8*, *RASSF5*, *SP1*, *FOSL2*, *IKBKB*, *ABL1* y *MEF2C*.

Predicción y verificación de genes blancos

El análisis bioinformático en KEGG pathway empleado para formar la red de interacción de los miRNAs con sus respectivos genes blancos y una búsqueda en la literatura, mostró que al menos 9 genes que participan en estas vías de señalización están fuertemente asociados al metabolismo óseo y son blancos de miR-1270. Estos genes incluyen al factor potenciador de miocitos 2C (*MEF2C*), Factor de transcripción Sp1 (*SP1*), Transductor de señal y activador de la transcripción 2 (*STAT2*), FOS Like 2 (*FOSL2*), Inhibidor del factor nuclear del potenciador del gen del polipéptido ligero kappa en células B (*IKBKB*), Dominio de asociación Ras miembro de la familia 5 (*RASSF5*), protooncogén 1, tirosina quinasa no receptora (*ABL1*), Factor regulador de interferón 8 (*IRF8*) y de acuerdo a la literatura el Proto-oncogen GTPasa KRAS (*KRAS*). De acuerdo al análisis del microarreglo de expresión HGU133 plus 2.0 y la validación por RT-qPCR se observó que estos genes presentan bajo nivel de expresión en el grupo de individuos con osteoporosis (Figura 21.0).

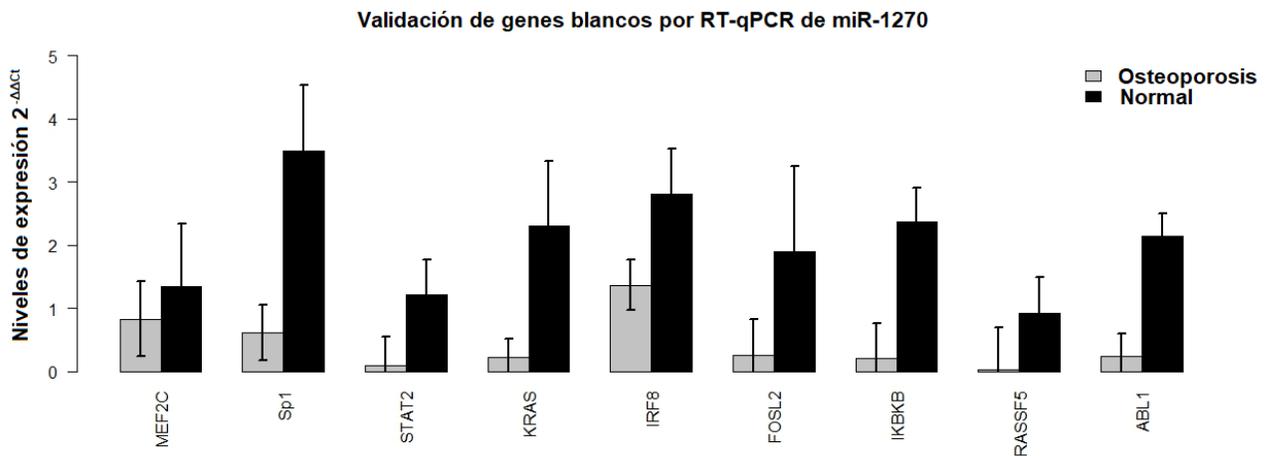


Figura 21.0. Niveles de expresión de los genes blancos de miR-1270: *MEF2C*, *SP1*, *STAT2*, *KRAS*, *IRF8*, *FOSL2*, *IKBKB*, *RASSF5* y *ABL1* en monocitos circulantes de sangre periférica de mujeres posmenopáusicas del grupo normal y con osteoporosis. Todos los valores de $p < 0.05$.

En el análisis bioinformático también se encontró que los genes: Oncogén homólogo del fibrosarcoma musculoponeurótico v-maf (*MafB*), Glucógeno sintasa quinasa 3 beta (*GSK3 β*), Transductor de señal y activador de la transcripción 2 (*STAT2*), FOS Like 2 (*FOSL2*) y homólogo al de la leucemia murina de Abelson (*ABL1*) son blancos de miR-548x-3p y de acuerdo a la literatura tienen un papel importante en el metabolismo óseo, osteoclastos y osteoporosis (Figura 22.0).

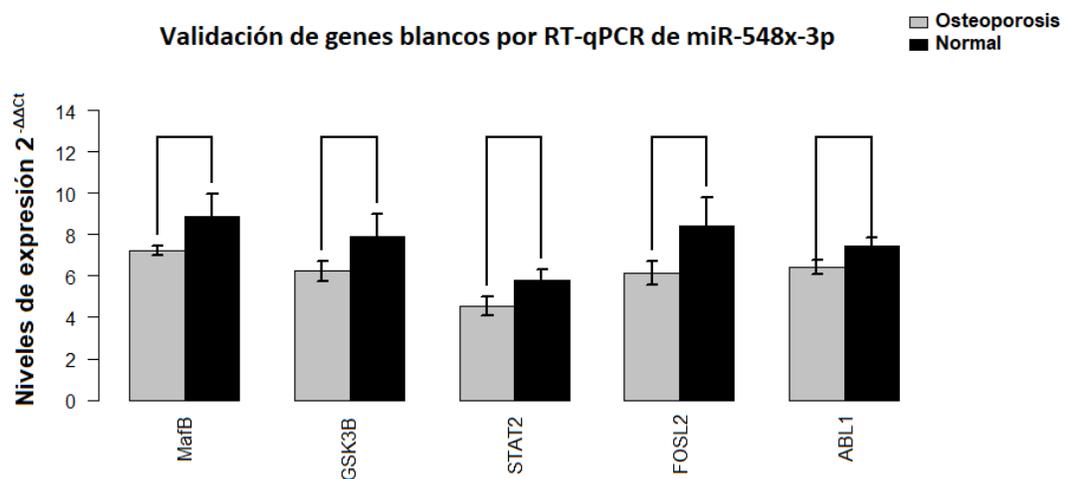


Figura 22.0. Niveles de expresión de los genes blancos de miR-548x-3p: *MafB*, *GSK3 β* , *STAT2*, *FOSL2* y *ABL1* en monocitos circulantes de sangre periférica de mujeres posmenopáusicas del grupo normal y con osteoporosis. Todos los valores de $p < 0.05$.

Validación de los niveles de expresión de miR-1270 por RT-qPCR

La RT-qPCR fue realizada para validar los niveles de expresión diferencial de los tres miRNAs sobre-expresados (miR-8084, miR-1270 y miR-548x-3p). Solo miR-1270 demostró una sobre-regulación significativa en el grupo de osteoporosis comparado con el grupo normal ($p= 0.0043$) (Figura 23.0).

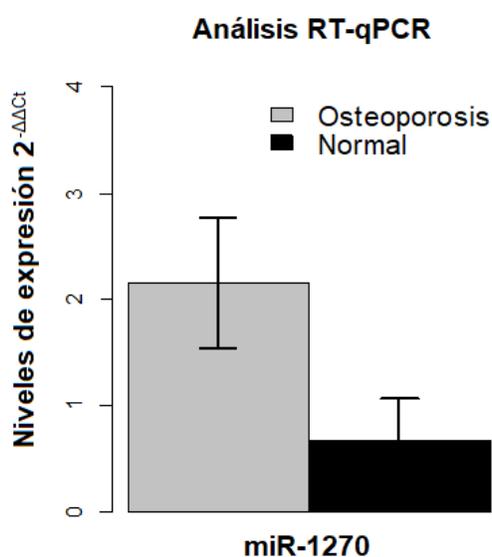


Figura 23.0. Niveles de expresión de miR-1270 en monocitos circulantes humanos de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis revelados por transcripción inversa y PCR cuantitativa. Los datos son presentados como media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. $p= 0.0043$.

Sitios de unión de los miRNAs con sus genes blancos

El análisis bioinformático para la búsqueda de posibles genes blanco mostró aquellos genes que son regulados por sus respectivos miRNAs y están presentes en más de tres bases de datos. Es importante mencionar que algunos de estos genes pueden presentar más de un sitio de unión para un mismo miRNA en la región 3'UTR. En la tabla 8.0 se muestran los genes blancos de miR-1270 con el mejor sitio de unión de acuerdo al score de la base de datos microRNA.org.

Tabla 8.0. Sitios de unión putativos de miR-1270 en genes blanco predichos de humano.

Gen Blanco	Posición 3'-UTR	Región semilla	PhastCons score
KRAS	2011	3' ugUGUCGA-GA-AGGUUAUAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 5' uuACUGCUGCUGUGGAUAUCUCCau 3' KRAS	0.5726
FOSL2	604	3' ugUGUCGA--GAAGGUA-UAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 : : 5' ugACGCCUCCCAGUCAUCAUCUCCAg 3' FOSL2	0.5389
MEF2C	1948	3' ugugUCGAGA-AGGUA--UAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 5' gugaAGAUCUGUCGAUUCAUCUCCaA 3' MEF2C	0.6563
IRF8	1185	3' ugUGUCGAGAAGGUUAUAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 : : 5' caAUAG-GCUU--GAAUCUCCaA 3' IRF8	0.5677
SP1	2254	3' uguGUCGAGAAGGUUAUAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 : 5' cucCAUUUGGUCC-UUUCUCCAc 3' SP1	0.6502
IKBKB	454	3' uguGUCGAGA-AGGUAUAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 : 5' agcCUGUCCUCUCCUGCUCUCCaA 3' IKBKB	0.5335
RASSF5	597	3' ugugUCGA--GAAGGUAUAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 : 5' cugaGGCUGGCUCAGAGAUCUCCAg 3' RASSF5	0.4772
ABL1	396	3' ugugucGAGAAGGUUAUAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 : 5' gccuccUUCUCCACUUCUCCaA 3' ABL1	0.4373
STAT2	704	3' ugugucgaGAAGGUUAUAGAGGUc 5' hsa-miR-1270 : 5' aguuuagUCUACCUAGUCUCCAc 3' STAT2	0.5894

Ensayo de gen reportero

Las secuencias de los miRNAs miR-1270 y miR-548x-3p fueron clonadas en el vector pcDNA 6.2 (Figura 24.0) y la región 3'UTR del gen blanco *IRF8* con el sitio de unión complementario para miR-1270, fue clonada dentro del vector pmiR-target que contiene al gen reportero de luciferasa (Figura 25.0). También se obtuvo la construcción de la mutante de *IRF8* que contenía mutaciones en 3 nucleótidos en el sitio de unión del miR-1270 dentro de la región 3'UTR.

Los ensayos de gen reportero se realizaron en la línea celular establecida Saos-2 con miR-1270. Se compararon los niveles de expresión de la construcción pmiR-*IRF8* que contenía la mutación (pmiR-*IRF8*-mut) con la construcción sin la mutación (pmiR-*IRF8*), observando que los niveles de expresión de luciferasa aumentan significativamente en esta última con respecto a la que presenta la mutación. En la figura 26.0 **A** se muestra el sitio de unión a miR-1270 dentro de la región 3'UTR de la construcción pmiR-*IRF8* y el sitio de unión a miR-1270 con la mutación dentro de la región 3'UTR de la construcción pmiR-*IRF8*-mut.

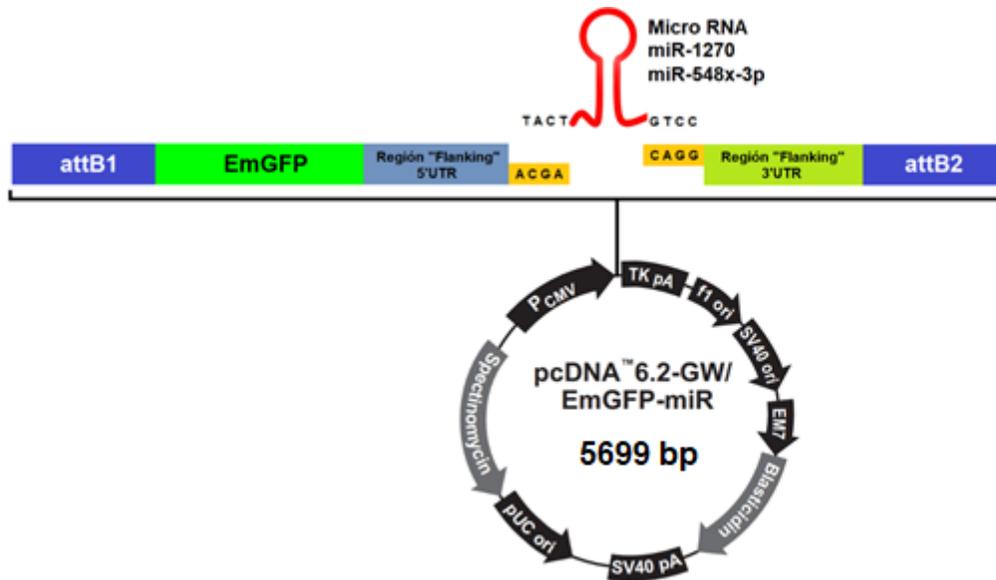


Figura 24.0. Construcción de las secuencias de miRNAs en el vector pcDNA 6.2 GW/EmGFP. Se muestran los sitios "Flanking" de clonación del miRNA dentro del plásmido.

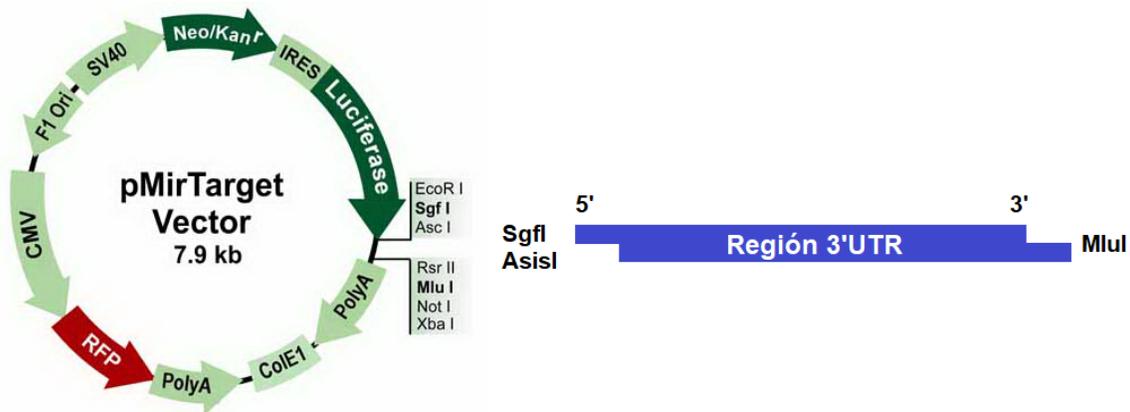


Figura 25.0. Construcción de la región 3'UTR del gen IRF8 en el vector pMIR-Target. Se muestran los sitios de clonación dirigida en los extremos de restricción SgfI en el extremo 5' y MluI en el extremo 3'.

En la figura 26.0 **B** se muestra que en la cotransfección con las construcciones pcDNA-miR-1270 y pmiR-*IRF8* disminuye drásticamente la actividad de luciferasa, mientras que la cotransfección con la construcción que contiene el sitio mutado recupera dicha actividad, demostrando que el microRNA miR-1270 puede reconocer el sitio de unión en la región 3'UTR de *IRF8* y de este modo controlar la expresión del gen reportero de luciferasa.

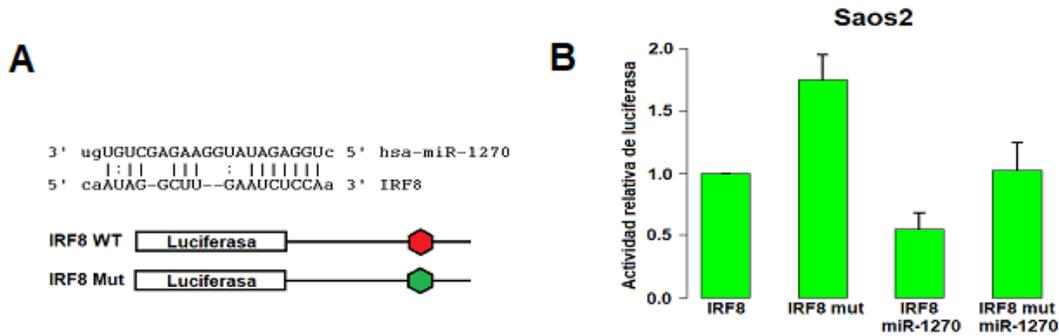


Figura 26.0. A) Se muestra el sitio de unión del microRNA miR-1270 con la región semilla de la región 3'UTR del gen *IRF8*, así como la región mutada la cual evita la unión entre el miRNA y la región 3'UTR. B) se observa la actividad de luciferasa en la co-transfección de las construcciones pcDNA-miR-1270 y pmiR-IRF8.

Ensayo MTT

Para evaluar la proliferación celular se utilizó el ensayo MTT. En la figura 27.0 A, se muestra la proliferación de línea celular Saos-2 y Saos-2 establecida con miR-1270. La línea celular Saos-2 muestra un incremento significativo después de 24 h, posteriormente se observa un ligero incremento en la proliferación después de 48 y 72 h respectivamente. Por otro lado, la línea celular Saos-2 establecida con miR-1270 muestra menor proliferación a las 24h con respecto a la línea no transfectada, posteriormente se observa un ligero incremento después de las 48 y 72h respectivamente. En la figura 27.0 B, se muestra la proliferación de la línea celular U-2OS y U-2OS establecida con miR-1270. Se puede observar que ambas líneas celulares incrementan su proliferación después de 24h a un nivel similar, después de las 48 y 72h solo se observa un ligero incremento en la proliferación, pero sin presentar diferencias significativas entre ambas líneas.

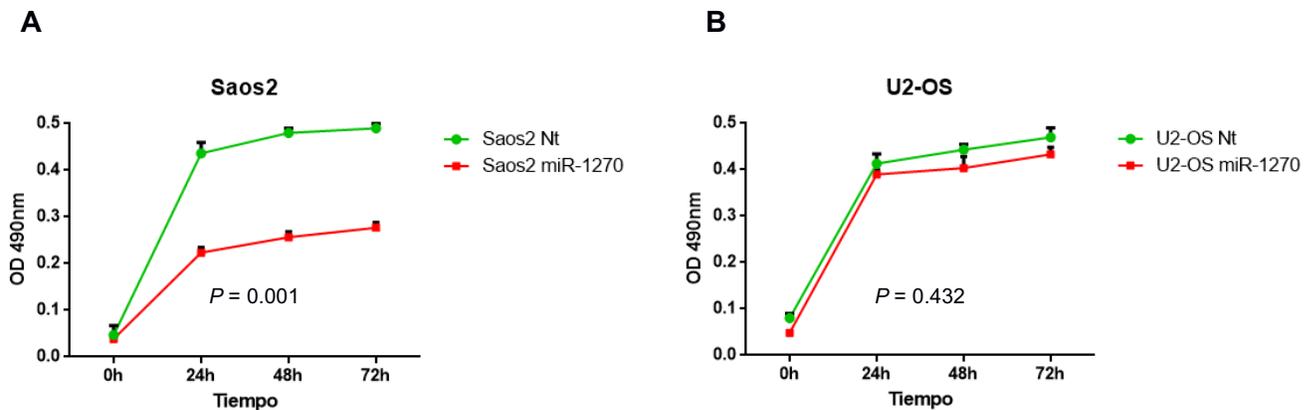


Figura 27.0. Ensayo MTT. A) La gráfica muestra la proliferación de la línea celular Saos-2 y Saos-2 establecida con miR-1270 después de 24, 48 y 72 h. B) En la gráfica se muestra que no existe diferencias significativas en la proliferación de la línea celular U-2OS y U-2OS establecida con miR-1270.

El mismo ensayo de MTT fue utilizado para evaluar la proliferación celular de las líneas celulares Saos-2 y Saos-2 establecida con miR-548x-3p. En la figura 28.0 A, se muestra que la proliferación de línea celular Saos-2 incrementa después de 24h y mantiene un ligero aumento después de 48 y 72h. Por otro lado, la línea celular Saos-2 establecida con miR-548x-3p muestra un incremento en la proliferación después de las 24h muy similar al de la línea Saos-2. Sin embargo, después de 48 y 72h la proliferación se mantiene constante, pero en un 50% menos con respecto a la línea no establecida. En la Figura 28.0 B, se muestra la proliferación de la línea celular U-2OS y U-2OS establecida con miR-48x-3p. En la gráfica se puede observar que en la línea celular U-2OS hay un incremento en los niveles de proliferación mientras que en la línea celular U-2OS establecida con miR-548x-3p se muestra que el nivel de proliferación es la mitad con respecto a la línea no establecida y esta tendencia se mantiene después de 48 y 72 h.

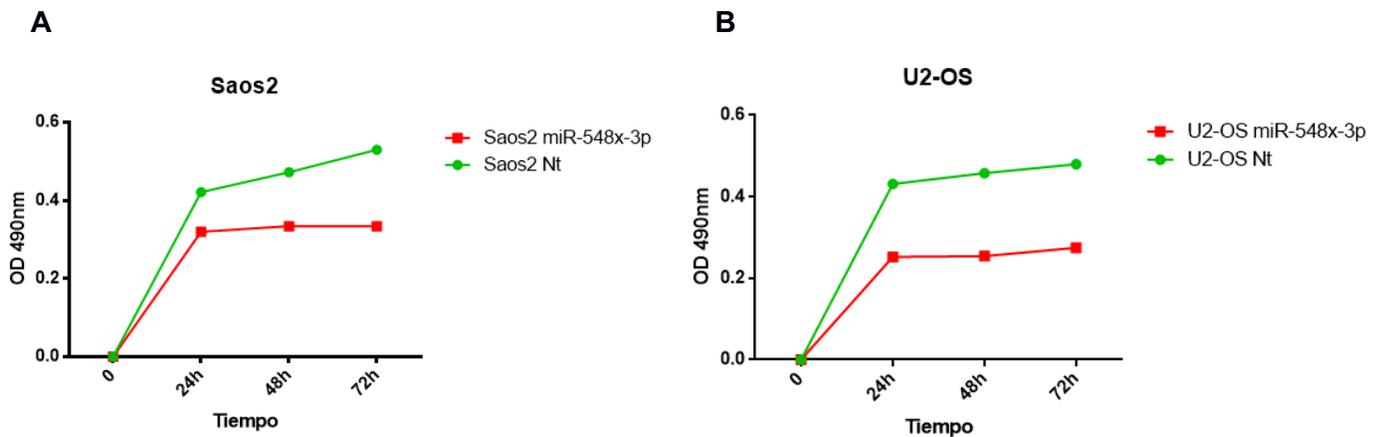


Figura 28.0. A) En la gráfica se muestra la proliferación de la línea celular Saos-2 y Saos-2 establecida con miR-548x-3p durante 24, 48 y 72 h. B) En la gráfica se muestra la proliferación en la línea celular U-2OS y U-2OS establecida con miR-548x-3p.

Ensayo de Herida

Para obtener información sobre los mecanismos moleculares asociados con la sobre expresión de miR-1270 y miR-548x-3p, investigamos si estos miRNAs pueden influir en moléculas de señalización asociadas a procesos de migración celular a través de un ensayo de herida. Los resultados de este ensayo muestran que la línea celular Saos-2 después de

24 h comienza a cicatrizar la herida y para las 48 h está completamente cicatrizada. Por otro lado, en la línea celular Saos-2 establecida con miR-1270 se observa que después de 24 h y 48 h la herida aun no cicatriza lo que sugiere un efecto del microRNA miR-1270 sobre procesos de migración celular (Figura 29.0).

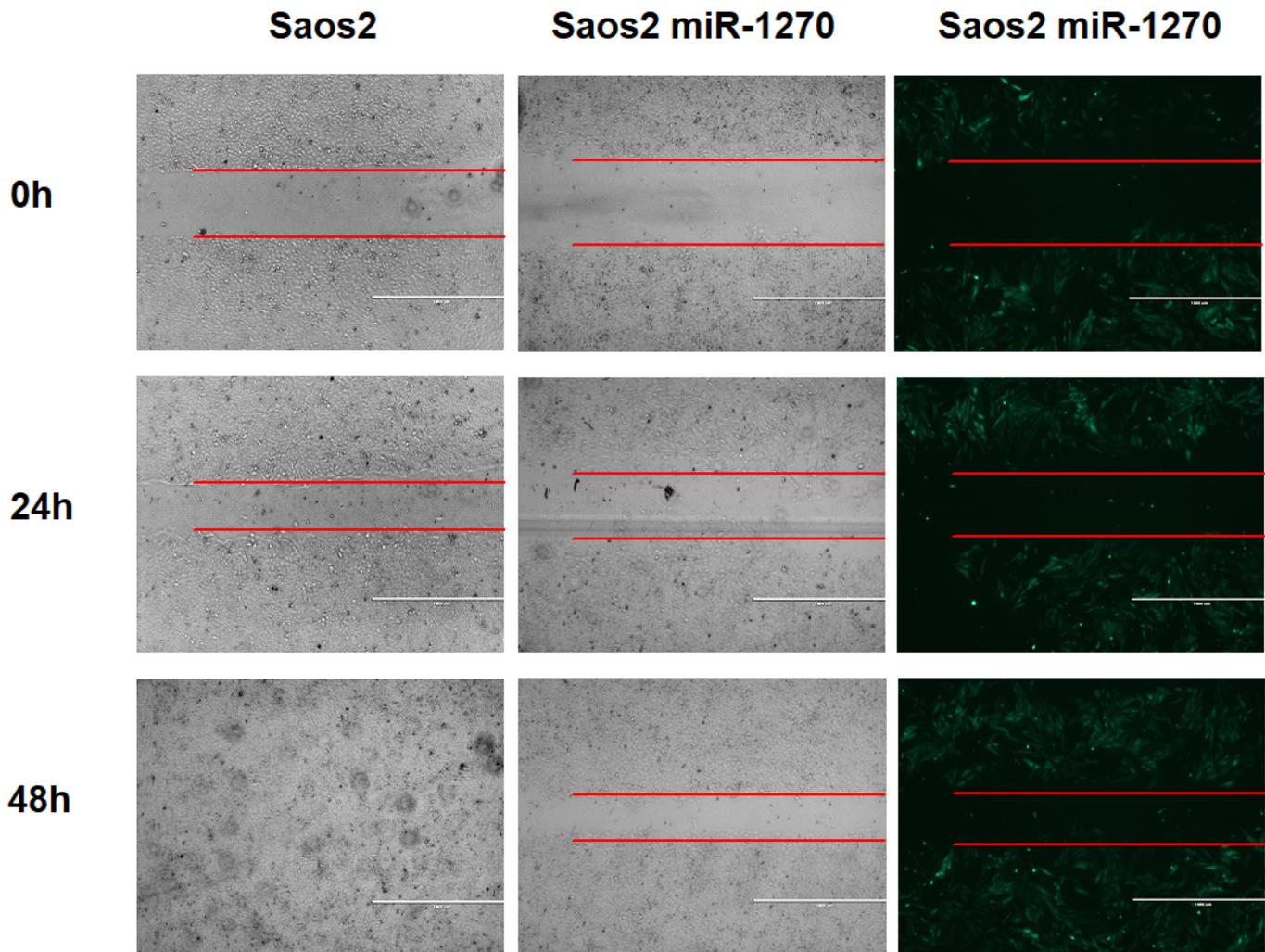


Figura 29.0. Ensayo de herida. Se muestra el ensayo de migración en la línea celular Saos-2 y Saos-2 establecida con miR-1270 en los tiempos 0, 24 y 48h.

El ensayo de herida en la línea celular U-2OS y U-2OS establecida con miR-1270 mostró que después de 24h la herida comienza a cerrar significativamente y a las 48h la herida esta completamente cicatrizada. Estos datos sugieren que el microRNA miR-1270 podría no tener efecto en mecanismos de migración celular en la línea U-2OS (Figura 30.0).

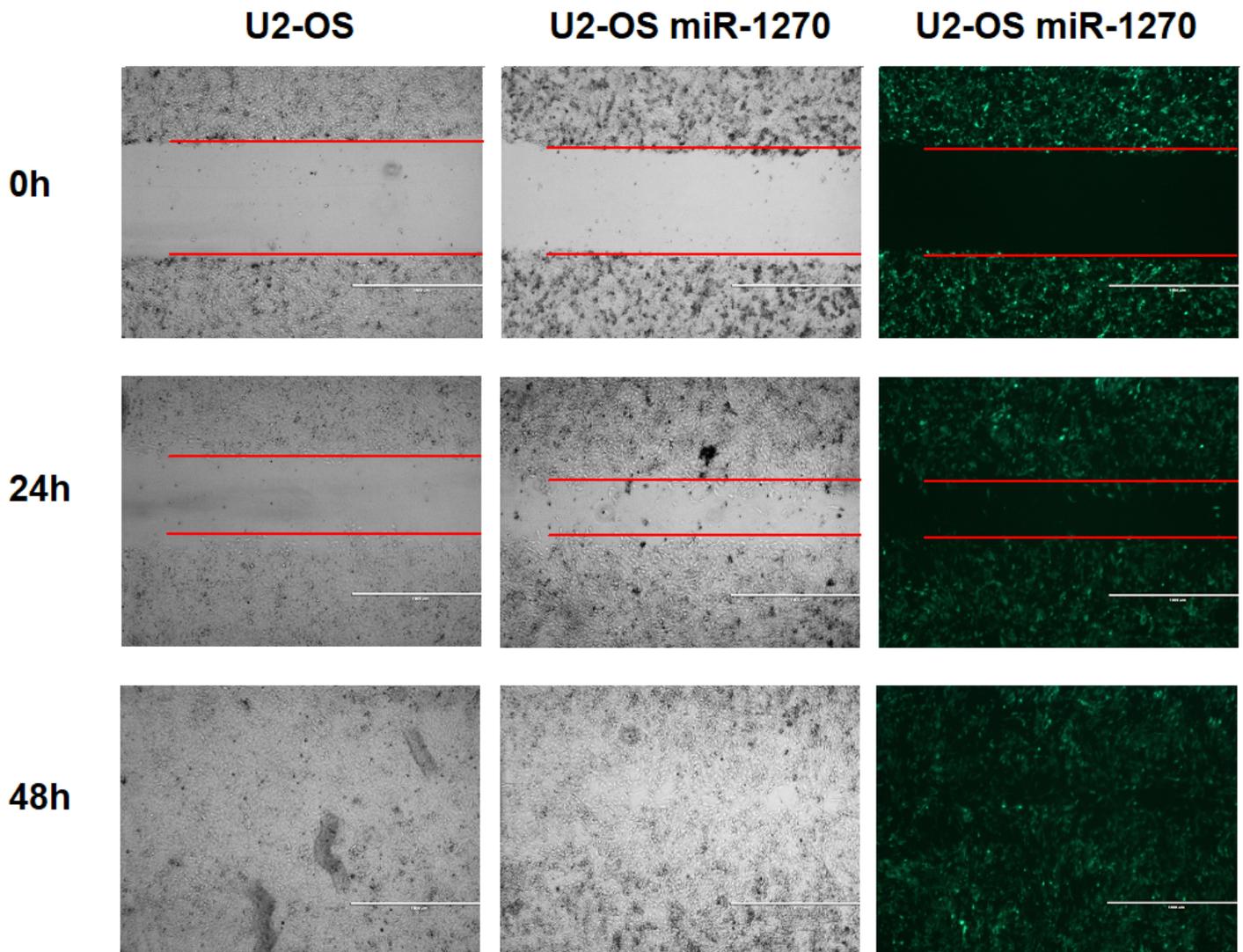


Figura 30.0. Ensayo de herida. Se muestra el ensayo de migración en la línea celular U-2OS y U-2OS establecida con miR-1270 en los tiempos 0, 24 y 48h.

El ensayo de herida con la línea celular Saos-2 y Saos-2 establecida con miR-548x-3p, muestra que la línea celular Saos-2 cicatriza considerablemente la herida y después de las 48h la herida se encuentra completamente cicatrizada. Por otro lado, la línea celular Saos-2 establecida con miR-548x-3p muestra que después de 24h y 48h la herida no cicatriza lo cual sugiere que el microRNA miR-548x-3p podría tener un efecto en la regulación de genes asociados a procesos de migración (Figura 31.0).

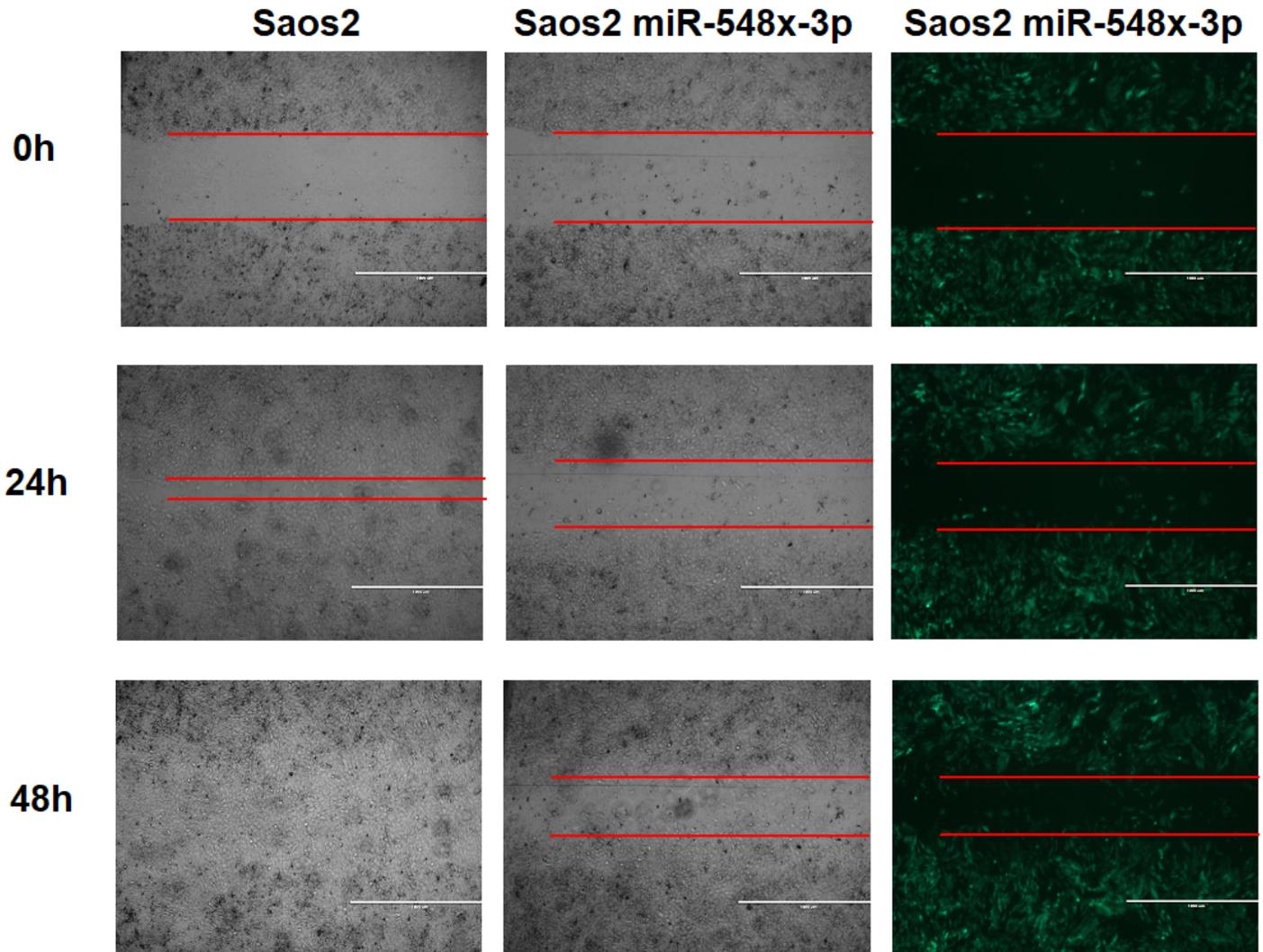


Figura 31.0. Ensayo de herida. Se muestra el ensayo de migración en la línea celular Saos-2 y Saos-2 establecida con miR-548x-3p en los tiempos 0, 24 y 48h.

El ensayo de herida con la línea celular U-2OS y U-2OS establecida con miR-548x-3p muestra que en ambas líneas la herida comienza a cicatrizar considerablemente a las 24h, después de las 48h la herida esta cicatrizada completamente, sugiriendo que el miR-548x-3p aparentemente no tiene efecto sobre genes asociados a procesos de migración celular al menos en la línea celular U-2OS (Figura 32.0).

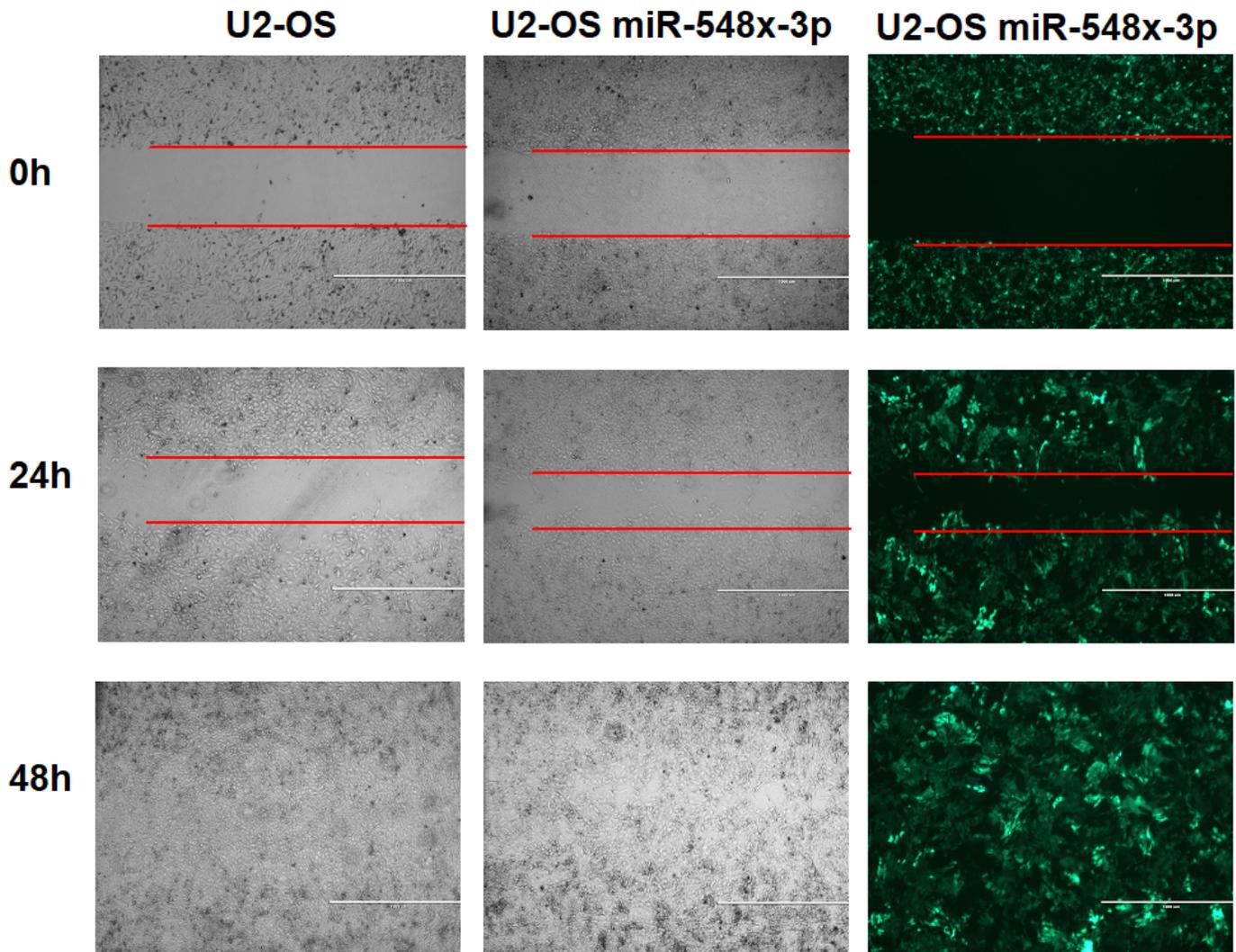


Figura 32.0. Ensayo de herida. Se muestra el ensayo de migración en la línea celular U-2OS y U-2OS establecida con miR-548x-3p en los tiempos 0, 24 y 48h.

Análisis de migración por el método de transwell

La habilidad de las células Saos-2 y U-2OS de migrar a través de una membrana porosa bajo la influencia de los miRNAs miR-1270 y miR-548x-3p fue evaluada mediante el ensayo transwell (R&D, Minneapolis, USA) de 12 pocillos provistos con una membrana de policarbonato con poros de 8µm (Corning, NY, USA).

En la figura 33.0 se muestra el ensayo de migración por transwell en la línea celular Saos-2 y Saos-2 miR-1270 donde las células se muestran teñidas de color violeta y son señalizadas por la flecha roja. Se puede observar que en la línea celular Saos-2 (Figura 33.0 A) hay una mayor actividad de migración comparadas con la línea celular establecida Saos-2 miR-1270 (Figura 33.0 B) Una prueba de t-student fue utilizada para comparar las medias de ambos experimentos encontrando un valor de $p < 0.001$ (Figura 33.0 C).

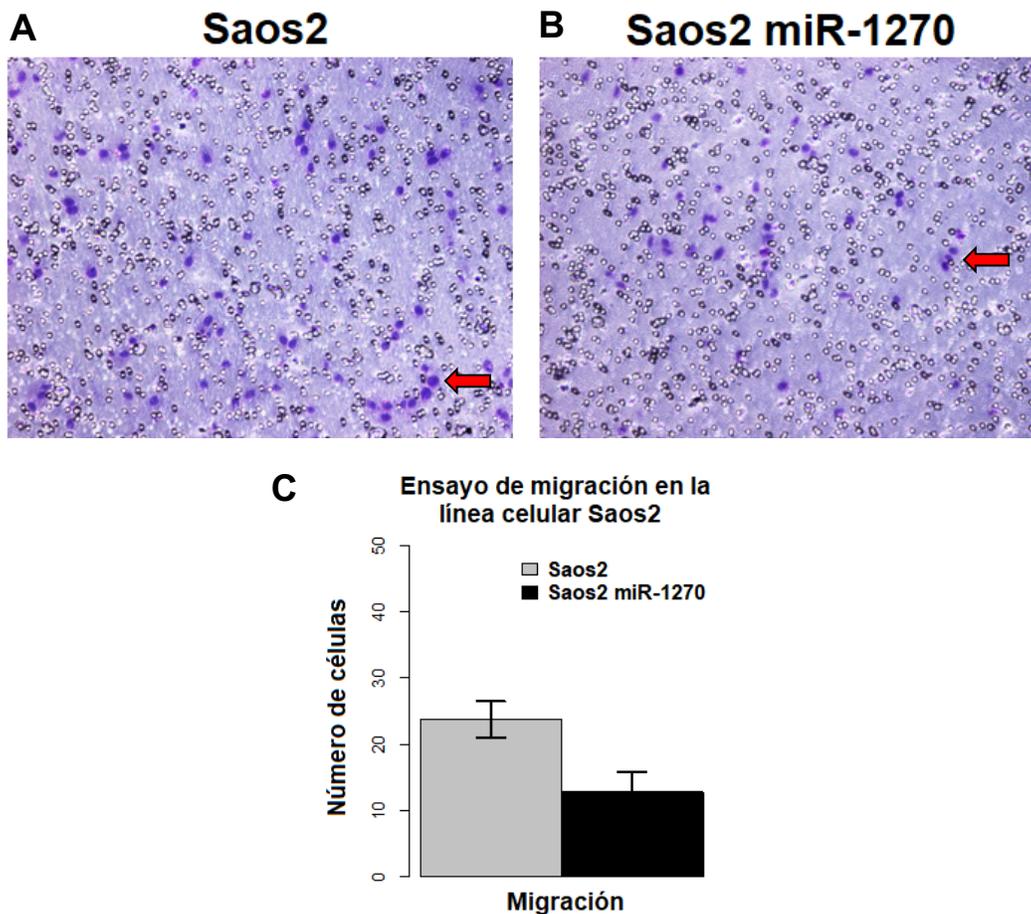


Figura 33.0. Ensayo de migración por transwell. A) Se muestra la capacidad de migración de la línea celular Saos-2 a través de la membrana. B) Se muestra la capacidad de migración de la línea celular Saos-2 miR-1270 a través de la membrana. C) Se muestran las diferencias estadísticas entre el promedio de células Saos-2 con respecto a la línea establecida Saos-2 miR-1270. Las flechas rojas muestran las células teñidas de violeta.

En la figura 34.0 se muestra el ensayo de migración por transwell de la línea celular U-2OS y U-2OS miR-1270 donde las células se muestran teñidas de color violeta y son señalizadas por la flecha roja. Se puede observar que en la línea celular U-2OS (Figura 34.0 A) no existen diferencias con respecto a la línea celular establecida U-2OS miR-1270 (Figura 34.0 B). Una prueba de t-student fue utilizada para comparar los promedios de las células en ambos experimentos encontrando un valor de $p = 0.822$ por lo que, no existen diferencias estadísticas entre ambas líneas celulares (Figura 33.0 C).

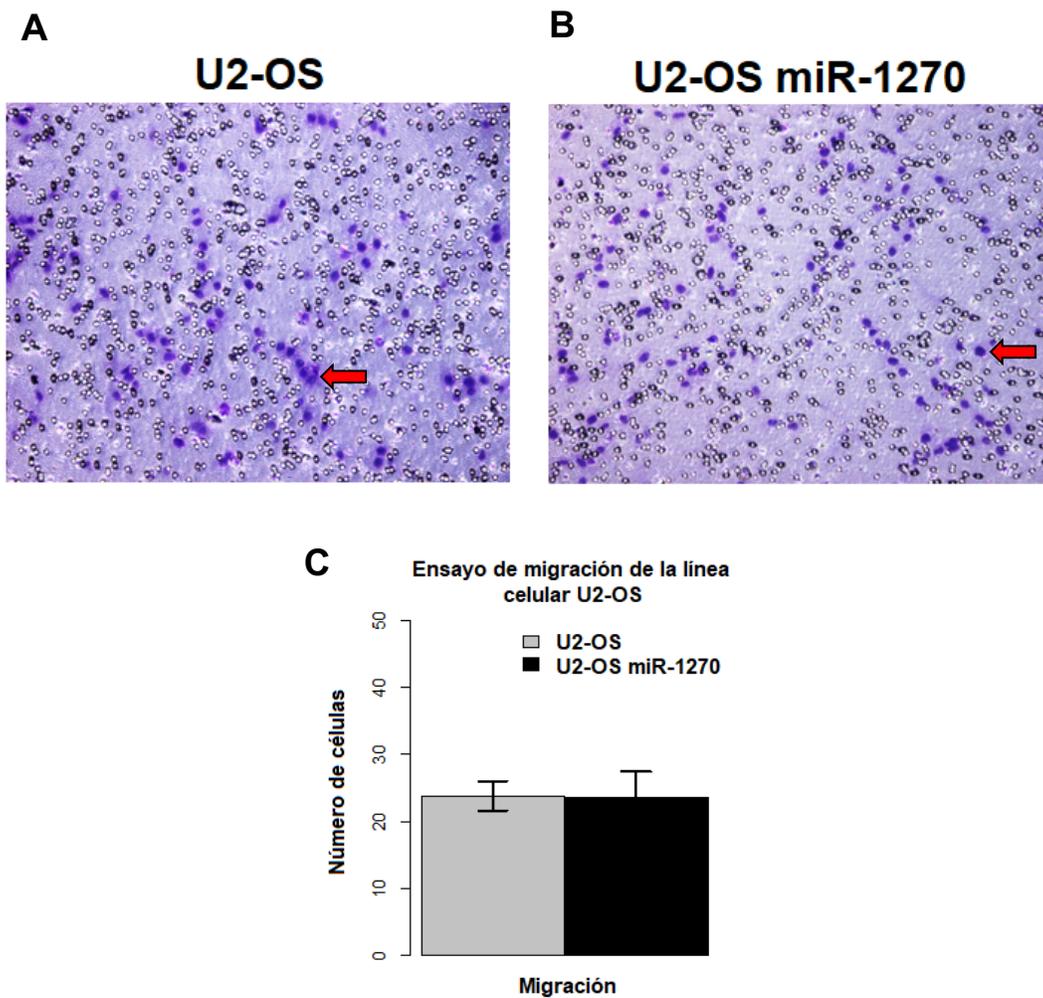


Figura 34.0. Ensayo de migración por transwell. A) Se muestra la capacidad de migración de la línea celular U-2OS a través de la membrana. B) Se muestra la capacidad de migración de la línea celular U-2OS miR-1270 a través de la membrana. C) Se muestran las diferencias estadísticas entre el promedio de células U-2OS con respecto a la línea establecida U-2OS miR-1270. Las flechas rojas muestran las células teñidas de violeta.

En la figura 35.0 se muestra el ensayo de migración por transwell de la línea celular Saos-2 y Saos-2 miR-548x-3p donde las células se muestran teñidas de color violeta y son señalizadas por la flecha roja. Se puede observar que en la línea celular Saos-2 (Figura 35.0 A) existe mayor índice de migración con respecto a la línea establecida Saos-2 miR-548x-3p (Figura 35.0 B), Sugiriendo que este miRNA podría regular a genes asociados a procesos de migración celular. Una prueba de t-student fue utilizada para comparar los promedios de las células en ambos experimentos encontrando un valor de $p > 0.0001$ confirmando que existen diferencias estadísticas entre los promedios de ambas líneas celulares (Figura 35.0 C).

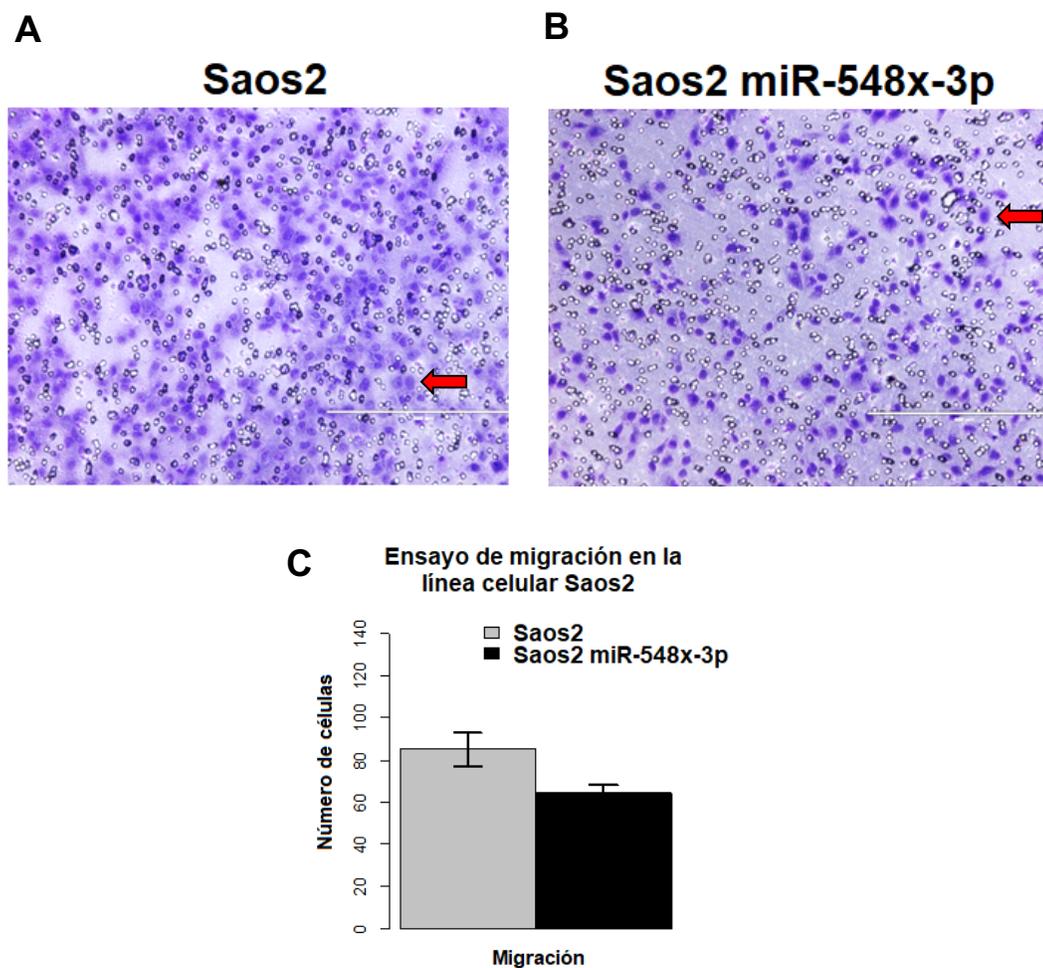


Figura 35.0. Ensayo de migración por transwell. A) Se muestra la capacidad de migración de la línea celular Saos-2 a través de la membrana. B) Se muestra la capacidad de migración de la línea celular Saos-2 miR-548x-3p a través de la membrana. C) Se muestran las diferencias estadísticas entre el promedio de células Saos-2 con respecto a la línea establecida Saos-2 miR-548x-3p. Las flechas rojas muestran las células teñidas de violeta.

En la figura 36.0 se muestra el ensayo de migración por transwell de la línea celular U-2OS y U-2OS miR-548x-3p donde las células se muestran teñidas de color violeta y son señalizadas por la flecha roja. Se puede observar que la línea celular U-2OS (Figura 36.0 A) presenta mayor capacidad de migración comparado con la línea celular establecida U-2OS miR-548x-3p (Figura 36.0 B). Una prueba de t-student fue utilizada para comparar los promedios de las células en ambos experimentos encontrando un valor de $p < 0.001$ por lo que, existen diferencias estadísticas entre ambas líneas celulares (Figura 36.0 C).

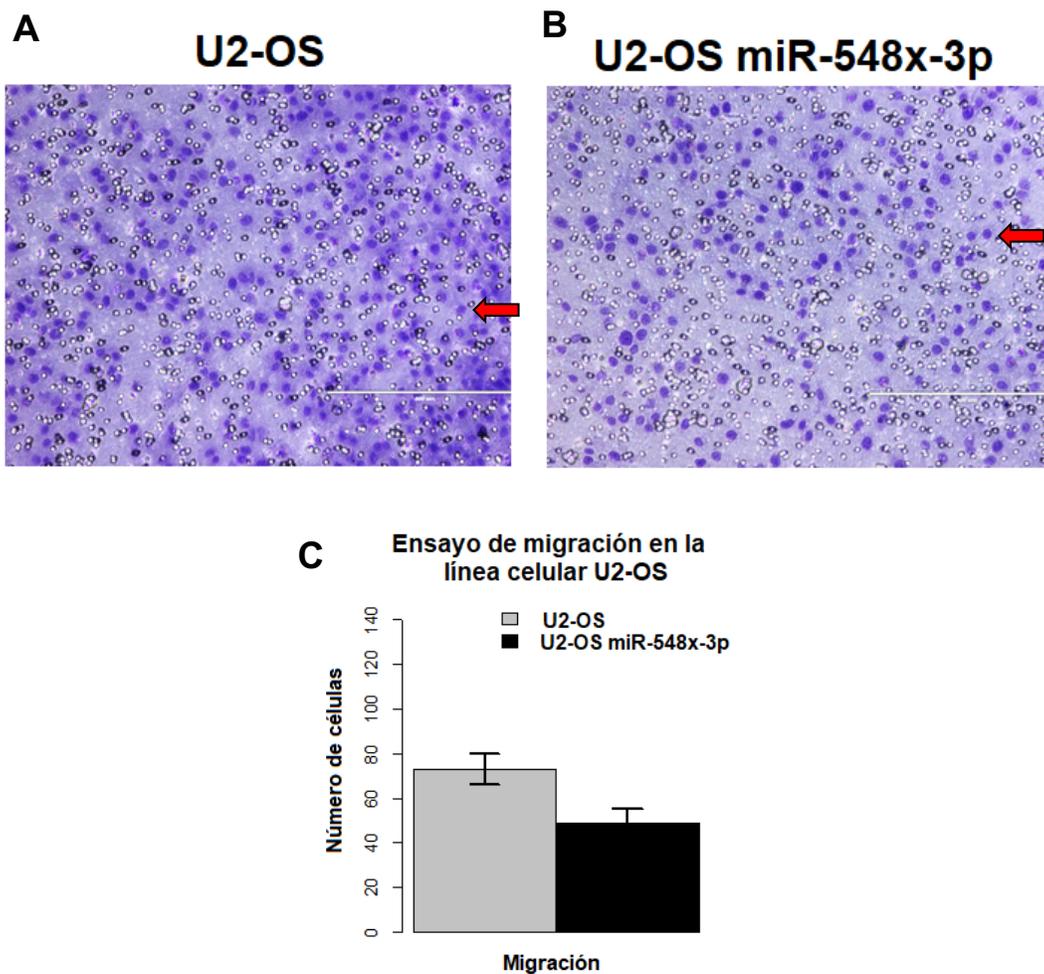


Figura 36.0. Ensayo de migración por transwell. A) Se muestra la capacidad de migración de la línea celular U-2OS a través de la membrana. B) Se muestra la capacidad de migración de la línea celular U-2OS miR-548x-3p a través de la membrana. C) Se muestran las diferencias estadísticas entre el promedio de células U-2OS con respecto a la línea establecida U-2OS miR-548x-3p. Las flechas rojas muestran las células teñidas de violeta.

Ensayos de invasión celular por transwell

Los ensayos de invasión celular fueron realizados con las líneas celulares Saos-2 y U-2OS siguiendo el mismo protocolo que en el ensayo de migración, con la diferencia de que la membrana porosa de los transwell esta recubierta por una capa de membrana basal que simula el ambiente del tejido conjuntivo. En la figura 37.0 se muestra que la capacidad de invasión de la línea celular Saos-2 (Figura 37.0 A) es mayor a la línea celular Saos-2 miR-1270 (Figura 37.0 B). Una prueba de t-student fue utilizada para comparar los promedios de células en ambos experimentos encontrando un valor de $p < 0.001$ por lo que, existen diferencias estadísticas entre ambas líneas celulares (Figura 37.0 C).

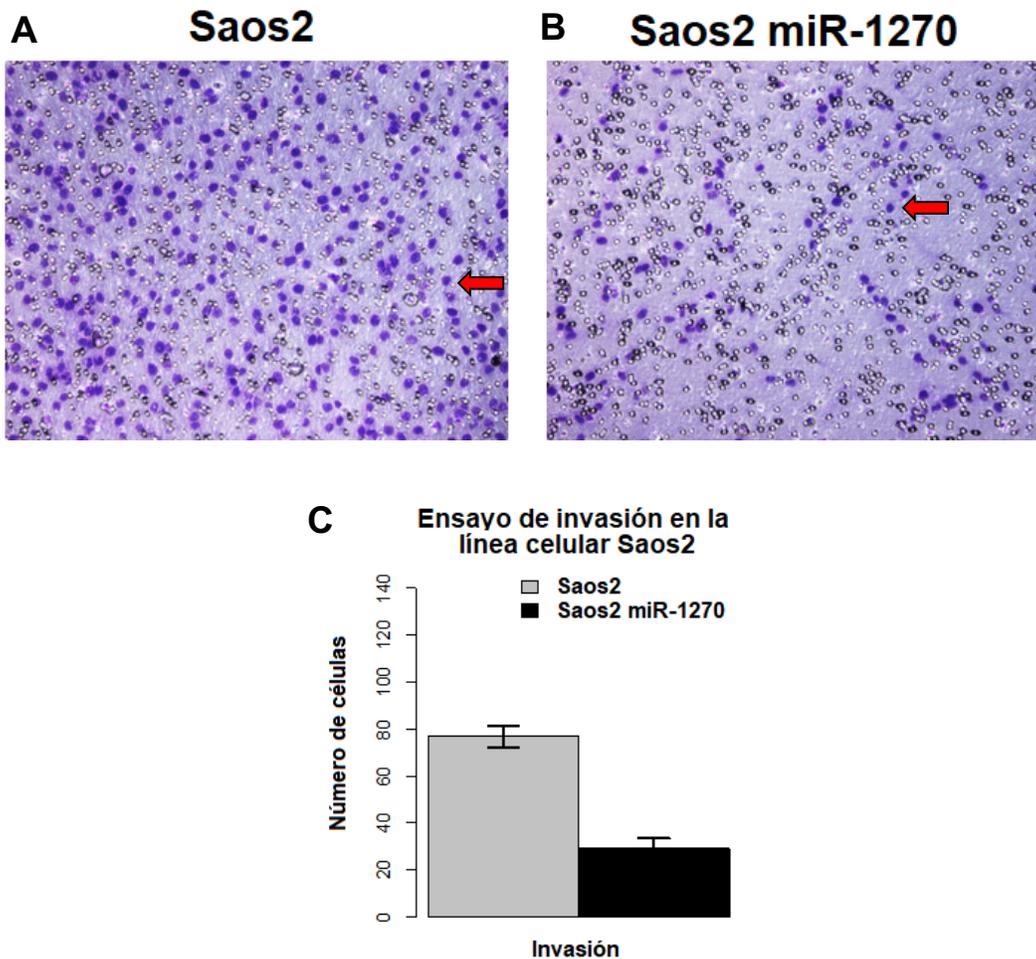


Figura 37.0. Ensayo de Invasión por transwell. A) Se muestra la capacidad de invasión de la línea celular Saos-2 a través de la matriz. B) Se muestra la capacidad de invasión de la línea celular Saos-2 miR-1270 a través de la matriz. C) Se muestran las diferencias estadísticas entre el promedio de células Saos-2 con respecto a la línea establecida Saos-2 miR-1270. Las flechas rojas muestran las células teñidas de violeta.

En la figura 38.0 se muestra el ensayo de invasión por transwell de la línea celular U-2OS y U-2OS miR-1270 donde las células se muestran teñidas de color violeta y son señalizadas por la flecha roja. Se puede observar que en la línea celular U-2OS (Figura 38.0 A) hay mayor actividad de invasión que en la línea U-2OS miR-1270 (Figura 38.0 B). Una prueba de t-student fue utilizada para comparar los promedios de las células en ambos experimentos encontrando un valor de $p < 0.001$ por lo que existen diferencias estadísticas entre ambas líneas celulares (Figura 38.0 C).

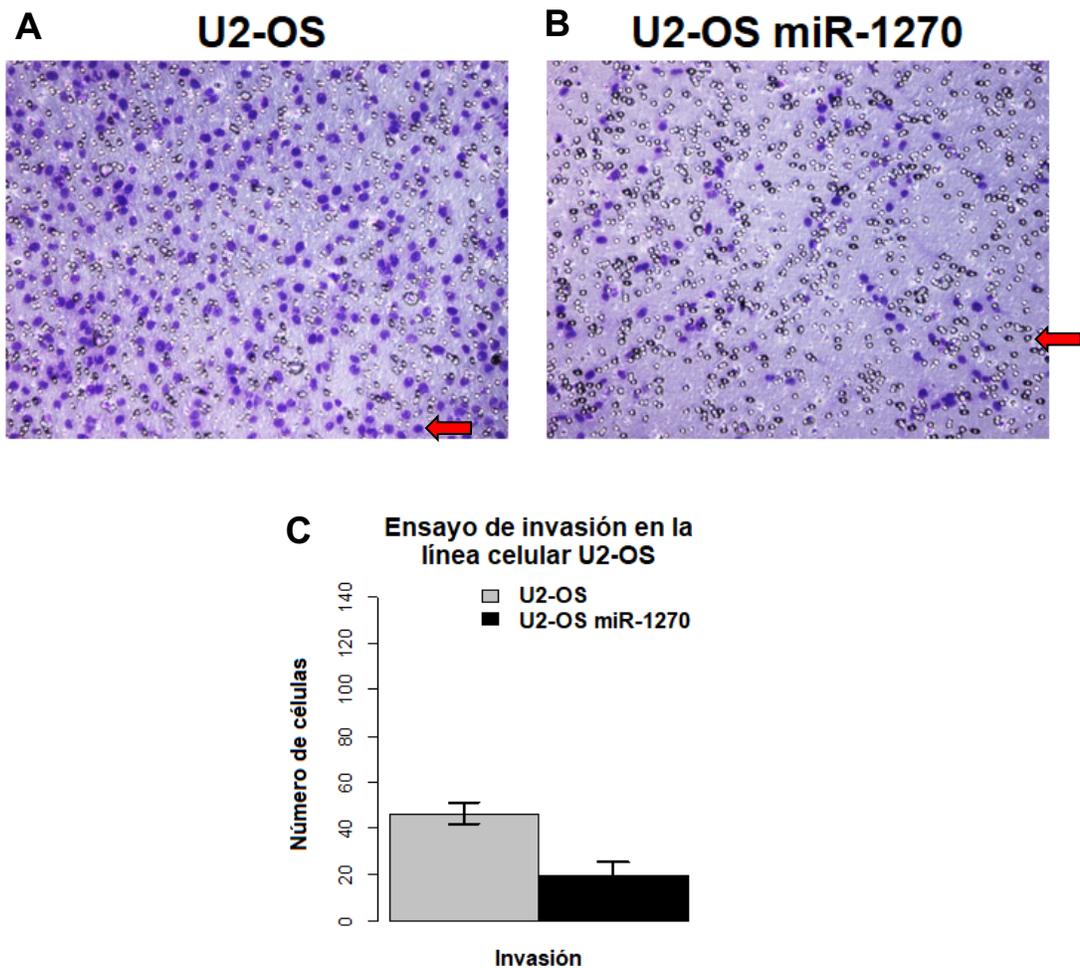


Figura 38.0. Ensayo de invasión por transwell. A) Se muestra la capacidad de invasión de la línea celular U-2OS a través de la matriz. B) Se muestra la capacidad de invasión de la línea celular U-2OS miR-1270 a través de la matriz. C) Se muestran las diferencias estadísticas entre el promedio de células U-2OS con respecto a la línea establecida U-2OS miR-1270. Las flechas rojas muestran las células teñidas de violeta.

En la figura 39.0 se muestra que la capacidad de invasión de la línea celular Saos-2 (Figura 39.0 A) es mayor a la línea celular Saos-2 miR-548x-3p (Figura 39.0 B). Una prueba de t-student fue utilizada para comparar los promedios de células en ambos experimentos encontrando un valor de $p < 0.001$ por lo que, existen diferencias estadísticas entre ambas líneas celulares (Figura 39.0 C).

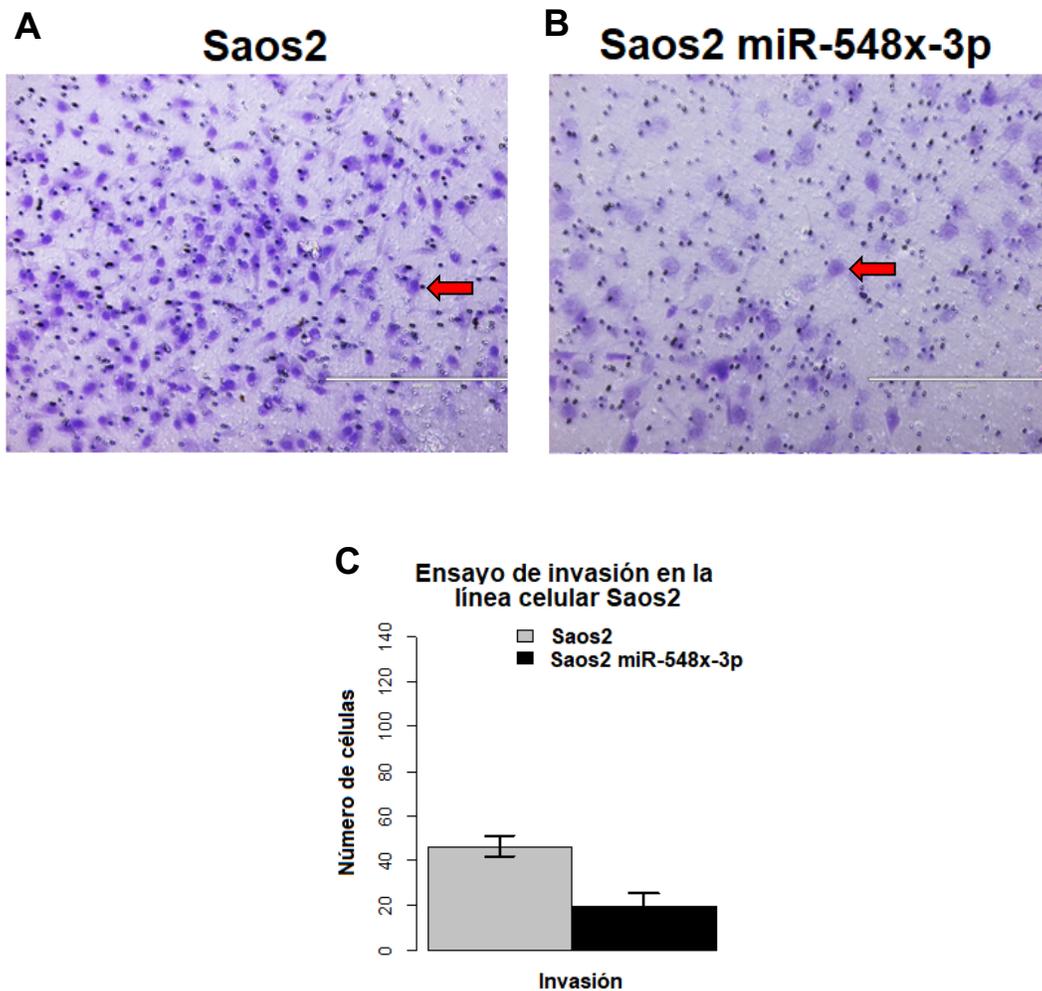


Figura 39.0. Ensayo de Invasión por transwell. A) Se muestra la capacidad de invasión de la línea celular Saos-2 a través de la matriz. B) Se muestra la capacidad de invasión de la línea celular Saos-2 miR-548x-3p a través de la matriz. C) Se muestran las diferencias estadísticas entre el promedio de células Saos-2 con respecto a la línea establecida Saos-2 miR-548x-3p. Las flechas rojas muestran las células teñidas de violeta.

En la figura 40.0 se muestra el ensayo de invasión por transwell de la línea celular U-2OS y U-2OS miR-548x-3p donde las células se muestran teñidas de color violeta y son señalizadas por la flecha roja. Se puede observar que en la línea celular U-2OS (Figura 40.0 A) hay mayor actividad de invasión que en la línea U-2OS miR-548x-3p (Figura 40.0 B). Una prueba de t-student fue utilizada para comparar los promedios de las células en ambos experimentos encontrando un valor de $p < 0.001$ por lo que existen diferencias estadísticas entre ambas líneas celulares (Figura 40.0 C).

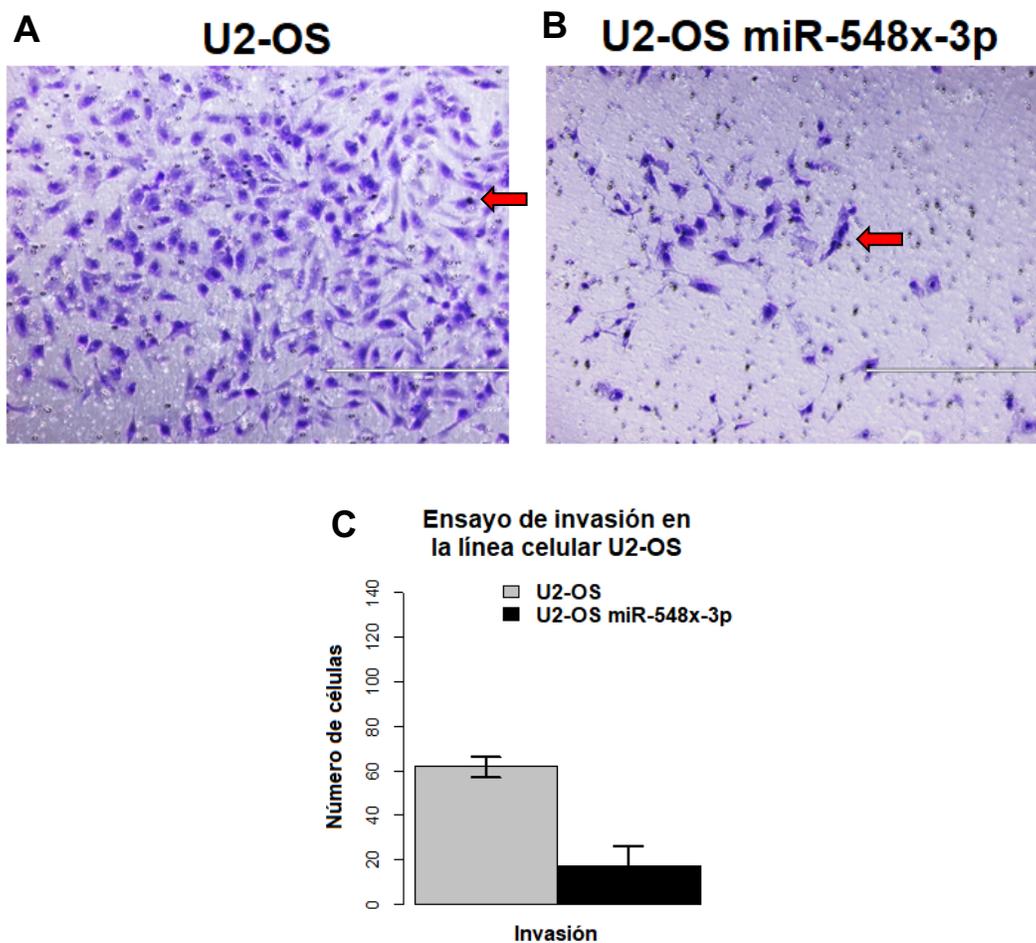


Figura 40.0. Ensayo de invasión por transwell. A) Se muestra la capacidad de invasión de la línea celular U-2OS a través de la matriz. B) Se muestra la capacidad de invasión de la línea celular U-2OS miR-548x-3p a través de la matriz. C) Se muestran las diferencias estadísticas entre el promedio de células U-2OS con respecto a la línea establecida U-2OS miR-548x-3p. Las flechas rojas muestran las células teñidas de violeta.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó un análisis basado en un análisis de microarreglos con el fin de identificar miRNAs diferencialmente expresados entre un grupo de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis con respecto a un grupo normal seguido de la validación por RT-qPCR. Los resultados mostraron tres miRNAs sobre expresados en el grupo de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis: miR-1270, miR-548x-3p y miR-8084.

Durante la selección de mujeres posmenopáusicas normales y con osteoporosis se trató de que los grupos fueran lo más similares posibles. En la característica de edad no se observaron diferencias estadísticas entre ambos grupos debido a que cada mujer normal fue seleccionada con ± 2 años de diferencia con respecto a cada mujer osteoporótica, tratando de reducir el sesgo entre mujeres de ambos grupos. En la característica de estatura se encontraron diferencias significativas entre los grupos normales y con osteoporosis. Sin embargo, estos resultados son esperados ya que una característica de la osteoporosis es la pérdida de masa ósea que se ve reflejada en disminución de talla y encorvamiento del individuo que a su vez es un factor de riesgo de fractura [26].

En la característica de peso se observaron diferencias estadísticas mínimas ya que la mayoría de las mujeres en la cohorte de trabajadores del IMSS Morelos presentan obesidad y aunque cada mujer fue cuidadosamente seleccionada, no fue posible descartar completamente esta variable. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Lan-Juan *et al.* 2008, la obesidad tiene un efecto protector contra la osteoporosis debido a la capacidad del tejido adiposo de almacenar estrógenos y mantener activa la diferenciación de osteoblastos manteniendo el equilibrio entre la formación y reabsorción ósea [182]. En este trabajo observamos que los valores más altos en peso se muestran en el grupo de mujeres normales y no en el grupo de mujeres con osteoporosis por lo que esta característica no afecta los objetivos de este trabajo. En las características de relación peso estatura (IMC), número de hijos y edad de la menarca, no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos grupos mostrando que son grupos bastante homogéneos cuya variación se encuentra en las características de DMO y T-score, donde se esperaba encontrar fuertes diferencias estadísticas ya que es un estudio de contrastes. Por lo tanto, se asume que los resultados obtenidos en este estudio son confiables.

A cada individuo de ambos grupos se les realizó la extracción de 80 ml de sangre periférica la cual fue utilizada para realizar la separación de células mononucleares y posteriormente el enriquecimiento de monocitos. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el número de células mononucleares, así como el número de monocitos CD14⁺, no muestra variación entre el grupo normal y el grupo con osteoporosis. Estos datos concuerdan con los reportados previamente por Jevon M, *et al.* 2003 y Lin X, *et al.* 2016, los cuales realizaron separación de CMN y enriquecimiento de monocitos CD14⁺ en mujeres normales y con osteoporosis y tampoco observaron diferencias en el conteo de celular de ambas condiciones. [183,184]. Es importante tomar en cuenta que el porcentaje de monocitos en sangre total varía de entre el 5 y 10%. Por lo tanto, fue necesario tomar una muestra de 80ml de sangre total, obteniendo monocitos suficientes de los que se extrajo RNA necesario que fue empleado en cada tecnología utilizada en este estudio [185].

Una vez enriquecidos los monocitos, estos fueron evaluados por citometría de flujo obteniendo un porcentaje de enriquecimiento superior al 95% para cada muestra. Estos resultados son superiores a lo reportado en otros trabajos los cuales emplearon metodologías de purificación similares, obteniendo porcentajes de entre el 80 y 85% [165,167].

Después de la extracción de RNA total en monocitos CD14⁺ se evaluó el número de integridad de RNA (RIN) el cual es requisito indispensable en análisis de microarreglos. El RNA es una molécula termodinámicamente estable la cual también es rápidamente digerida por la presencia de enzimas RNAsas, generando fragmentos cortos de RNA que comúnmente se forman en alguna muestra determinada. La degradación del RNA puede comprometer los resultados de aplicaciones posteriores, principalmente aquellas que requieren de alta sensibilidad como los microarreglos por lo que se requiere una evaluación del RIN superior a 8 [186]. Los resultados de este trabajo mostraron un promedio de integridad superior a un RIN de 9, lo que nos permite inferir que el RNA obtenido de monocitos CD14⁺ es de buena calidad y por lo tanto los resultados de la hibridación en microarreglos fueron confiables.

El método de análisis RMA es el algoritmo más utilizado en el procesamiento de microarreglos de Affymetrix, utiliza la corrección de fondo, normalización y sumarización. En este tipo de experimentos la corrección de pruebas de hipótesis múltiples como el FDR son de suma importancia para eliminar la tasa de errores tipo I en pruebas de hipótesis nulas en comparaciones múltiples, lo cual permite evitar resultados falsos positivos [180,181]. Desafortunadamente después de realizar la corrección de pruebas múltiples, no

se encontraron miRNAs que cumplieran con el umbral de significancia estadística como suele indicarse. Sin embargo, para superar esta limitante se utilizaron los valores de p como método de selección de los miRNAs candidatos, posteriormente estos fueron sometidos a un proceso de enriquecimiento basado en información obtenida de bases de datos, literatura y validación por qRT-PCR [181]. Este análisis mostró la sobreexpresión de los miRNAs miR-1270, miR-548x-3p y miR-8084 en el grupo de mujeres con osteoporosis en una población mestizo mexicana.

La búsqueda de información en bases de datos y literatura, mostró que miR-1270 es un miRNA implicado en vías de señalización del sistema inmune, principalmente en procesos inflamatorios [187]. Ginaldi L, *et al.* 2005, reporta a la osteoporosis como un proceso inflamatorio a través del cual numerosas citocinas proinflamatorias están implicadas en la regulación de osteoblastos y osteoclastos, en las que alteraciones en un perfil inmune activado podrían ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades asociadas al sistema óseo [188]. Por otro lado, recientemente miR-1270 fue identificado como sobre expresado en pacientes con carcinoma renal y en líneas celulares de osteosarcoma 143B, MG-63, KHOS/240S, HS755(B).T, Saos-2, U-2OS, H0S y SK.ES-1, siendo consistente su participación en el metabolismo del hueso [189]. Por otro lado, la validación de miR-1270 por qRT-PCR confirmo que este miRNA se encuentra sobre expresado en un grupo de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, lo cual corrobora con lo observado en el microarreglo.

La búsqueda de información de miR-548x-3p solo mostró un reporte donde este miRNA se encuentra sobre expresado en un análisis de microarreglos en diferentes tejidos de cáncer de próstata e hiperplasia benigna de próstata, en este estudio no se reporta función, ni su posible participación en estas patologías [190]. Sin embargo, el análisis bioinformático realizado en esta tesis mostro evidencia de que este miRNA podría regular genes que participan en distintas vías de señalización asociadas al metabolismo del hueso, principalmente en procesos de diferenciación, proliferación, migración e invasión celular. Por lo tanto, este miRNA podría tener un papel importante en procesos asociados al metabolismo óseo. Sin embargo, desafortunadamente, no fue posible validar este miRNA por qRT-PCR, posiblemente a que la sonda no hibrido correctamente en su región blanco.

El miR-8084 es un miRNA que de acuerdo a la búsqueda en la literatura solo se ha mostrado como sub expresado en tumores de cáncer epitelial de ovario, de cual no se describe

función, ni participación en esta patología [191]. Otro trabajo publicado recientemente muestra la sub expresión de miR-8084 en cáncer de mama, sugiriendo su función como un posible oncogén y proponiéndolo como un potencial biomarcador para la detección temprana de esta enfermedad [192]. Desafortunadamente, de acuerdo al análisis bioinformático de este trabajo, no se encontró evidencia de la participación de este gen en ninguna vía de señalización asociada al metabolismo óseo y tampoco fue posible validarlo por qRT-PCR. Estos datos sugieren que este miRNA podría no estar implicado en el metabolismo óseo y sus valores estadísticos de Fold-Change = 1.999 y valor de $p = 0.047$ son producto de resultados falsos positivos debido a la falta de ajuste por FDR en el análisis de expresión diferencial. Sin embargo, no se descarta completamente su posible participación en otros procesos que pudieran estar relacionados con el metabolismo óseo.

El análisis bioinformático mostró 3857 genes que podrían ser blancos de miR-1270, 1129 de miR-548x-3p y 417 de miR-8084. Estos genes fueron predichos por al menos tres algoritmos diferentes, cuya función es realizar la búsqueda de la región de alineamiento de un miRNA conocida como “seed” dentro de la región 3'UTR de un mRNA, de tal forma que si un gen es predicho por más de un algoritmo aumenta la probabilidad de que realmente este sea un blanco de dicho miRNA [193]. Una metodología que permitió conocer aquellos genes que fueran predichos por los algoritmos y que además se encontraran sub-expresados en monocitos CD14⁺ de los mismos grupos de mujeres posmenopáusicas donde fueron identificados los miRNAs, fue comparar los datos de expresión del microarreglo HGU133 plus 2.0 con los genes predichos por los tres diferentes algoritmos, obteniendo genes que se encontraron sub-expresados y que además fueran blancos de los miRNAs de interés, dando certeza de que estos genes tienen un papel biológico relevante en procesos asociados al metabolismo óseo. El análisis bioinformático para búsqueda de los procesos biológicos en los que se encontraban implicados los genes blanco de los miRNAs miR-1270 y miR-548x-3p mostró que estos genes participan en 16 vías de señalización asociadas al metabolismo óseo: Entre estas vías destacan: la vía de señalización RAS [194], vía de señalización MAPK [195], vía de señalización AMPK [196], vía de señalización FoxO [197], vía de señalización mTOR [198], vía de señalización TNF [199] y diferenciación de osteoclastos. Estas vías de señalización han sido asociadas principalmente a procesos de diferenciación de precursores hematopoyéticos a osteoclastos maduros, sugiriendo que la osteoclastogenesis puede activarse a través de moléculas que participan en diferentes vías de señalización y no solo por la vía tradicional

RANK/RANKL/OPG. Por otro lado, alteraciones en los perfiles de expresión de los miRNAs miR-1270 y miR-548x-3p podrían regular genes implicados en vías de señalización que regulan la osteoclastogénesis, de tal forma que en patologías como la osteoporosis se estaría promoviendo la diferenciación de osteoclastos y por lo tanto mayor actividad de reabsorción ósea que es característica de esta enfermedad. Por otro lado, los resultados de qRT-PCR mostraron que miR-1270 se encuentra sobre expresado en monocitos CD14⁺ de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis por lo que este miRNA podría tener un papel como posible biomarcador para la detección temprana de la osteoporosis adicional a cuatro miRNA previamente reportados que también fueron identificados en monocitos de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis [141,166,167,200]. Desafortunadamente, después de realizar el análisis bioinformático de miR-8084, no se encontró evidencia de la participación de este miRNA o de sus genes blancos en vías de señalización asociadas al metabolismo óseo.

Más adelante, con la lista de genes obtenida de las vías de señalización se formó una red de interacción donde se identificaron 9 genes clave en el proceso de diferenciación monocito-osteoclasto y que son blancos de miR-1270, *KRAS*, *FOSL2*, *MEF2C*, *SP1*, *IKBKB*, *RASSF5*, *ABL1*, *STAT2* e *IRF8*.

KRAS es un gen que participa en la vía de señalización RAS/MAPK, esta vía de señalización está implicada en procesos de proliferación, maduración y funciones celulares especializadas. Este gen codifica a la proteína K-Ras la cual es una GTPasa que convierte el GTP a GDP, de esta manera actúa como un interruptor que se activa y desactiva mediante el estímulo de dichas moléculas. En el metabolismo óseo *KRAS* está asociada a la regulación de células progenitoras y formación ósea, a través de la activación de las vías de señalización: Señal reguladora de cinasa (ERK) y fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) [201].

FOSL2 es un gen miembro de la familia Fos, que consta de 4 miembros: *FOS*, *FOSB*, *FOSL1* y *FOSL2*. Estos genes codifican a una cremallera de leucina que puede formar dímeros con proteínas de la familia *JUN* para crear al factor de transcripción *AP-1*. En el metabolismo óseo *AP-1* es un factor de transcripción complejo regulador de la homeostasis del hueso. Por otro lado, *AP-1* está implicado en una amplia gama de procesos biológicos entre los que se encuentran el desarrollo óseo. Las mutaciones de pérdida y ganancia de función en ratones miembros de la familia *Fos* y en menor medida miembros de la familia *Jun* y *ATF* afectan principalmente a la fisiología de condrocitos, osteoblastos y osteoclastos, resultando en una variedad de afecciones patológicas del esqueleto [202].

MEF2C es un gen asociado a la miogénesis, con activación trans y activación de unión al DNA. La proteína traducida de este gen participa en el mantenimiento del estado diferenciado de células musculares. Las mutaciones y eliminaciones en este gen se han asociado con discapacidad cognitiva grave, movimientos estereotípicos, epilepsia y malformación cerebral. En el metabolismo óseo **MEF2C** es requerido para para la expresión de **SOST**, un inhibidor de osteocitos durante la formación ósea [203].

SP1 es un factor de transcripción que puede activar o reprimir la transcripción en respuesta a estímulos patológicos y fisiológicos. Se une con alta afinidad a motivos ricos en GC y regula la expresión de un largo número de genes involucrados en una amplia variedad de procesos tales como: Crecimiento celular, apoptosis, diferenciación y respuesta inmune. En el metabolismo óseo *Sp1* se ha relacionado con la vía de señalización **PPAR α** , la homeostasis celular y la capacidad de respuesta al estrés ambiental. **PPAR α** es dependiente de *Sp1* y sugiere que la expresión de **PPAR α** regulada por *Sp1* desempeña un papel clave en la pérdida ósea mediada por procesos de inflamatorios [204].

IKBKB juega un papel esencial en la vía de señalización NF-Kappa-B que es activada por múltiples estímulos como: citocinas inflamatorias, productos bacterianos o virales, daños al DNA y otras tensiones celulares. Actúa como parte del complejo IKK canónico en la vía convencional de activación NF-Kappa-B y fosforila los inhibidores de esta vía en 2 residuos críticos de serina, permitiendo la poliubiquitinación de los inhibidores y posterior degradación en el proteosoma. En el metabolismo óseo, **IKBKB** ha sido implicado en la inducción de la osteoclastogénesis vía **RANKL**. La actividad de esta sola enzima es suficiente para inducir de manera independiente la osteoclastogénesis. La explicación de este fenómeno probablemente involucre la regulación de una señal compleja que imita la activación de NF-kB por **RANKL**. Sin embargo, la capacidad de **IKBKB** para inducir la diferenciación de osteoclastos depende de la actividad de la cinasa, debido a que la mutación de la lisina que une una molécula de ATP a la metionina en el dominio cinasa anula la función osteoclastogénica [205].

RASSF5 ha sido implicado en una variedad de procesos biológicos que incluyen: proliferación, regulación del ciclo celular y apoptosis. Se cree que participa en tumorigenesis como un supresor de tumores en un amplio número de tumores malignos. Sin embargo, se sabe poco sobre la función y los mecanismos subyacentes de **RASSF5** en osteosarcoma humano[206]. Estudios asociados al metabolismo óseo muestran que ratones knockout de **RASSF5** presentaron malformaciones craneofaciales, reducción de la longitud del esqueleto, hueso nasal corto, hueso cigomático corto y una mandíbula con un

proceso coronoides atrofiado, sugiriendo que la pérdida de función de este gen tiene fuertes repercusiones en el sistema esquelético. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales la pérdida de función de este gen causa estos efectos [207].

ABL1 es un gen está asociado múltiples procesos relacionados con el crecimiento y la supervivencia celular tales como: la remodelación del citoesqueleto en respuesta a estímulos extracelulares, motilidad y adhesión celular. Este gen se expresa a niveles elevados en cartílago hialino adulto, tejido óseo en ratones recién nacidos, osteoblastos y vasculatura en sitios de osificación endocondral en fetos. En estudios asociados al metabolismo óseo en ratones homocigotos con mutaciones en el gen que codifica *ABL1* se observa una mayor mortalidad perinatal, fertilidad reducida, cráneos escorzados, defectos en la maduración de las células B en la medula ósea y osteoporosis. Los huesos largos de los ratones mutantes tienen el hueso cortical más delgado y el volumen del hueso trabecular más reducido. El fenotipo osteoporótico no se debe a una remodelación ósea acelerada ya que tanto el número como la actividad de los osteoclastos son similares a los de una camada control, sino a osteoblastos disfuncionales [208].

STAT2 es un gen miembro de la familia *STAT*. En respuesta a citocinas y factores de crecimiento, los miembros de la familia *STAT* son fosforilados por el receptor asociado a cinasas para formar homo o heterodímeros que se translocan al núcleo de la célula donde actúan como activadores transcripcionales. En respuesta al interferón (INF) esta proteína forma un complejo con *STAT1* y el factor regulatorio *INF* de la familia de proteínas p48 en el que esta proteína actúa como un transactivador, pero carece de la capacidad de unirse directamente al DNA. Estudios en el metabolismo óseo han asociado la vía de señalización JAK-STAT a procesos relacionados con el remodelado óseo, donde osteoblastos y osteoclastos son regulados en parte por muchos factores locales incluidas citocinas en el microambiente del hueso. Muchas vías de señalización de citocinas se han encontrado en células óseas, incluida la cinasa Janus (*JAK*)-transductor de señal y activador de vías de transcripción (*STAT*). Estudios en ratones knockout de *JAK* y *STAT* muestran alteraciones en la homeostasis del hueso, síndrome de Job y fracturas esqueléticas. Estos datos sugieren que la vía de señalización JAK-STAT es esencial tanto para la biología de osteoblastos como de osteoclastos y alteraciones en estas vías puede conducir al desarrollo de enfermedades del metabolismo óseo [209].

De estos genes *IRF8* es un factor de transcripción que juega un papel importante en la regulación de la diferenciación de una célula mieloide a una precursora de monocitos.

IRF8 es un gen con un papel clave en la diferenciación osteoclástica [210]. Este gene codifica a un factor de transcripción comúnmente expresado en células del sistema inmune incluidos monocitos [211]. Estudios recientes han demostrado que ratones deficientes de *IRF8* son susceptibles a desarrollar osteoporosis severa, acompañada de un alto número de osteoclastos [210]. Más adelante se demostró que *IRF8* suprime la osteoclastogénesis y el remodelado óseo *In vivo*, por la inhibición de la función del factor nuclear de células T-activadas (*NFATc1*) [212]. Por otro lado, se ha observado que factores epigenéticos como la metilación del DNA juegan un papel importante en la diferenciación de osteoclastos, Nishikawa K, *et al.* 2015, reportan que la metilación por DNMT3A contribuye al mantenimiento de un estado represivo estable de genes reguladores de la osteoclastogénesis durante la etapa intermedia de la diferenciación de osteoclastos en lugar de al inicio de este proceso como se ha observado en células precursoras de osteoclastos. Uno de estos genes es *IRF8* el cual se ha descrito como un regulador negativo de la osteoclastogénesis. En un modelo de ratón, DNMT3A *Ctsk*^{-/-} y DNMT3 *RANK*^{-/-} se observó que la expresión de *IRF8* es más alta con respecto a células control correspondiente, destacando la importancia de la regulación mediada por genes denominados anti-osteoclastogénicos como *IRF8* y de factores epigenéticos como la metilación de DNA [213].

Las observaciones del presente estudio muestran que miR-1270 juega un importante papel en la diferenciación monocito-osteoclasto regulando la expresión de *IRF8*. En este contexto un reciente estudio demostró que el interferón- α (INF- α) es blanco de miR-1270 revelando que el anti-sentido (AS) de *INF- α* potencia la estabilidad del mRNA *INF- α 1*. Los datos indican que *INF- α* AS funciona como un RNA endógeno competitivo para evitar que miR-1270 actúe sobre mRNA de *INF- α 1* [187]. Este complejo mecanismo regulatorio indica un papel clave en el sistema inmune innato en el mantenimiento fisiológico de los niveles de *INF* tipo I vía mecanismos regulatorios pos-transcripcionales incluidos los miRNAs y su implicación en la vía del interferón en el metabolismo óseo. Previamente se reportó que *INF- α* e *IL-1* inducen la activación de moléculas de señalización incluidas NF- κ B y p38, las cuales son moléculas clave en los procesos de diferenciación monocito-osteoclasto [214]. Sin embargo, en este trabajo no encontramos genes de la familia INF que se encontraran desregulados o que tuvieran relevancia en el metabolismo óseo, posiblemente a que estos factores son activados en respuesta a estímulos externos como inflamación o infecciones [215] y en este trabajo estas variables fueron controladas.

A la fecha la DMO es el mejor predictor y el estándar de oro para el diagnóstico de la osteoporosis [216]. Algunos estudios indican que miR-21, miR-133a, miR-422a y miR-194-5p identificados en monocitos circulantes podrían ser considerados como biomarcadores para la osteoporosis posmenopáusica. Sin embargo, el presente estudio no replica estos resultados. Más adelante, las discrepancias en los resultados observados podrían estar asociadas con el diseño del estudio, por ejemplo: miR-133a y miR-194-5p fueron miRNAs identificados en monocitos circulantes de mujeres posmenopáusicas de poblaciones asiáticas. Sin embargo, el tamaño de muestra es diferente entre ambos estudios y la identificación de los miRNAs se realiza entre dos condiciones diferentes, para miR-133a se utilizan monocitos circulantes de una población de 10 mujeres posmenopáusicas normales con respecto a 10 mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, mientras que la identificación de miR-194-5p se realizó en un grupo de 23 mujeres posmenopáusicas con osteopenia con respecto a 25 mujeres posmenopáusicas con osteoporosis. Además, las tecnologías utilizadas son diferentes, para la identificación de miR-133a se utilizó un microarreglo ABI TaqMan nH miRNA array mientras que para la identificación de miR-194-5p se utilizó la tecnología de un microarreglo Agilent Human miRNA Microarray los cuales tienen variación con respecto al número de sondas de miRNAs y con respecto al software empleado para el análisis de expresión diferencial [165,167]. Por otro lado, el microRNA miR-422a aunque también fue identificado de monocitos circulantes de un grupo de 10 mujeres posmenopáusicas normales versus un grupo de 10 mujeres posmenopáusicas con osteoporosis a través de la tecnología del microarreglo ABI TaqMan miRNA array, este fue identificado en mujeres caucásicas [166]. Es importante mencionar que el origen étnico juega un papel importante en factores que influyen en la incidencia de la osteoporosis, esto se ha visto reflejado principalmente en estudios de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) donde un mismo polimorfismo presenta diferente asociación en diferentes regiones geográficas [217]. Estas variaciones en el diseño experimental, tecnología utilizada, método de normalización, origen étnico, entre otros pueden influir en la diferencia de resultados, por lo tanto, las diferencias empleadas para abordar la búsqueda de miRNAs y la falta de coincidencias con respecto a otros trabajos puede ser parte de lo esperado.

En el ensayo de gen reportero se observó que la construcción del pmiR-report que contenía la región 3'UTR de *IRF8* (pmiR-*IRF8*), al ser transfectada en la línea celular Saos-2, mostró un aumento en los niveles de luciferasa. Por otro lado, la co-transfección con la construcción del pcDNA 6.2 que contenía la secuencia del miRNA-1270 (pcDNA-1270) y la construcción pmiR-*IRF8* mostraron una disminución significativa en los niveles de luciferasa, sugiriendo

que *IRF8* es un potencial blanco de miR-1270. Más adelante, se observó que la co-transfección de pmiR-IRF8 que contenía la región seed mutada (pmiR-*IRF8*-mut) y pcDNA-1270 no presentaba disminución en los niveles de luciferasa comprobando que *IRF8* es un gen blanco de miR-1270.

Los miRNAs son moléculas que participan en múltiples procesos celulares, entre estos se encuentra la proliferación celular, donde las células deciden proliferar o permanecer inactivas usando vías de señalización que vinculen la información sobre el entorno celular con la fase G1 del ciclo celular. Los resultados de los ensayos de proliferación muestran que las líneas celulares Saos-2 y U-2OS establecidas con miR-1270 y miR-548x-3p tienen menor capacidad de proliferación con respecto a las líneas celulares no establecidas, esto podría deberse a que estos miRNAs pueden regular genes que participan en la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR la cual se ha descrito como implicada en proliferación celular [218] y fue una de las vías de señalización asociadas al metabolismo óseo identificadas en este estudio. Algunos genes descritos en esta vía de señalización son: Akt1, Akt2, GSK3 β , TRIM14 y RAS, los cuales de acuerdo a nuestro análisis bioinformático son blancos de miR-1270 y miR-548x-3p que además se encontraron sub expresados en el microarreglo de expresión HGU 133 plus 2.0. Por otro lado, Xu G, *et al.* 2017, reportan evidencia de que la sobre activación de TRIM14 en líneas celulares de osteosarcoma potencia la proliferación, migración e invasión celular [219]. Por otro lado, Jason S. *et al.* 2016, describe que procesos proliferación, supervivencia, migración e invasión celular son activados a través de las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR [220]. Por lo tanto, podemos suponer que alteraciones en los perfiles de expresión de los miRNAs podrían resultar en la regulación negativa de genes que participan en vías de señalización implicadas en procesos de proliferación, migración e invasión celular.

Con base en los resultados de proliferación observamos que miR-1270 y miR-548x-3p también podrían estar asociados a la regulación de genes implicados en vías de señalización que regulan procesos de invasión y migración celular. Una de las vías de señalización que ha sido ampliamente descrita en el proceso de migración, es la vía de señalización de adhesión focal. Esta vía de señalización está compuesta por genes que regulan la formación de estructuras llamadas adherencias focales que están compuestas principalmente por integrinas [221,222]. Nuestro análisis bioinformático reveló que la vía de señalización adhesión focal está implicada en metabolismo óseo y algunos de los genes que participan en esta vía de señalización son blancos de miR-1270 y miR-548x-3p.

Los resultados del ensayo de herida para evaluar la migración celular mostraron que el proceso de migración se ve considerablemente disminuido en las líneas celulares: Saos-2 y U-2OS establecidas con miR-1270 con respecto a las líneas no establecidas. Por otro lado, la línea celular Saos-2 establecida con miR-548x-3p con respecto a la línea celular Saos-2 no establecidas. Estos datos sugieren que miR-1270 y miR-548x-3p podrían regular genes implicados en vías de señalización que están asociadas a migración celular, como es el caso de adhesión focal donde participan genes como *VASP*. Este gen ha sido asociado a procesos de migración celular y se ha descrito como un regulador de localización, fosforilación y migración celular [223]. *VASP* estimula el alargamiento del filamento de actina promoviendo la transferencia de monómeros de actina unidos a profilina en filamentos de actina en crecimiento [224]. En un modelo de ratón con cáncer de pulmón y un modelo ortotópico de cáncer de mama, Carmona G, *et al.* 2006, reportan que la atenuación de *VASP* en ratones disminuye la migración celular la cual se ve reflejada en una disminución de la metástasis [225].

De acuerdo al análisis bioinformático de este trabajo, miR-548x-3p puede regular la expresión del gen *VASP* en monocitos CD14⁺ de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, además este gen se encontró sub-expresado en el microarreglo de expresión, sugiriendo que este microRNA regula la expresión de este gen y podría regular la expresión de genes asociados a vías de señalización que controlan procesos de migración o invasión celular. En el experimento de herida de la línea celular U-2OS establecida con miR-548x-3p no se observaron diferencias con respecto a la línea celular no establecida, esto posiblemente se deba a que genes implicados en vías de señalización que regulan procesos migración y principalmente de invasión celular, son regulados por otros mecanismos diferentes a los miRNAs o por otros miRNAs [226].

Los ensayos de migración por el método de transwell en las líneas celulares Saos-2 y U-2OS corroboraron los datos observados en el ensayo de herida, observando que las líneas establecidas con los miRNAs miR-1270 y miR-548x-3p tienen menor capacidad de migración con respecto a las líneas no establecidas, probablemente debido a las cuestiones que se discuten en el ensayo de herida. Por otro lado, en los ensayos de invasión por transwell los resultados son similares a los observados en los ensayos de migración debido a que la regulación de estos procesos se lleva a cabo por las mismas vías de señalización, pero los procesos son regulados por distintos genes. Algunas de las vías de señalización que describen la regulación de procesos de proliferación, migración e invasión celular son: la señalización por PI3K Jak-STAT [227], Adhesión focal [220] y PI3K-Akt [228].

Finalmente, existen algunas limitaciones en el presente estudio, que incluyen al tamaño de muestra que es relativamente pequeño ($n=12$), aunque estos resultados son similares a estudios publicados previamente [144,166,167,229]. Sin embargo, en este trabajo se utilizó el método recomendado por Affymetrix para evaluar el tamaño de muestra (Número de replicados por condición). De acuerdo a este método, el coeficiente de variación (CV) es calculado para ciertos percentiles (25th, 50th y 75th) de intensidad de señal para un grupo de datos que contienen 1,2,3... y n replicados. La comparación está hecha entre el CV calculado de ciertos percentiles para diferente número de replicados. El tamaño de muestra óptimo es alcanzado cuando el valor de CV es estabilizado, es decir, cuando no cambia apreciablemente de n replicados a $n + 1$ replicados. Bajo tal situación, es poco probable que adicionando más replicados mejore significativamente la precisión de la estimación para desviaciones estándar de la muestra, la cual es usada para determinar la significancia estadística en pruebas de paramétrica estadística [230]. Basados en los cálculos con los datos crudos en nuestro estudio, observamos que el CV se estabilizó en cinco replicados para los percentiles 25th y 50th de intensidad de señal, por lo tanto, nuestro tamaño de muestra de 6 vs 6 microarreglos fue adecuado para este estudio. Además, los resultados obtenidos fueron validados por RT-qPCR. Por otro lado, entre las fortalezas de este estudio fue el uso de un microarreglo de expresión empleado para las mismas 12 muestras en las que se identificaron los miRNAs. Los resultados de este microarreglo mostraron aproximadamente 1600 genes que se encontraron como sub-expresados que al ser comparados con los genes blancos de los miRNAs teníamos la certeza que cumplían con la prueba de concepto y provenían de monocitos de las mismas muestras de mujeres posmenopáusicas. En conclusión, los resultados del presente estudio en combinación con el papel funcional de *IRF8* en monocitos circulantes indican que miR-1270 podría ser un biomarcador viable para detectar osteoporosis en mujeres mexicanas posmenopáusicas. Estudios posteriores son necesarios para validar estas observaciones.

REFERENCIAS

1. Manuscript A, Progenitor M, Differentiation C. NIH Public Access. 2010;28:357–64.
2. Mesa Ramos M E. Guía de práctica clínica osteoporosis. Grupo de Estudio e Investigación de la Osteoporosis de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y traumatología. [Internet]. 2010. Available from: http://www.secot.es/ckeditor/kcfinder/upload/files/GEIOS_Guia_de_Practica_Clinica__Osteoporosis.pdf
3. Herrera Rodríguez Antonio. Osteoporosis. La epidemia silenciosa del siglo XXI. 1a ed. Prensas de la Universidad de Zaragoza, España; 2017.
4. Rau CS, Wu SC, Kuo PJ, Chen YC, Chien PC, Hsieh HY, et al. Epidemiology of bone fracture in female trauma patients based on risks of osteoporosis assessed using the osteoporosis self-assessment tool for Asians score. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2017;14.
5. Gómez de Tejada Romero MJ SHM. Los ultrasonidos, la densitometría y la osteoporosis. *An. Med. INTERNA*. 2007;24:55–6.
6. Gullberg B, Johnell O, Kanis JA. International Original Article World-wide Projections for Hip Fracture. *Osteoporos Int*. 1997;44:407–13.
7. Hermoso de Mendoza MT. Clasificación de la osteoporosis. Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial. *An. Sis San Navarra [Internet]*. 2003;26:29–52. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000600004
8. González Macías J, A. Rianco Moral J. Avances en el tratamiento de la osteoporosis. Estrategias de aplicación práctica. *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado [Internet]*. Elsevier; 2007;9:5950–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0211344907747616>
9. Krall EA, Dawson-Hughes B. Walking is related to bone density and rates of bone loss. *Am. J. Med*. 1994;96:20–6.
10. Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*. 2002;359:2018–26.
11. Naves M, Díaz-López JB, Gómez C, Rodríguez-Rebollar A, Rodríguez-García M, Cannata-Andía JB. The effect of vertebral fracture as a risk factor for osteoporotic fracture and mortality in a Spanish population. *Osteoporos. Int*. 2003;14:520–4.
12. Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner WS, Cauley JA, Genant HK, et al. Appendicular Bone Density and Age Predict Hip Fracture in Women. *JAMA J. Am. Med. Assoc*. 1990;263:665–8.
13. Thomakos N, Liakakos T. Diagnostic methods in osteoporosis. *Arch. Hell. Med*.

2000;17:146–51.

14. Webber CE. Photon absorptiometry, bone densitometry and the challenge of osteoporosis. *Phys. Med. Biol.* 2006;51:169–85.
15. Heymsfield SB, Smith R, Aulet M, Bensen B, Lichtman S, Wang J, et al. Appendicular skeletal muscle mass: Measurement by dual- photon absorptiometry. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990;52:214–8.
16. Guglielmi G, Lang TF. Quantitative Computed Tomography. *Semin. Musculoskelet. Radiol.* [Internet]. 2002;06:219–28. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2002-36719>
17. Cheng S, Tylavsky F, Carbone L. Utility of ultrasound to assess risk of fracture. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1997;45:1382–94.
18. Moayyeri A, Adams JE, Adler RA, Krieg MA, Hans D, Compston J, et al. Quantitative ultrasound of the heel and fracture risk assessment: An updated meta-analysis. *Osteoporos. Int.* 2012;23:143–53.
19. JENSEN MD, KANALEY JA, ROUST LR, O'BRIEN PC, BRAUN JS, DUNN WL, et al. Assessment of Body Composition With Use of Dual-Energy X-ray Absorptiometry: Evaluation and Comparison With Other Methods. *Mayo Clin. Proc.* [Internet]. Mayo Foundation for Medical Education and Research; 1993;68:867–73. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)60695-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-6196(12)60695-8)
20. Orueta R, Gómez-Caro S. Interpretación de la densitometría ósea. *Semergen.* 2010;36:27–30.
21. V DEM, Sara D, Ch M, G DPP, A DCA. DENSITOMETRÍA ÓSEA. 2013;24:169–73.
22. Min DG, Lee JH, Choe HS, Kim EJ. Comparison of bone density on the dominant and nondominant sides between healthy elderly individuals and stroke patients. *J. Phys. Ther. Sci.* 2016;28:2533–6.
23. Raisz LG. Science in medicine Pathogenesis of osteoporosis : concepts , conflicts , and prospects. 2005;115.
24. Med QJ. Mini-review QJM The genetics of osteoporosis. 1997;247–51.
25. Lazcano-Ponce E, Tamayo J, Díaz R, Burguete AI, Salmerón J. Correlation trends for bone mineral density in Mexican women: Evidence of familiar predisposition. *Salud Publica Mex.* 2009;51:93–9.
26. Compston JE, Flahive J, Hosmer DW, Watts NB, Siris ES, Silverman S, et al. Relationship of weight, height, and body mass index with fracture risk at different sites in postmenopausal women: The global longitudinal study of osteoporosis in women (GLOW).

J. Bone Miner. Res. 2014;29:487–93.

27. Asomaning K, Bertone-Johnson ER, Nasca PC, Hooven F, Pekow PS. The association between body mass index and osteoporosis in patients referred for a bone mineral density examination. *J. Womens. Health (Larchmt)*. [Internet]. 2006;15:1028–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17125421>

28. McCulloch RG, Bailey DA, Houston CS, Dodd BL. Effects of physical activity, dietary calcium intake and selected lifestyle factors on bone density in young women. *Can Med Assoc J*. 1990;142:221–7.

29. Sunyecz JA. The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther. Clin. Risk Manag*. 2008;4:827–36.

30. Lee LL, Lee JSC, Waldman SD, Casper RF, Grynblas MD. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model. *Bone*. 2002;30:917–23.

31. Berg KM, Kunins H V., Jackson JL, Nahvi S, Chaudhry A, Harris KA, et al. Association Between Alcohol Consumption and Both Osteoporotic Fracture and Bone Density. *Am. J. Med*. 2008;121:406–18.

32. McCloskey E. FRAX® Identificando personas con riesgo elevado de fractura. *Int. Osteoporos. Found*. 2009;

33. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet*. 2003;4:638–49.

34. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165–76.

35. Yun Kong Y, Yoshida H, Boyle WJ, Penniger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* [Internet]. 1999;397:315–23. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/16852%0Apapers3://publication/doi/10.1038/16852>

36. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res*. 2000;15:2–12.

37. Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, et al. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. *Nature*. 1997. p. 81–4.

38. Grigoriadis AE, Wang Z, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch H a, et al. Key Regulator. 1994;266:443–8.
39. Hallsson JH, Hafliðadóttir BS, Stivers C, Odenwald W, Arnheiter H, Pignoni F, et al. The basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor Mitf is conserved in Drosophila and functions in eye development. *Genetics*. 2004;167:233–41.
40. Hu R, Sharma SM, Bronisz A, Srinivasan R, Sankar U, Ostrowski MC. Eos, MITF, and PU.1 Recruit Corepressors to Osteoclast-Specific Genes in Committed Myeloid Progenitors. *Mol. Cell. Biol.* [Internet]. 2007;27:4018–27. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.01839-06>
41. Matsumoto M, Kogawa M, Wada S, Takayanagi H, Tsujimoto M, Katayama S, et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. *J. Biol. Chem.* 2004;279:45969–79.
42. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell*. 2002;3:889–901.
43. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of C-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor kb (Rank) Receptors. *J. Exp. Med.* [Internet]. 1999;190:1741–54. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.190.12.1741>
44. Partridge LJR and NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J. Biol. Chem.* 2010;285:25103–25108.
45. Jacquin C, Gran DE, Lee SK, Lorenzo JA, Aguila HL. Identification of multiple osteoclast precursor populations in murine bone marrow. *J. Bone Miner. Res.* 2006;21:67–77.
46. Karsenty G. Transcriptional Control of Skeletogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* [Internet]. 2008;9:183–96. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genom.9.081307.164437>
47. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Lawrence Riggs B. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology*. 2000;141:4768–76.
48. Corral DA, Amling M, Priemel M, Loyer E, Fuchs S, Ducy P, et al. Dissociation

- between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Med. Sci.* 1998;95:13835–40.
49. Franceschi RT, Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E. Multiple Signaling Pathways Converge on the Cbfa1/Runx2 Transcription Factor to Regulate Osteoblast Differentiation. *Connect. Tissue Res.* [Internet]. 2003;44:109–16. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03008200390152188>
50. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell.* 1997;89:765–71.
51. Nakano Y, Toyosawa S, Takano Y. Eccentric localization of osteocytes expressing enzymatic activities, protein, and mRNA signals for type 5 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). *J. Histochem. Cytochem.* 2004;52:1475–82.
52. Jinhu Xiong and Charles A. O'Brien. Osteocyte RANKL: New Insights into the Control of Bone Remodeling. *Bone Miner. Res.* 2012;27:499–505.
53. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: Complementary roles in bone remodeling regulation? *J. Bone Miner. Res.* 2002;17:907–14.
54. Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 2001;98:13960–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717453> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC61149>
55. Mora A, Molina MJ, Molina MA, Carrato A. Mastocitosis sistémica. Revisión sistemática. *An. Med. Interna.* 2008;25:134–40.
56. Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* [Internet]. 2007;109:3839–49. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/109/9/3839.short>
57. Kacena MA, Shivdasani RA, Wilson K, Xi Y, Troiano N, Nazarian A, et al. Megakaryocyte-osteoblast interaction revealed in mice deficient in transcription factors GATA-1 and NF-E2. *J. Bone Miner. Res.* 2004;19:652–60.
58. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* [Internet]. Nature Publishing

- Group; 2010;10:453–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2784>
59. Chang MK, Raggatt L-J, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal Tissue Macrophages Are Intercalated throughout Human and Mouse Bone Lining Tissues and Regulate Osteoblast Function In Vitro and In Vivo. *J. Immunol.* [Internet]. 2008;181:1232–44. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.181.2.1232>
60. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J. Bone Miner. Res.* 2001;16:1575–82.
61. Pettit AR, Chang MK, Hume DA, Raggatt LJ. Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2008;43:976–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2008.08.128>
62. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am. J. Pathol.* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2009;174:239–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2009.080627>
63. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J. Bone Miner. Res.* 2006;21:605–15.
64. Heino TJ, Hentunen TA, Kalervo Vninen H. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor- β : Enhancement by estrogen. *J. Cell. Biochem.* 2002;85:185–97.
65. Juppner H, Abou-Samra A, Freeman M, Kong X, Schipani E, Richards J, et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* (80-.). [Internet]. 1991;254:1024–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1658941>
66. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene.* 2002;282:1–17.
67. Martin TJ. Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation. *J. Clin. Invest.* 2005;115:2322–4.
68. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology.* 2001;142:4047–54.

69. Insogna KL, Sahni M, Grey AB, Tanaka S, Horne WC, Neff L, et al. Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts. *J. Clin. Invest.* 1997;100:2476–85.
70. Burgess TL, Qian YX, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J. Cell Biol.* 1999;145:527–38.
71. Luzi E, Marini F, Sala SC, Tognarini I, Galli G, Brandi ML. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J. Bone Miner. Res.* 2008;23:287–95.
72. Zhang R, Geoffroy V, Ridall a L, Karsenty G, Tracy T, Bonner a S, et al. Bone Resorption by Osteoclasts. *Science (80-.)*. [Internet]. 2000;289:1504–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/289/5484/1504.full?sid=905b7269-cfd8-4725-ac93-3a99b2aca7fa%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.289.5484.1504>
73. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 1998;95:13453–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24840&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
74. Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR, Vignery A. Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am. J. Pathol.* [Internet]. 1986;122:363–78. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1888102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Zhao C, Irie N, Takada Y, Shimoda K, Miyamoto T, Nishiwaki T, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metab.* 2006;4:111–21.
76. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF- β 1-induced Migration of Bone Mesenchymal Stem Cells Couples Bone Resorption and Formation. *Stem Cells.* 2010;15:757–65.
77. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2008;105:20764–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0805133106>
78. van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, et al. Sclerostin Is an Osteocyte-expressed Negative Regulator of Bone Formation, But

- Not a Classical BMP Antagonist. *J. Exp. Med.* [Internet]. 2004;199:805–14. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20031454>
79. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 2005;280:19883–7.
80. Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J. Biol. Chem.* 2008;283:5866–75.
81. Anderson HC, Harmey D, Camacho NP, Garimella R, Sipe JB, Tague S, et al. Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 2005;166:1711–20.
82. Clark P, Carlos F, Vázquez Martínez JL. Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico. *Arch. Osteoporos.* 2010;5:9–17.
83. Delezé De Lona M, Cons-Molina F, Villa A. Geographic differences in bone mineral density of Mexican women. *Osteoporos Int.* 2000;11:562–9.
84. Maggi S, Kelsey JL, Litvak J, Heyse SP. Incidence of hip fractures in the elderly: a cross-national analysis. *Osteoporos. Int.* 1991;1:232–41.
85. Johansson H, Clark P, Carlos F, Oden A, McCloskey E V., Kanis JA. Increasing age- and sex-specific rates of hip fracture in Mexico: A survey of the Mexican institute of social security. *Osteoporos. Int.* 2011;22:2359–64.
86. Clark P, Carlos F, Barrera C, Guzman J, Maetzel A, Lavielle P, et al. Direct costs of osteoporosis and hip fracture: An analysis for the Mexican healthcare system. *Osteoporos. Int.* 2008;19:269–76.
87. Cruz, Gonzalez Ismael CDF. Costos institucionales y dificultades en la atencion de las pacietes con fracturas por osteoporosis. *Acta Ortop. Mex.* 2002;16 (6):292–5.
88. Zanchetta J. The Latin America Regional Audit. Epidemiology, cost & burden of osteoporosis in 2012. *Int. Osteoporos. Found.* [Internet]. 2012;76. Available from: [http://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/media/PDFs/Regional Audits/2012-Latin_America_Audit_0_0.pdf](http://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/media/PDFs/Regional%20Audits/2012-Latin_America_Audit_0_0.pdf)
89. Garnero P. Biomarkers for osteoporosis management: Utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring. *Mol. Diagnosis Ther.* 2008;12:157–70.
90. Delgado-Calle J, Alonso MA, Ortiz J, Montero A, Garcés C, Sañudo C, et al. Análisis comparativo del epigenoma del tejido óseo y de osteoblastos primarios. *Rev. Osteoporos.*

- y Metab. Miner. [Internet]. 2014;6:35–9. Available from:
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1889-836X2014000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
91. Keene JD. RNA regulons: Coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8:533–43.
92. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431:350–5.
93. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* [Internet]. 2016;1:15004. Available from:
<http://www.nature.com/articles/sigtrans20154>
94. Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, Siasos G, Briasoulis A, Vogiatzi G, et al. The Role of microRNAs in Cardiovascular Disease. *Curr. Med. Chem.* [Internet]. 2012;19:2605–10. Available from:
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=19&issue=16&spage=2605>
95. Fernández-Hernando C, Ramírez CM, Goedeke L, Suárez Y. MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013;33:178–85.
96. Feng J, Xing W, Xie L. Regulatory roles of microRNAs in diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:1–12.
97. Zhao X, Xu D, Li Y, Zhang J, Liu T, Ji Y, et al. MicroRNAs regulate bone metabolism. *J. Bone Miner. Metab.* 2014;32:221–31.
98. Fu SW, Lee W, Coffey C, Lean A, Wu X, Tan X, et al. miRNAs as potential biomarkers in early breast cancer detection following mammography. *Cell Biosci.* [Internet]. BioMed Central; 2016;6:6. Available from: <http://www.cellandbioscience.com/content/6/1/6>
99. Yan H, Ma F, Zhang Y, Wang C, Qiu D, Zhou K, et al. miRNAs as biomarkers for diagnosis of heart failure: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* [Internet]. 2017;96:e6825. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00005792-201706020-00009%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28562533%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5459698>
100. Natarajan MK and R. MicroRNAs in diabetic nephropathy: functions, biomarkers, and therapeutic targets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015;1353:72–88.
101. Liu C-C, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* [Internet]. 2013;5:210–33. Available from:

<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1759720X13485503>

102. Claudine Seeliger, Katrin Karpinski, Alexander T Haug, Helen Vester, Andreas Schmitt JSB, Griensven and M van. Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2014;29:1718–1728.
103. CAI X. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna* [Internet]. 2004;10:1957–66. Available from: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.7135204>
104. Han J, Lee Y, Yeom K, Kim Y, Jin H, Kim VN. The Drosha – DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004;3016–27.
105. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell.* 2006;125:887–901.
106. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* (80-.). 2004;303:95–8.
107. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;12:846–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3079>
108. Thimmaiah P. Chendrimada, Richard I. Gregory, Easwari Kumaraswamy J, Norman, Neil Cooch, Kazuko Nishikura and RS. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005;436:740–744.
109. Kawamata T, Seitz H, Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;16:953–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1630>
110. Zhang X, Zeng Y. The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:7689–97.
111. Landthaler M, Gaidatzis D, Rothballer A, Chen PY, Soll SJ, Dinic L, et al. Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *Rna* [Internet]. 2008;14:2580–96. Available from: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.1351608>
112. Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* 2008;49:493–500.
113. Ro S, Park C, Young D, Sanders KM, Yan W. Tissue-dependent paired expression of

- miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:5944–53.
114. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2007;104:9667–72. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0703820104>
115. Gu S, Jin L, Zhang F, Sarnow P, Kay MA. The biological basis for microRNA target restriction to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16:144–50.
116. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120:15–20.
117. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 2006;20:515–24.
118. Merrick WC. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene.* 2004;332:1–11.
119. Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin Y V., Parsyan A, Huck L, Murata T, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* (80-.). 2007;317:1764–7.
120. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G Cap Binding-like Motif within Human Ago2 Represses Translation. *Cell.* 2007;129:1141–51.
121. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* 1999;216:671–80.
122. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* (80-.). 2006;312:75–9.
123. Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. Stress-induced Reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2006;71:513–21.
124. Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2006;103:8721–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602831103>
125. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. [Internet]. 2008;105:13906–11. Available from:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0804438105>
126. Inose H, Ochi H, Kimura A, Fujita K, Xu R, Sato S, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2009;106:20794–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0909311106>
127. Itoh T, Nozawa Y, Akao Y. MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5. *J. Biol. Chem.* 2009;284:19272–9.
128. Ulsamer A, Ortuño MJ, Ruiz S, Susperregui ARG, Osses N, Rosa JL, et al. BMP-2 induces osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38. *J. Biol. Chem.* 2008;283:3816–26.
129. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;368:267–72.
130. Jian Huang, Lan Zhao, Lianping Xing and DC. MicroRNA-204 Regulates Runx2 Protein Expression and Mesenchymal Progenitor Cell Differentiation. *Stem Cells.* 2010;28:357–364.
131. Oskowitz AZ, Lu J, Penforis P, Ylostalo J, McBride J, Flemington EK, et al. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: Regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2008;105:18372–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0809807105>
132. Sengupta S, den Boon JA, Chen I-H, Newton MA, Stanhope SA, Cheng Y-J, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2008;105:5874–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0801130105>
133. Bradshaw AD. The role of SPARC in extracellular matrix assembly. *J. Cell Commun. Signal.* 2009;3:239–46.
134. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2008;105:13027–32. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0805038105>
135. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 2009;284:15676–84.

136. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J. Biol. Chem.* 2010;285:25221–31.
137. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* 2006;16:151–8.
138. Tao Wang ZX. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;402:186–189.
139. William J. Boyle, W. Scott Simonet, David L. Lacey. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423:337–42.
140. Cohen-Solal ME, Graulet AM, Denne MA, Gueris J, Baylink D de VM. Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: involvement of cytokines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993;77:1648–53.
141. Wang Y, Li L, Moore BT, Peng XH, Fang X, Lappe JM, et al. Mir-133a in human circulating monocytes: A potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. *PLoS One.* 2012;7:1–7.
142. Daswani B, Gupta MK, Gavali S, Desai M, Sathe GJ, Patil A, et al. Monocyte Proteomics Reveals Involvement of Phosphorylated HSP27 in the Pathogenesis of Osteoporosis. *Dis. Markers.* Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015.
143. Chen XD, Xiao P, Lei SF, Liu YZ, Guo YF, Deng FY, et al. Gene expression profiling in monocytes and SNP association suggest the importance of the gene for osteoporosis in both Chinese and Caucasians. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25:339–55.
144. de la Rica L, García-Gómez A, Comet NR, Rodríguez-Ubreva J, Ciudad L, Vento-Tormo R, et al. NF- κ B-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome Biol.* 2015;16:1–17.
145. Kyeong-sook lee, Hyun-jung kim, Qing-lin li, Xin-zi chi C ueta, Toshihisa komori, john m. Wozney, eung-gook kim je-young choi, Hyun-mo ryoo and suk-chul bae. Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor b1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. *Am. Soc. Microbiol. All Rights Reserv.* 2000;20:8783–8792.
146. Itoh T, Takeda S, Akao Y. MicroRNA-208 modulates BMP-2-stimulated mouse preosteoblast differentiation by directly targeting V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1. *J. Biol. Chem.* 2010;285:27745–52.
147. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets,

regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:251–63.

148. Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, et al. Osteoclast-specific dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. *J. Cell. Biochem.* 2010;109:866–75.

149. Barroso-Del Jesus A, Lucena-Aguilar G, Menendez P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle.* 2009;8:394–8.

150. Taganov KD, Boldin MP, Chang K-J, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [Internet]. 2006;103:12481–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605298103>

151. Zhao Y, Xie Z, Lin J, Liu P. MiR-144-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma by targeting c-Met. *Am J Transl Res.* 2017;9:2437–46.

152. Chunqing Wang, Hanliang He, Liang Wang, Yu Jiang YX. Reduced miR-144-3p expression in serum and bone mediates 1 osteoporosis. *Biochem. Cell Biol.* 2017;1–31.

153. Sugatani T, Hruska KA. MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. *J. Cell. Biochem.* 2007;101:996–9.

154. Kagiya T, Nakamura S. Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation. *J. Periodontal Res.* 2013;48:373–85.

155. Yang N, Wang G, Hu C, Shi Y, Liao L, Shi S, et al. Tumor necrosis factor α suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 2013;28:559–73.

156. Hu CH, Sui BD, Du FY, Shuai Y, Zheng CX, Zhao P, et al. MIR-21 deficiency inhibits osteoclast function and prevents bone loss in mice. *Sci. Rep.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;7:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep43191>

157. Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K, et al. miR-21 Gene Expression Triggered by AP-1 Is Sustained through a Double-Negative Feedback Mechanism. *J. Mol. Biol.* 2008;378:492–504.

158. Sugatani T, Vacher J, Hruska KA, Dc W, Sugatani T, Vacher J, et al. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood.* 2012;117:3648–57.

159. Palacios VG, Robinson LJ, Borysenko CW, Lehmann T, Kalla SE, Blair HC. Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 cells by estrogen and phytoestrogens. *J. Biol. Chem.* 2005;280:13720–7.

160. Sugatani T, Hruska KA. Down-regulation of miR-21 biogenesis by estrogen action contributes to osteoclastic apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 2013;114:1217–22.
161. Tang L, Yin Y, Liu J, Li Z, Lu X. MIR-124 Attenuates Osteoclastogenic Differentiation of Bone Marrow Monocytes Via Targeting Rab27a. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017;43:1663–72.
162. Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, McAllister S, Alvarez U, Wang D, et al. Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J. Biol. Chem.* 2000;275:11993–2002.
163. Mizoguchi F, Murakami Y, Saito T, Miyasaka N, Kohsaka H. MiR-31 controls osteoclast formation and bone resorption by targeting RhoA. *Arthritis Res. Ther.* 2013;15.
164. Zhang Y, Xie R -I., Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc. Natl. Acad. Sci. [Internet].* 2011;108:9863–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018493108>
165. Ji F, Zhang H, Wang Y, Li M, Xu W, Kang Y, et al. MicroRNA-133a, downregulated in osteosarcoma, suppresses proliferation and promotes apoptosis by targeting Bcl-xL and Mcl-1. *Bone [Internet]. Elsevier B.V.;* 2013;56:220–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2013.05.020>
166. Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng XH, Lappe JM, Recker RR, et al. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS One.* 2014;9:5–10.
167. Meng J, Zhang D, Pan N, Sun N, Wang Q, Fan J, et al. Identification of miR-194-5p as a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PeerJ [Internet].* 2015;3:e971. Available from: <https://peerj.com/articles/971>
168. Chen C, Cheng P, Xie H, Zhou H De, Wu XP, Liao EY, et al. MiR-503 regulates osteoclastogenesis via targeting RANK. *J. Bone Miner. Res.* 2014;29:338–47.
169. Guo LJ, Liao L, Yang L, Li Y, Jiang TJ. MiR-125a TNF receptor-associated factor 6 to inhibit osteoclastogenesis. *Exp. Cell Res.* 2014;321:142–52.
170. Van Der Eerden BCJ. MicroRNAs in the skeleton: Cell-restricted or potent intercellular communicators? *Arch. Biochem. Biophys. [Internet]. Elsevier Inc.;* 2014;561:46–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.04.016>
171. Jones SN, Lian JB. *NIH Public Access.* 2011;340:10–21.
172. Cabral HW, Andolphi BF, Ferreira B V, Alves DC, Morelato RL, Chambo AF, et al. The use of biomarkers in clinical osteoporosis. *Rev Assoc Med Bras [Internet].*

- 2016;62:368–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27437684>
173. Grey A, Bolland M, Wong S, Horne A, Gamble G, Reid IR. Low-Dose Zoledronate in Osteopenic Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* [Internet]. 2012;97:286–92. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2011-2081>
174. Jing D, Hao J, Shen Y, Tang G, Li M Le, Huang SH, et al. The role of microRNAs in bone remodeling. *Int. J. Oral Sci.* 2015;7:131–43.
175. Nakasa T, Shibuya H, Nagata Y, Niimoto T, Ochi M. The inhibitory effect of microRNA-146a expression on bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:1582–90.
176. Shibuya H, Nakasa T, Adachi N, Nagata Y, Ishikawa M, Deie M, et al. Overexpression of microRNA-223 in rheumatoid arthritis synovium controls osteoclast differentiation. *Mod. Rheumatol.* 2013;23:674–85.
177. Denova-Gutiérrez E, Flores YN, Gallegos-Carrillo K, Ramírez-Palacios P, Rivera-Paredes B, Muñoz-Aguirre P, et al. Health workers cohort study: methods and study design. *Salud Publica Mex.* 2016;58:708.
178. Denova-Gutierrez E, Castanon S, Talavera JO, Flores M, Macias N, Rodriguez-Ramirez S, et al. Dietary Patterns Are Associated with Different Indexes of Adiposity and Obesity in an Urban Mexican Population. *J. Nutr.* [Internet]. 2011;141:921–7. Available from: <http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.110.132332>
179. Foucher C, Vachenc S, Menicacci A, Gerstmayer B, Henrion G, Janssen U, et al. Isolation of monocytes with high purity directly from whole blood for transcriptome analysis in translational research Isolation of monocytes with high purity directly from whole blood for transcriptome analysis in translational research. *MACS&more.* 2013;15:14–7.
180. Trajkovski I, Lavrač N, Tolar J. SEGS: Search for enriched gene sets in microarray data. *J. Biomed. Inform.* 2008;41:588–601.
181. Alexa A, Rahnenführer J, Lengauer T. Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics.* 2006;22:1600–7.
182. Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, Maulik D, Drees B, Hamilton J, et al. Correlation of obesity and osteoporosis: Effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 2008;23:17–29.
183. Jevon M, Hirayama T, Brown MA, Wass JAH, Sabokbar A, Ostelere S, et al. Osteoclast formation from circulating precursors in osteoporosis. *Scand. J. Rheumatol.*

2003;32:95–100.

184. Lin X, Yu H, Zhao C, Qian Y, Hong D, Huang K, et al. The Peripheral Blood Mononuclear Cell Count Is Associated With Bone Health in Elderly Men. *Medicine (Baltimore)*. [Internet]. 2016;95:e3357. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201604120-00056>
185. Wouters K, Gaens K, Bijnen M, Verboven K, Jocken J, Wetzels S, et al. Circulating classical monocytes are associated with CD11c+ macrophages in human visceral adipose tissue. *Sci. Rep.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;7:42665. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep42665>
186. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 2006;7:1–14.
187. Kimura T, Jiang S, Yoshida N, Sakamoto R, Nishizawa M. Interferon-alpha competing endogenous RNA network antagonizes microRNA-1270. *Cell. Mol. Life Sci.* [Internet]. Springer Basel; 2015;72:2749–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-015-1875-5>
188. Ginaldi L, Di Benedetto M, De Martinis M, Delmas P, Yun A, Lee P, et al. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun. Ageing* [Internet]. 2005;2:14. Available from: <http://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4933-2-14>
189. Zhong L, Zheng C, Fang H, Xu M, Chen B, Li C. MicroRNA-1270 is associated with poor prognosis and its inhibition yielded anticancer mechanisms in human osteosarcoma. *IUBMB Life* [Internet]. 2018;1–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.1753>
190. Waseem M, Ahmad MK, Srivatava VK, Rastogi N, Serajuddin M, Kumar S, et al. Evaluation of miR-711 as novel biomarker in prostate cancer progression. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 2017;18:2185–91.
191. Chong GO, Jeon H-S, Han HS, Son JW, Lee YH, Hong DG, et al. Differential MicroRNA Expression Profiles in Primary and Recurrent Epithelial Ovarian Cancer. *Anticancer Res.* [Internet]. 2015;35:2611–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25964536>
192. Gao Y, Ma H, Gao C, Lv Y, Chen XH, Xu R, et al. Tumor-promoting properties of miR-8084 in breast cancer through enhancing proliferation, suppressing apoptosis and inducing epithelial-mesenchymal transition. *J. Transl. Med.* 2018;16:1–13.
193. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. MiRWalk - Database: Prediction of possible

- miRNA binding sites by “ walking” the genes of three genomes. *J. Biomed. Inform.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;44:839–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.002>
194. Bradley EW, Ruan MM, Vrable A, Oursler MJ. Pathway crosstalk between Ras/RAF and PI3K in promotion of M-CSF-induced MEK/ERK-mediated osteoclast survival. *J. Cell. Biochem.* 2008;104:1439–51.
195. Lee K, Chung YH, Ahn H, Kim H, Rho J, Jeong D. Selective regulation of MAPK signaling mediates RANKL-dependent osteoclast differentiation. *Int. J. Biol. Sci.* 2016;12:235–45.
196. Lee YS, Kim YS, Lee SY, Kim GH, Kim BJ, Lee SH, et al. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;47:926–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2010.08.001>
197. Wang Y, Dong G, Jeon HH, Elazizi M, La LB, Hameedalddeen A, et al. FOXO1 Mediates RANKL-Induced Osteoclast Formation and Activity. *J. Immunol.* [Internet]. 2015;194:2878–87. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1402211>
198. Chen J, Long F. MTOR signaling in skeletal development and disease. *Bone Res.* 2018;6.
199. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor- α (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 2001;276:563–8.
200. Ji X, Chen X, Yu X. MicroRNAs in osteoclastogenesis and function: Potential therapeutic targets for osteoporosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17.
201. Papaioannou G, Mirzamohammadi F, Kobayashi T. Ras signaling regulates osteoprogenitor cell proliferation and bone formation. *Cell Death Dis.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;7:e2405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2016.314>
202. Bozec A, Bakiri L, Jimenez M, Schinke T, Amling M, Wagner EF. Fra-2/AP-1 controls bone formation by regulating osteoblast differentiation and collagen production. *J. Cell Biol.* 2010;190:1093–106.
203. Kramer I, Baertschi S, Halleux C, Keller H, Kneissel M. Mef2c deletion in osteocytes results in increased bone mass. *J. Bone Miner. Res.* 2012;27:360–73.
204. Duttonhoefer F, Biswas SK, Igwe JC, Sauerbier S, Bierhaus A. Sp1-Dependent Regulation of PPAR α in Bone Metabolism. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* [Internet]. 2014;29:e107–16. Available from:

http://www.quintpub.com/journals/omi/abstract.php?article_id=13891

205. Otero JE, Dai S, Alhawagri MA, Darwech I, Abu-Amer Y. IKK α activation is sufficient for RANK-independent osteoclast differentiation and osteolysis. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25:1282–94.

206. Zhou XH, Yang CQ, Zhang CL, Gao Y, Yuan H Bin, Wang C. RASSF5 inhibits growth and invasion and induces apoptosis in osteosarcoma cells through activation of MST1/LATS1 signaling. *Oncol. Rep.* 2014;32:1505–12.

207. Brommage R, Liu J, Hansen GM, Kirkpatrick LL, Potter DG, Sands AT, et al. High-throughput screening of mouse gene knockouts identifies established and novel skeletal phenotypes. *Bone Res.* 2015;2.

208. Li B, Boast S, Santos KDL, Schieren I, Quiroz M, Teitelbaum SL, et al. Mice deficient in *Abl* are osteoporotic and have defects in osteoblast maturation. 2000;24.

209. Li J. JAK-STAT and bone metabolism. 2013;1–8.

210. Saito E, Suzuki D, Kurotaki D, Mochizuki A, Manome Y, Suzawa T, et al. Down-regulation of *Irf8* by *Lyz2-cre/loxP* accelerates osteoclast differentiation in vitro. *Cytotechnology.* Springer Netherlands; 2017;69:443–50.

211. Yáñez A, Goodridge HS. Interferon regulatory factor 8 and the regulation of neutrophil, monocyte, and dendritic cell production. *Curr. Opin. Hematol.* 2016;23:11–7.

212. Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, et al. Interferon regulatory factor 8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat. Med.* 2010;15:1066–71.

213. Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi SI, Tsujita T, et al. DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. *Nat. Med.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;21:281–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3774>

214. Leomil LF, Magno G, Almeida DF, Franck JD, Blangy A, Uzé G, et al. Interferon- α and - β Differentially Regulate Osteoclastogenesis : Role of Differential Induction of Chemokine CXCL11 Expression Linked references are available on JSTOR for this article : Interferon- α and - β differentially regulate osteoclastogenesis : 2016;

215. Shi C, Pamer EG. Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2014;11:762–74.

216. Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, et al. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J. Bone Miner. Res.* 2005;20:1185–94.

217. Drph JAC. Defining Ethnic and Racial Differences in Osteoporosis and Fragility

- Fractures. 2011;1891–9.
218. Duronio RJ, Xiong Y. Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5:1–12.
219. Xu G, Guo Y, Xu D, Wang Y, Shen Y, Wang F, et al. TRIM14 regulates cell proliferation and invasion in osteosarcoma via promotion of the AKT signaling pathway. *Sci. Rep.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;7:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep42411>
220. Welf ES, Haugh JM. Signaling pathways that control cell migration: models and analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Medicine.* 2011;3:231–40.
221. Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int. J. Cell Biol.* 2012;2012.
222. Zhao X, Guan JL. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;63:610–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.11.001>
223. Döppler H, Storz P. Regulation of VASP by phosphorylation Consequences for cell migration. *Cell Adhes. Migr.* 2013;7:482–6.
224. Auerbuch V, Loureiro JJ, Gertler FB, Theriot JA, Portnoy DA. Ena/VASP proteins contribute to *Listeria monocytogenes* pathogenesis by controlling temporal and spatial persistence of bacterial actin-based motility. *Mol. Microbiol.* 2003;49:1361–75.
225. Carmona G, Perera U, Gillett C, Naba A, Law AL, Sharma VP, et al. Lamellipodin promotes invasive 3D cancer cell migration via regulated interactions with Ena/VASP and SCAR/WAVE. *Oncogene* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;35:5155–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2016.47>
226. Niforou KN, Anagnostopoulos AK, Vougas K, Kittas C, Gorgoulis VG, Tsangaris GT. The proteome profile of the human osteosarcoma U2OS cell line. *Cancer Genomics and Proteomics.* 2008;5:63–77.
227. Lee Y, Kim HH. The role of Jak/STAT pathways in osteoclast differentiation. *Biomol. Ther.* 2011;19:141–8.
228. Naumann RW. The role of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway in the development and treatment of uterine cancer. *Gynecol. Oncol.* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;123:411–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.08.002>
229. Huang J, Chen D. MiRNAs in circulation: Mirroring bone conditions? *J. Bone Miner. Res.* 2014;29:1715–7.
230. Liu YZ, Dvornyk V, Lu Y, Shen H, Lappe JM, Recker RR, et al. A novel

pathophysiological mechanism for osteoporosis suggested by an in vivo gene expression study of circulating monocytes. *J. Biol. Chem.* 2005;280:29011–6.