



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE MICRORNAS EN SUERO: BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES NO  
INVASIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. CARRILLO PATIÑO SERGIO RAFAEL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAFAEL VELÁZQUEZ CRUZ**

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

**COMITÉ TUTOR: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN**

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

**DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-IZTACALA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**ANÁLISIS DE MICRORNAS EN SUERO: BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES NO  
INVASIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. CARRILLO PATIÑO SERGIO RAFAEL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RAFAEL VELÁZQUEZ CRUZ**

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

**COMITÉ TUTOR: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN**

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

**DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-IZTACALA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/166/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de noviembre de 2022** aprobó la ratificación del jurado asignado en el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 7 de octubre de 2019, para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **CARRILLO PATIÑO SERGIO RAFAEL** con número de cuenta **307025403** con la tesis titulada **“ANÁLISIS DE MICRORNAS EN SUERO: BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES NO INVASIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA OSTEOPOROSIS”**, realizada bajo la dirección del **DR. RAFAEL VELÁZQUEZ CRUZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JUAN MIRANDA RÍOS  
Vocal: DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO  
Vocal: DRA. ELENA ARÉCHAGA OCAMPO  
Vocal: DR. EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ  
Secretario: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 09 de febrero de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo de tesis fue posible gracias al apoyo de:

El posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca asignada con el CVU/No. de registro 814804.

El Instituto Nacional de Medicina Genómica y el Comité de Investigación del Instituto, por el apoyo designado con el ID de Proyecto: #198 11/20/2015/I

El Dr. Rafael Velázquez Cruz quien dirigió este proyecto y tuvo la paciencia de guiarme y apoyarme durante todo este tiempo. Muchas gracias por la confianza y dedicación.

La Dra. Miriam Rodríguez Sosa y el Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón, miembros de mi Comité tutorial, sus comentarios acertados y asesorías fueron de gran valor para la realización de este proyecto.

## **Agradecimientos Personales**

El Laboratorio de Genómica del Enfermedades Óseas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Agradezco enormemente el apoyo y de mis compañeros de laboratorio quienes se convirtieron en grandes amigos con los cuales tuve la fortuna de compartir momentos muy significativos.

De manera especial agradezco al Dr. Frank Jimenez Ortega, de quien admiro su pasión por la ciencia y su facilidad para transmitir el conocimiento. Muchas gracias por tu amistad y apoyo.

A mi familia, especialmente a mi madre, padre, hermana e incluso a mis mascotas, por el amor, paciencia y esperanza para mi persona que siempre han sido constantes.

A mi abuela María Estrada Ramírez, eres, fuiste y serás un pilar importante en mi vida, me hubiese gustado compartir este logro contigo.

# ÍNDICE

## ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE TABLAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
TEJIDO ÓSEO.....	3
MATRIZ EXTRACELULAR .....	4
CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO .....	4
(i) Osteoblastos.....	5
(ii) Osteocitos .....	8
(iii) Osteoclastos .....	10
<b>MODELADO Y REMODELADO ÓSEO</b> .....	12
Modelado óseo .....	12
Remodelado óseo .....	13
1)Activación.....	15
2) Resorción .....	15
3) Reversa .....	16
4) Formación .....	16
5) Terminación/Mineralización .....	17
<b>ENFERMEDADES ÓSEAS</b> .....	18
Osteoporosis .....	19
Osteoporosis primaria.....	20
Osteoporosis secundaria.....	22
<b>DIAGNÓSTICO</b> .....	22
<b>EPIDEMIOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS</b> .....	27
<b>OSTEOPOROSIS EN MÉXICO</b> .....	30
<b>NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO</b> .....	33
<b>BIOGÉNESIS DE LOS MICRORNAS</b> .....	35
<b>MiRNAs CIRCULANTES</b> .....	37
<b>MiRNAs COMO BIOMARCADORES</b> .....	40
miRNAs y osteoporosis .....	41



ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO .....	44
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
JUSTIFICACIÓN .....	46
OBJETIVO GENERAL.....	47
Objetivos particulares .....	47
METODOLOGÍA.....	48
Población de estudio. Fase de descubrimiento.....	48
Evaluaciones antropométricas y bioquímicas en sujetos de estudio .....	49
Extracción de RNA en suero.....	49
Control de calidad de muestras de suero y RNA .....	50
Procesamiento de muestras de miRNAs .....	51
Análisis de miRNAs en suero. Fase de descubrimiento .....	51
Fase de validación .....	53
Análisis de expresión de miRNAs – Fase de Validación .....	53
Análisis de curvas ROC.....	54
Análisis Estadístico .....	55
Predicción de genes blanco y Red de interacción .....	55
RESULTADOS .....	57
Características clínicas.....	57
Análisis de microRNAs – Etapa de descubrimiento .....	58
Análisis de miRNAs – Etapa de validación .....	60
Análisis de curvas ROC: Normal vs Osteoporosis.....	63
Análisis de curvas ROC: Normal vs Fractura .....	63
Correlación de la DMO de cadera y niveles séricos de los miRNAs analizados.....	64
Predicción de genes blanco y Análisis in silico .....	65
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	74
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de un hueso largo.....	4
<b>Figura 2.</b> Diferenciación de las células óseas formadoras. ....	8
<b>Figura 3.</b> Tipos de células del hueso. ....	12
<b>Figura 4.</b> Fases del proceso de remodelado óseo dentro de una unidad multicelular básica (UMB).....	18
<b>Figura 5.</b> Densitometría ósea por absorciometría de rayos X de energía dual (DXA). ....	24
<b>Figura 6.</b> Factores determinantes de la resistencia ósea. ....	25
<b>Figura 7.</b> Índice anual de fracturas de cadera (hombres y mujeres) en el mundo clasificadas por riesgo.....	30
<b>Figura 8.</b> Prevalencia de la Osteoporosis en México. ....	31
<b>Figura 9.</b> Frecuencia de personas con osteopenia u osteoporosis.....	32
<b>Figura 10.</b> Principales fracturas en México. ....	32
<b>Figura 11.</b> Biogénesis y comunicación intercelular de los microRNAs. ....	37
<b>Figura 12.</b> Resumen de fluidos biológicos conteniendo RNA. ....	40
<b>Figura 13.</b> Análisis de expresión diferencial de miRNAs. ....	59
<b>Figura 14.</b> Heatmap (mapa de calor) de la expresión diferencial entre los grupos. ....	60
<b>Figura 15.</b> Expresión relativa en la fase de validación para el hsa-miR-140-3p, hsa-miR-23b y hsa-miR-885-5p en los grupos de Normal, Osteoporosis y Fractura. ....	62
<b>Figura 16.</b> Análisis de curvas ROC: Normal vs Osteoporosis. ....	63
<b>Figura 17.</b> Análisis de curvas ROC: Normal vs Fractura. ....	64
<b>Figura 18.</b> Análisis de correlación entre la variable DMO y la expresión del miRNA. ....	65
<b>Figura 19.</b> Búsqueda de genes blanco totales en bases de datos para el hsa-miR-140-3p y el hsa-miR-23b-3p. ....	66
<b>Figura 20.</b> Red de interacción de miRNAs y sus genes blanco. ....	67
<b>Figura 21.</b> Análisis funcional in silico de la regulación de miR-140-3p y el miR-23b-3p en la diferenciación de osteoblastos. ....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Definiciones de Osteoporosis basadas en la DMO de acuerdo con la OMS. ....	23
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico de las osteoporosis comúnmente disponibles.....	27
<b>Tabla 3.</b> Número estimado de fracturas osteoporóticas por sitio, en hombres y mujeres de 50 años o más en el año 2000 por región (OMS).....	28
<b>Tabla 4.</b> Costos directos e indirectos en el tratamiento de fracturas de cadera. ....	33
<b>Tabla 5.</b> Marcadores bioquímicos clásicos del remodelado óseo. ....	34
<b>Tabla 6.</b> Nuevos marcadores biológicos del metabolismo óseo en osteoporosis.....	35
<b>Tabla 7.</b> miRNAs expresados en tejidos específicos .....	38
<b>Tabla 8.</b> Características de la población de estudio. ....	58
<b>Tabla 9.</b> Valores de cambio y significancia de los miRNAs con expresión diferencial. ....	60
<b>Tabla 10.</b> Valores de análisis de curvas ROC.....	64
<b>Tabla 11.</b> Análisis de vías KEGG para genes blanco del miR-23b-3p & miR-140-3p, relacionados al metabolismo óseo.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>5'-tRNA:</b> Extremo 5' del RNA de transferencia	<b>CTNNBIP1:</b> Gen codificante de la $\beta$ -catenina 1
<b>Ago:</b> Argonauta	<b>Curvas ROC:</b> Curvas de característica operativa del receptor
<b>AKT1:</b> Gen que codifica a la Serina/Treonina cinasa 1	<b>DE:</b> Desviación estándar
<b>AKT2:</b> Gen que codifica a la Serina/Treonina cinasa 2	<b>DGCR8:</b> Proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome de DiGeorge
<b>AKT3:</b> Gen que codifica a la Serina/Treonina cinasa 3	<b>DKK-1:</b> Dickkopf-1, inhibidor de la vía WNT
<b>ALP:</b> Fosfatasa alcalina	<b>Dlx5:</b> Distal-less homebox 5
<b>ATP:</b> Trifosfato de adenosina	<b>DMO:</b> Densidad mineral ósea, cantidad de minerales por área de hueso
<b>AUC:</b> Área bajo la curva	<b>DMP1:</b> Fosfoproteína ácida de matriz de dentina 1
<b>BMP2:</b> Proteína morfogénica del hueso 2	<b>DXA:</b> Absorciometría de Rayos X de energía dual
<b>BMP2:</b> Proteína morfogénica del hueso 2	<b>EVOS:</b> Estudio Europeo de Osteoporosis Vertebral
<b>BMP4:</b> Proteína morfogénica del hueso 4	<b>FC:</b> Fold change, valor de cambio
<b>BMP6:</b> Proteína morfogénica del hueso 6	<b>FDR:</b> False Discovery Rate, tasa de descubrimientos falsos
<b>BMP7:</b> Proteína morfogénica del hueso 7	<b>FGF-23:</b> Factor de crecimiento fibroblástico 23
<b>BMPs:</b> Proteínas morfogénicas del hueso	<b>FOXO3:</b> Forkhead Box O3
<b>BMU:</b> Unidad multicelular básica	<b>FRAX:</b> Herramienta de evaluación del riesgo de fractura
<b>BSP:</b> Sialoproteína ósea	<b>GSK3B:</b> Glucógeno sintasa cinasa 3 beta
<b>CCL2:</b> Quimiocina de ligando C-C 2	<b>IGF-1:</b> Factor de crecimiento insulínico tipo 1
<b>CCL7:</b> Quimiocina de ligando C-C 7	<b>IGF-2:</b> Factor de crecimiento insulínico tipo 2
<b>CCL8:</b> Quimiocina de ligando C-C 7	<b>IL-1:</b> Interleucina-1
<b>CD44:</b> Antígeno CD44	<b>IL-11:</b> Interleucina-11
<b>cdNA:</b> DNA complementario	<b>IL-6:</b> Interleucina-6
<b>c-Fos:</b> Proto-oncogen Fos	<b>IL6R:</b> Receptor de la interleucina 6
<b>Col1A1:</b> Colágeno tipo I $\alpha$ I	<b>IMC:</b> Índice de masa corporal
<b>CSF1 (M-CSF):</b> Factor estimulante de colonias de macrófagos	<b>IMSS:</b> Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>CSF-1R (C-FMS):</b> Receptor para el factor estimulante de colonias de macrófagos	<b>INR:</b> Instituto Nacional de Rehabilitación
<b>Ct:</b> Ciclo umbral, intersección entre la curva de amplificación y el umbral de fluorescencia.	
<b>CTIM:</b> Cohorte de Trabajadores IMSS Morelos	

**IOF:** Fundación Internacional de Osteoporosis

**IRF8:** Factor regulador de interferón 8

**ISCD:** Sociedad internacional de densitometría clínica

**KEEG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

**LAVOS:** Estudio Latinoamericano de Osteoporosis Vertebral

**lncRNA:** RNAs Largos no codificantes

**LRP5:** Lipoproteína receptora de baja densidad relacionada con la proteína 5

**LTB4:** Leucotrieno B4

**LTD4:** Leucotrieno D4

**miRNAs:** microRNAs

**MMP-9:** Metaloproteínasa de la matriz 9

**NFATc1:** factor nuclear de células T activadas citoplasmático 1

**NO:** Óxido nítrico

**OCN:** Osteocalcina

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ON:** Osteonectina

**OP:** Osteoporosis

**OPG:** Osteoprotegerina

**OPN:** Osteopontina

**Osx:** Osterix

**PCR multiplex:** Reacción en cadena de la polimerasa múltiple.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PGE<sub>2</sub>:** Dinoprostona, prostaglandina E2

**piRNA:** RNA asociado a Piwi

**pre-miRNA:** miRNA precursor

**pri-miRNAs:** microRNAs primarios

**PRKACB:** Proteína quinasa, subunidad catalítica activada por cAMP Beta

**PTH:** Hormona paratiroidea

**PTHR:** Receptor de la hormona paratiroidea

**PU-1:** Factor de transcripción hematopoyético 1

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa

**RANK:** Receptor activador del factor nuclear  $\kappa$  B

**RANKL:** Ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B

**RGD:** Secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp

**RISC:** Complejo de silenciamiento inducido por RNA

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNAm:** RNA mensajero

**RNU6:** Small nuclear RNU6

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa

**RUNX2:** Factor de transcripción 2 relacionado con Runt

**S1P:** Esfingosina-1 fosfato

**SMAD3:** Proteína 3 de la familia SMAD

**snoRNA:** RNA pequeño nucleolar

**snRNA:** RNA pequeño nuclear

**TCC:** Tomografías computarizadas cuantitativas

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TLDA:** Taqman Low Density Arrays

**TNF- $\alpha/\beta$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$

**TRAP:** Fosfatasa ácida resistente al tartrato

**T-score:** Índice de clasificación de la DMO en base a la distancia en DE a la media juvenil normal.

**V-ATPasa:** ATPasa tipo vacuolar H<sup>+</sup>

**WISP1:** Proteína 1 de la vía de señalización inducible por WNT

**Wnt-10b:** Proteína de la familia Wnt 10B

**Wnt-5a:** Proteína de la familia Wnt 5A

**WNT5B:** Miembro de la familia Wnt 5B

**XPO5:** Exportina 5

**Y-RNA:** RNA pequeño no codificante derivado de ribonucleoproteínas

**Z-score:** Índice de clasificación de la DMO en base a la distancia en DE a la media de una población de la misma edad y sexo.

## RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs cortos no codificantes de cadena sencilla, que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional a través de su unión a la región 3'-UTR de RNA mensajeros (RNAm) blanco. Los miRNAs tienen un papel clave en múltiples procesos biológicos y en vías fisiológicas y patológicas. Algunos miRNAs han sido asociados al remodelado óseo y a enfermedades metabólicas del hueso, como la osteoporosis (OP). Esta es una enfermedad sistémica caracterizada por la pérdida de masa ósea y deterioro de la microarquitectura del hueso. Los miRNAs son moléculas muy estables que pueden encontrarse en fluidos biológicos. Estos miRNAs circulantes reflejan alteraciones en las condiciones fisiológicas, por lo que podrían servir como marcadores de detección temprana en enfermedades como la osteoporosis. El objetivo principal de este trabajo fue identificar los miRNAs circulantes diferencialmente expresados en muestras de suero de mujeres mexicanas posmenopáusicas con osteoporosis (n = 20) y mujeres sanas (n = 20). La expresión de 754 microRNAs se analizó utilizando la plataforma Taqman Low Density Array (TLDA). La expresión diferencial de los miRNAs identificados se validó en muestras independientes mediante ensayos de RT-qPCR.

Se identificaron siete miRNAs con sobreexpresión en el grupo de mujeres con osteoporosis respecto al grupo de mujeres normales. De los siete miRNAs, se seleccionaron 3 miRNAs (miR-885-5p, miR-140-3p y miR-23b-3p) para ser validados en una cohorte independiente mediante PCR en tiempo real, basado en los niveles de expresión y significancia estadística (Incremento en la expresión = 2.27, p = 0.002; Incremento en la expresión = 20.74, p = 0.045; Incremento en la expresión = 40.56, p = 0.038 respectivamente). La cohorte de validación correspondió a pacientes sanas (n = 22), con osteoporosis (n = 44) y fractura de cadera debido a osteoporosis (n = 21). Los resultados indicaron que miR-140-3p y miR-23b-3p mostraron una sobreexpresión con diferencias significativas entre los grupos de estudio. Así mismo, los datos de las curvas ROC sugieren que los miR-140-3p y miR-23b-3p tienen un uso potencial como biomarcadores en el diagnóstico temprano de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas.

## **ABSTRACT**

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding single-stranded RNAs, which regulate gene expression at the post-transcriptional level through their binding to the 3'-UTR of target messenger RNAs (mRNA). MiRNAs have key roles in multiple biological processes and in numerous physiological and pathological pathways. Some miRNAs have been associated with bone remodeling and metabolic bone diseases, such as osteoporosis (OP), which is a systemic disease characterized by loss of bone mass and deterioration of bone microarchitecture. MiRNAs are very stable molecules that can be found in biological fluids. These circulating miRNAs reflect alterations in physiological conditions, so they could serve as early detection markers in diseases such as osteoporosis. The main objective of this work was to identify differentially expressed circulating miRNAs in serum samples of postmenopausal Mexican women with osteoporosis (n = 20) and healthy controls (n = 20). The expression of 754 miRNAs was analyzed using the Taqman Low Density Array (TLDA) platform. The differential expression of the identified miRNAs was validated in independent samples by RT-qPCR assays.

Seven miRNAs with overexpression in the group of osteoporotic women with respect to the group of normal women were identified. Of the seven miRNAs, 3 miRNAs were selected (miR-885-5p, miR-140-3p and miR-23b-3p) according to levels of expression and statistical significance, (Fold change = 2.27, p = 0.002; Fold change = 20.74, p = 0.045 and Fold change = 40.56, p = 0.038, respectively) for validation in independent serum samples from healthy patients (n = 22), with osteoporosis (n = 44) and hip fracture due to osteoporosis (n = 21). After validation, miR-140-3p and miR-23b-3p showed significant differences between the groups. Results from ROC tests suggest that these two miRNAs have a potential use as biomarkers in the early diagnosis of osteoporosis in postmenopausal women.



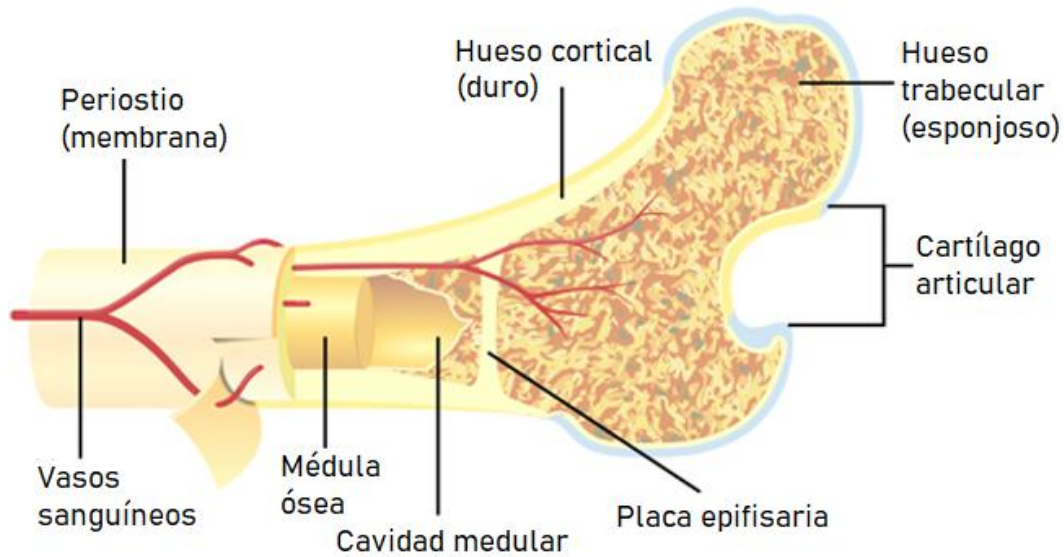
## INTRODUCCIÓN

### TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido conectivo altamente especializado caracterizado por su rigidez, flexibilidad y dureza. Es el principal sistema de soporte mecánico y de protección de los órganos vitales, además de proporcionar la regulación homeostática mineral de calcio y fósforo entre otros elementos, así como aportar el microambiente para la médula ósea y el desarrollo de células sanguíneas (Kini U. & Nandeesh B. N., 2012; Grabowski P., 2015).

La mayoría de los huesos presentan regiones con distinta densidad y macroscópicamente el hueso se clasifica en dos tipos de acuerdo al tamaño y la distribución de las cavidades medulares (Tortora & Derrickson, 2012; Marieb *et al.*, 2014; Brandi, 2009): 1) hueso cortical o compacto y 2) hueso trabecular o esponjoso (Figura 1). El primero se caracteriza por ser denso, sólido y rodear el espacio de la médula ósea. Está conformado por unidades llamadas osteonas o sistema de Havers que están organizados por un vaso sanguíneo central, anillos de matriz mineralizada y cavidades (lagunas y canalículos) que contienen a los osteocitos. Constituye aproximadamente el 80% del esqueleto y se encuentra en los ejes de los huesos largos (fémur, tibia y radio) y la superficie de los huesos planos (cráneo, tórax y pelvis) (Figura 1). El segundo está compuesto por una red irregular de placas delgadas y barras intercaladas denominadas trabéculas que se encuentran en el compartimiento de la médula ósea. Se encuentra principalmente en los extremos de los huesos largos y en el interior de los huesos planos (Dempster *et al.*, 2006).

Tanto el hueso cortical como el trabecular son muy similares en su composición celular y molecular, pero difieren significativamente en sus propiedades funcionales y mecánicas (Grabowski P., 2015).



**Figura 1.** Estructura de un hueso largo.

Se muestra la región cortical y trabecular del hueso, así como la posición de la médula ósea. Figura modificada de: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bone\\_cross-section\\_esp.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bone_cross-section_esp.jpg).

## MATRIZ EXTRACELULAR

El tejido óseo se compone principalmente por una abundante matriz extracelular mineralizada y las células óseas a las que rodea. La matriz extracelular está integrada por aproximadamente un 15% de agua, 30% de fibras colágenas (que determinan la flexibilidad y está comprendida principalmente por colágeno tipo I, proteoglicanos y proteínas no estructurales) y un 55% de minerales cristalizados (especialmente fosfato de calcio en forma de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  que le brinda rigidez (Tortora & Derrickson, 2012; Brandi, 2009).

## CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO

A nivel celular se han identificado tres tipos principales de células en el tejido óseo: (i) osteoblastos, (ii) osteocitos y (iii) osteoclastos, las cuales participan en los mecanismos moleculares del metabolismo óseo y en los eventos que involucran el proceso de remodelado.

### (i) Osteoblastos

Son células de origen mesénquimal pluripotenciales indiferenciadas que derivan en células osteoprogenitoras (Figura 2). Están encargadas de la síntesis y depósito de la matriz ósea, así como de su posterior mineralización, también se encargan de la regulación de los osteoclastos por medio de la síntesis de citocinas específicas (Simonet W. S. *et al.*, 1997).

Los osteoblastos son células mononucleadas, relativamente grandes con un tamaño que se encuentra entre los 20-30  $\mu\text{m}$  (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006). Se encuentran en la superficie del hueso y su forma común es cubica, aunque puede variar siendo plana o redonda dependiendo de la actividad celular. En estados de maduración avanzados se encuentran a lo largo de las unidades formadoras de hueso y adquieren la capacidad de secreción de la matriz ósea. En un estado de diferenciación final, algunos osteoblastos son atrapados en su propia matriz secretada, donde se convierten en osteocitos, y gradualmente dejan de sintetizar el osteoide (porción orgánica sin mineralizar de la matriz ósea, compuesta de fibras de colágeno, proteoglicanos, sulfato de condroitina y osteocalcina) (Kini U. & Nandeesh B. N., 2012). Durante el proceso de síntesis, secreción y mineralización del osteoide a la matriz ósea existente, los osteoblastos tienen una configuración polarizada (Damoulis P. D. & Hauschka P. V., 1997).

Correspondiente a su capacidad de síntesis de proteínas, los osteoblastos tienen un abundante retículo endoplásmico y un prominente aparato de Golgi, así como varias vesículas de secreción (Capulli M. *et al.*, 2014; Marks S. C. & Popoff S. N., 1988).

El proceso de diferenciación de células mesenquimales indiferenciadas hacia un linaje osteoprogenitor requiere de la expresión de genes específicos en una serie de pasos precisos, los cuales incluyen la síntesis de proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) y miembros de las vías Wingless (Wnt). Por otro lado, la expresión del factor de transcripción 2 relacionado con Runt (Runx2), el factor Distal-less homeobox 5 (Dlx5) y osterix (Osx) son de gran importancia para la diferenciación de

los osteoblastos (Florencio-Silva *et al.*, 2015, Capulli M. *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013).

Por su parte Runx2 es denominado el factor de transcripción maestro en la diferenciación de osteoblastos ya que regula genes relacionados al desarrollo y funcionamiento de los osteoblastos como Colágeno tipo I alfa I (Coll1A1), Fosfatasa alcalina (ALP), Sialoproteína ósea (BSP) y Osteocalcina (OCN) (Fakhry M. *et al.*, 2013).

Una vez que un grupo de progenitores de osteoblastos expresan Runx2 y Coll1A1 comienza una fase de proliferación, donde a partir de la expresión de la ALP son considerados preosteoblastos (Capulli M. *et al.*, 2014). En su transición de preosteoblastos a osteoblastos maduros comienzan a sintetizar distintas moléculas que intervienen en sus propiedades y funciones, con las cuales dirigen procesos citoplasmáticos hacia la matriz y células óseas vecinas. También poseen receptores para la hormona paratiroidea y los estrógenos, así como algunas hormonas, factores de crecimiento, señales mecánicas y otros estímulos que actúan a través de los osteoblastos (Harada S. & Rodan G.A., 2003).

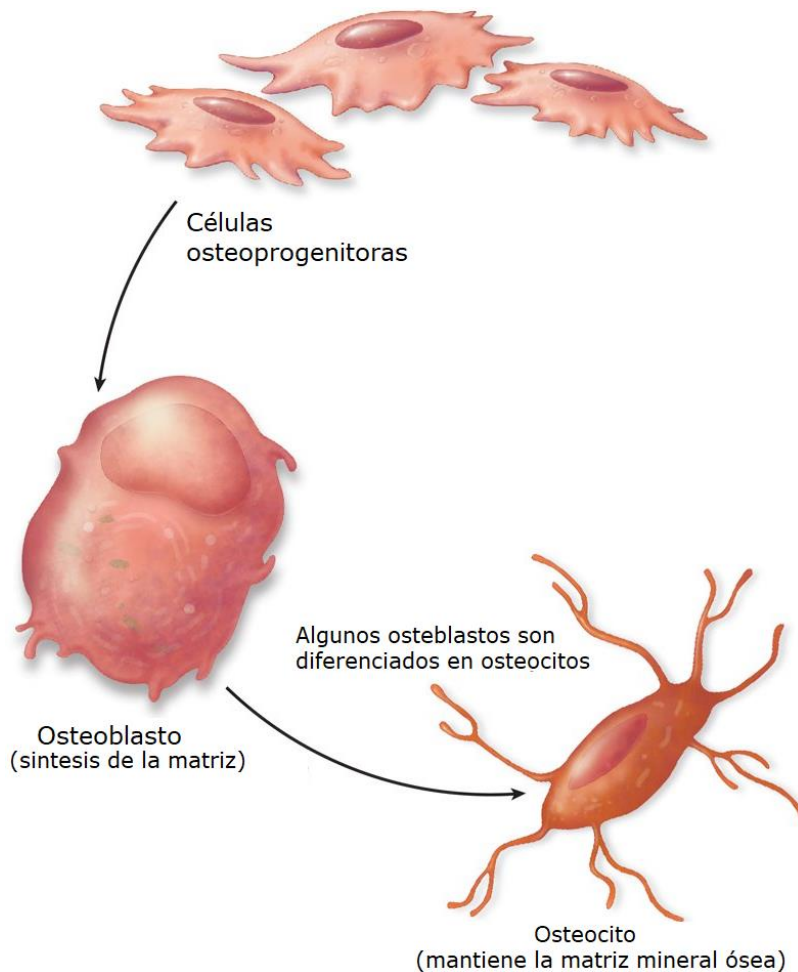
La síntesis del osteoide ocurre a un ritmo de 2 a 3  $\mu\text{m}$  al día y la ALP permite la mineralización a un ritmo de 1-2  $\mu\text{m}$  por día. La disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, también es controlada por los osteoblastos (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006).

El promedio de vida de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, después de esto solo algunos osteoblastos llegan a diferenciarse a osteocitos (~30%), mientras que otros pueden transformarse en células del revestimiento/recubrimiento óseo (~10%) y la gran mayoría derivan en muerte celular por apoptosis (~60%). Tanto los osteocitos como las células del revestimiento son estados de diferenciación más avanzados.

Las células del revestimiento, son células alargadas y planas, con orgánulos reducidos y el núcleo aplastado. Permanecen a lo largo de la superficie del hueso y pueden llegar a expresar marcadores osteoblásticos como BSP, ALP, osteopontina

(OPN), osteonectina (ON) y el receptor de la hormona paratiroidea PTHR. Su forma y actividad de secreción puede ser adquirida nuevamente de acuerdo al estado fisiológico del hueso (Donahue H. J. *et al.*, 1995, Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006).

Aunque su función no es del todo clara, se considera que constituyen una capa protectora de la superficie ósea, regulando el intercambio de iones dentro y fuera del medio extracelular del hueso. Además, previenen la interacción directa entre osteoclastos y la matriz ósea, cuando la resorción no es requerida. Su participación en la diferenciación de osteoclastos, produciendo osteoprotegerina (OPG) y el ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B (RANKL) también ha sido reportada por lo que son de gran importancia para la activación del remodelado óseo (Andersen T. L. *et al.*, 2009; Mosley J. R., 2000). Al igual que las demás células óseas, se consideran un componente relevante de las Unidades Multicelulares Básicas (BMU), una estructura presente durante el ciclo de remodelado óseo (Everts V., 2002).



**Figura 2.** Diferenciación de las células óseas formadoras.

Las células osteoprogenitoras pluripotenciales derivadas de tejido mesenquimal son modificadas en sus propiedades y funciones de acuerdo a la etapa de maduración dando lugar a los dos principales linajes que forman el hueso. Figura de: <http://acadameic.kellogg.cc.mi.us>

## (ii) Osteocitos

Los osteocitos son el tipo celular más abundante en el hueso, representan cerca del 90 al 95% de las células del tejido óseo y tienen un tiempo de vida por arriba de los 25 años (Franz-Odendaal T. A. *et al.*, 2006; Bonewald L. F., 2007), aunque son incapaces de llevar a cabo la división celular. Se originan durante la formación de hueso, a partir de la diferenciación final de los osteoblastos que son embebidos en el osteoide. Una vez que el osteoide se mineraliza los osteocitos son encontrados en huecos llamados lagunas y modifican su morfología distinguiéndose del osteoblasto. La morfología de los osteocitos diferenciados se caracteriza por la pérdida del 70% de sus orgánulos (retículo endoplasmático, aparato de Golgi y

núcleo), y citoplasma; lo cual corresponde con la disminución en su capacidad de síntesis y secreción de proteínas. Así mismo adquieren unas largas proyecciones citoplasmáticas, dándoles una forma dendrítica (Katsimbri, P., 2017; Dallas S. L. *et al.*, 2013; Schaffler M.B. *et al.*, 2013), como se observa en la Figura 2 y 3. Estas prolongaciones dan origen a una red de conexiones por túneles (red lacunar-canalicular) con otros osteocitos en la matriz mineralizada u osteoblastos en la superficie del hueso (Rocheffort *et al.*, 2010; Kamioka *et al.*, 2001).

Las uniones entre células son de tipo GAP, estas permiten la unión metabólica y eléctrica facilitando el transporte de moléculas, nutrimentos y de señalización (óxido nítrico (NO), prostaglandinas, ATP) debido a que también están en contacto con el sistema vascular (Civitelli R. *et al.*, 2002, Niedźwiedzki, T. & Filipowska, J. 2015). Las uniones intracelulares se componen principalmente por la familia de proteínas denominadas Conexinas (proteínas estructurales de membrana). En huesos envejecidos la eliminación de uniones intracelulares GAP o con la matriz puede ocasionar que algunas lagunas queden sin osteocitos, lo que sugiere que se encuentran bajo apoptosis (Kini U. & Nandeesh B. N., 2012).

No obstante que los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz, su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando variaciones mecánicas de las cargas y microdaños sufridos en el hueso por medio de la transducción de señales mecánicas a señales bioquímicas, y de esta manera regular la actividad de osteoblastos y osteoclastos (Lanyon L., 1993, Knothe Tate; 2003). De igual forma, los osteocitos se encargan de percibir cambios en los niveles de hormonas, tales como los estrógenos y glucocorticoides, que influyen en su supervivencia (Weinstein R.S. *et al.*, 1998, Tomkinson A. *et al.*, 1998).

Los osteocitos mantienen baja expresión de marcadores comunes con los osteoblastos como OCN, BSP, CollAI y ALP, sin embargo, se diferencian en el receptor de membrana CD44 que es específico para osteocitos y negativo en osteoblastos y células del revestimiento (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006). Otros marcadores propios del osteocito como la fosfoproteína ácida de matriz de dentina 1 (DMP1) y esclerostina son altamente expresados.

### (iii) Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas producidas a partir de la fusión de células precursoras mononucleadas (monocitos), que a su vez se derivan de células troncales hematopoyéticas. Estos monocitos también dan origen a células precursoras de macrófagos. Los osteoclastos son las únicas células conocidas encargadas de la resorción de la matriz mineral ósea (Kini U. & Nandeesh B. N., 2012) (Figura 3).

Los osteoclastos maduros se caracterizan por ser células grandes de ~100µm, y poseer una gran cantidad de mitocondrias y vacuolas en su citoplasma (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006). Se localizan en la superficie interna de las osteonas en el hueso cortical, en las trabéculas del hueso esponjoso y en la superficie externa de los huesos por debajo del periostio. En condiciones donde no hay crecimiento del esqueleto o presencia de alteraciones en el metabolismo óseo los osteoclastos tienen una baja presencia en los huesos y solo comprenden el 1 al 2% de las células óseas. Su tiempo de vida en promedio es de 2 semanas, después de esto sufren apoptosis (Väänänen H.K. & Zhao H., 2008, Arboleya, L. & Castañeda S., 2014)

El proceso de osteoclastogénesis comienza en las células troncales hematopoyéticas tras la exposición inicial del factor de transcripción PU-1, el cual es requerido para la producción de progenitores de linaje linfóide y granulocito-macrófágico. Después de esto, los precursores de osteoclastos expresan el receptor para el factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1R). El ligando o factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF1) es secretado por las células troncales mesenquimales y los osteoblastos, al unirse se desencadenan señales de proliferación y de supervivencia. En seguida se induce la expresión del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$  B (RANK) en la membrana de los precursores, permitiendo la unión con RANKL, secretado por los osteoblastos y osteocitos. La asociación de estos elementos promueve la activación de factores de transcripción y expresión de genes específicos para la diferenciación a osteoclastos maduros (Arboleya, L. & Castañeda S., 2014, Florencio-Silva *et al.*, 2015).

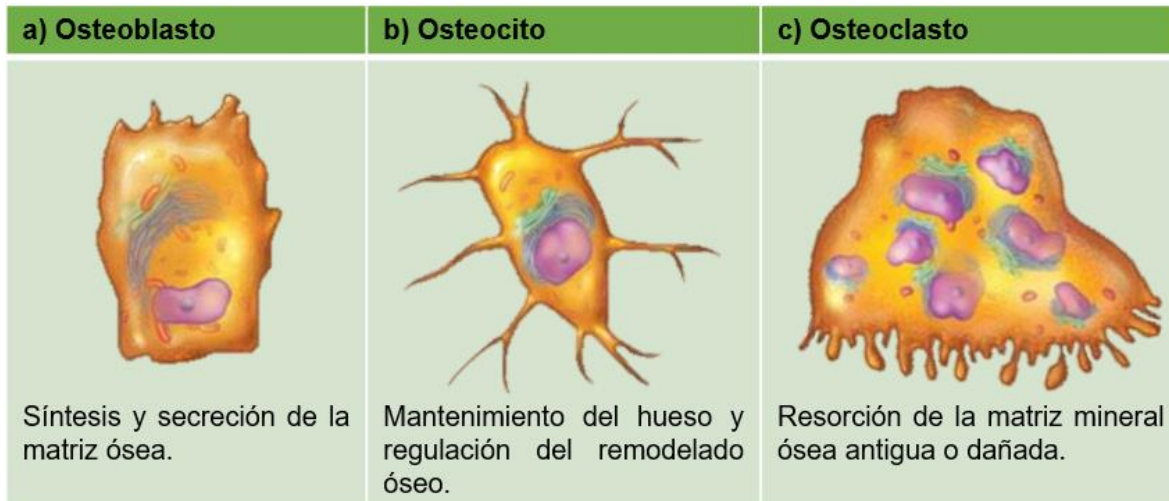


Existe otro elemento de control en la diferenciación de los osteoclastos conocido como OPG la cual es producida por distintos tipos celulares incluyendo los osteoblastos, preosteoblastos, osteocitos y células del revestimiento óseo. OPG se une a RANKL impidiendo la interacción RANK/RANKL y por lo tanto inhibiendo el proceso de osteoclastogénesis (Boyce B. F. & Xing I., 2008). Este sistema conocido como RANK/RANKL/OPG es clave en la diferenciación de osteoclastos (Phan.T.C.A. *et al.*, 2004).

RANK induce la activación del factor nuclear de células T activadas citoplasmático 1 (NFATc1) considerado el regulador maestro en la activación osteoclástica (Takayanagi, H. *et al.*, 2002, Nakashima T. *et al.*, 2012), ya que una vez translocado al núcleo permite la expresión de genes para el funcionamiento del osteoclasto como la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), catepsina K y el receptor de calcitonina (Raggatt L. J. & Partridge N. C., 2010).

Para llevar a cabo su función de resorción el osteoclasto maduro se polariza y se desplaza en el hueso por medio de podosomas abundantes en integrinas  $\alpha\beta 3$  (las cuales reconocen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), presente en el colágeno) y CD44 que le permiten interactuar con proteínas de la matriz como la osteopontina y la vitronectina, y así sellar herméticamente el sitio conocido como Laguna de Howship donde ocurre el intercambio de iones y proteasas por medio de lisosomas y endosomas (Arboleya, L. & Castañeda S., 2014; Grabowski P., 2015; Fernández-Tresguerres *et al.*, 2006).

En las Lagunas de Howship la bomba de protones V-ATPasa (ATPasa H<sup>+</sup> vacuolar) acidifica el sitio y permite la dilución de los cristales de hidroxiapatita (Crockett J. C. *et al.*, 2011). De la misma forma son secretadas en el sitio enzimas como la TRAP, catepsina K, Metaloproteinasa de la matriz 9 (MMP-9) y la Anhidrasa Carbónica que contribuyen a la degradación del hueso (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Los productos de degradación de la matriz son endocitados atravesando la célula y posteriormente vaciados al exterior por el polo opuesto, de esta forma el osteoclasto puede seguir el proceso de resorción sin desprenderse de la superficie ósea (Garmilla-Ezquerria, 2014).



**Figura 3.** Tipos de células del hueso.

Comparación de los diferentes tipos de células óseas. Los a) osteoblastos son células de un linaje maduro encargadas de la síntesis del hueso nuevo; los b) osteocitos son originados por aquellos osteoblastos que entran en un estado de maduración avanzado y se encargan del mantenimiento de la matriz ósea en la cual están inmersos; los osteoclastos tienen un origen hematopoyético y su función es digerir y reabsorber la matriz mineral ósea durante el remodelado. Figura modificada de: Marieb & Hoehn, 2013.

## MODELADO Y REMODELADO ÓSEO

El hueso a pesar de su apariencia inerte es un tejido dinámico, ya que se encuentra en constante adaptación durante la vida de los vertebrados alcanzando y conservando su tamaño, forma y estructura integral, así como regulando la homeostasis mineral por medio de dos procesos conocidos como modelado óseo y remodelado óseo (Raggatt & Patridge, 2010).

### Modelado óseo

El modelado óseo es el proceso en el cual los huesos sufren cambios en su forma y tamaño en respuesta a condiciones fisiológicas específicas y fuerzas mecánicas. De esta manera el hueso se adapta de forma gradual para conservar su resistencia. Las modificaciones de los huesos pueden derivar en ensanchamientos o cambios en su eje debido a fuerzas biomecánicas que ocasionan la adición o eliminación de hueso en la superficie. De acuerdo a la ley de Wolff, los huesos largos cambian su forma para ajustarse a la demanda mecánica que se les impone (Kini U. & Nandeesh B.N. *et al.*, 2012, Katsimbri, P., 2017).

Este proceso se lleva a cabo principalmente durante el crecimiento y es menos frecuente en la etapa adulta (Kobayashi S. *et al.*, 2003), aunque puede incrementarse después de una fractura o en patologías como el hiperparatiroidismo (Ubara Y. *et al.*, 2005), la osteodistrofia renal (Ubara Y. *et al.*, 2003) o por el tratamiento con sustancias anabólicas (Lindsay R. *et al.*, 2006).

El modelado óseo contrasta con el remodelado óseo ya que no requiere que haya una fase de resorción ósea previa a la de formación.

#### Remodelado óseo

El remodelado óseo es el proceso responsable de la eliminación y reparación de los huesos “viejos” o dañados por presencia de micro lesiones y fracturas mayores para mantener la integridad estructural del esqueleto, sus funciones metabólicas y la homeostasis mineral (Raggatt & Patridge, 2010, Kini U. & Nandeesh B. N., 2012).

Es un proceso altamente coordinado; promovido y modulado por distintos factores que comprenden elementos inflamatorios, cambios en niveles hormonales y ausencia de estímulos mecánicos. Este proceso involucra la resorción de hueso dada por los osteoclastos y la posterior formación de matriz ósea a cargo de los osteoblastos que finalmente serán mineralizados (Xiao W. *et al.*, 2016) (Figura 4).

En condiciones normales la resorción y la formación de hueso se encuentran en equilibrio, conservando la masa ósea estable, sin embargo, alteraciones en alguna de estas actividades conlleva al desarrollo de enfermedades óseas como la osteoporosis menopáusica, cuando la pérdida de hueso es mayor (incremento en la actividad de osteoclastos), y osteopetrosis cuando la formación de hueso es más intensa que su pérdida (mayor actividad de los osteoblastos) (Katsimbri, P. 2017). Otras enfermedades derivadas de esto son la artritis y afecciones periodontales (Jiao H. *et al.*, 2015).

Además de las células óseas ya descritas, distintas células pertenecientes a la respuesta inmune participan en este proceso: neutrófilos polimorfonucleares, células B, y células T. De la misma forma existen varias moléculas reguladoras de este proceso como la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-11,

Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (TNF- $\alpha/\beta$ ), quimiosinas (CCL2, CCL8 y CCL7), leucotrienos (LTB4 y LTD4), factores de crecimiento (IGF-1 e IGF-2), moléculas de la vía Wnt (Wnt-5a, Wnt-10b,  $\beta$ -catenina, axina y LRP5) y las proteínas morfogénicas del hueso (BMP2, BMP4, BMP6 y BMP7) (Xiao W. *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2007, Galliera *et al.*, 2008, Moura *et al.*, 2014).

La renovación del hueso ocurre constantemente a lo largo de la vida y en cualquier momento, aunque es hasta la tercera década de vida de una persona que se mantiene un balance positivo y se alcanza el pico máximo de masa ósea. Este es mantenido con pequeñas variaciones hasta aproximadamente los 50 años, donde a partir de este punto la actividad de resorción predomina y la masa ósea comienza a disminuir, afectando adultos mayores de ambos sexos, especialmente en mujeres con menopausia (Kini U. & Nandeesh B.N., 2012).

En una persona adulta normal, aproximadamente el 10% de la superficie de sus huesos se encuentra bajo una remodelación activa, mientras que el 90% se encuentra en un estado quiescente. Se calcula que el periodo de remodelado es aproximadamente de 6 meses, abarcando la mayor parte, la fase de formación. Así mismo se estima que cada año ~10% del esqueleto es renovado (Manolagas S. C. *et al.*, 2000). De acuerdo a lo anterior, existen más de un millón de sitios de remodelado microscópicos, y su número aumenta en condiciones en las que la formación de osteoclastos es favorecida como ocurre en la deficiencia de hormonas sexuales, enfermedades inflamatorias del hueso e hiperparatiroidismo (Boyce *et al.*; 2015).

La velocidad en el remodelado óseo varía de acuerdo al tipo de hueso. En una persona adulta sana, el índice de remodelado óseo para el hueso cortical es de 2-3% por año, la cual es adecuada para mantener la fuerza biomecánica del hueso, mientras que en las mismas circunstancias el índice para el hueso trabecular es más alto, indicando tener una mayor importancia en el metabolismo mineral (Kini U. & Nandeesh B.N., 2012). Relacionado a lo anterior en el hueso trabecular el balance tiende a ser negativo, resultando en un aumento gradual del hueso dado con la edad.

El proceso de remodelado óseo ocurre dentro de estructuras anatómicas temporales conocidas como Unidades multicelulares básicas (UMB's). Cada UMB se encuentra cubierta por una capa de células del revestimiento óseo (Pettit, A. R. *et al.*, 2008) proporcionando así un microambiente adecuado para que los osteoblastos y los osteoclastos lleven a cabo sus funciones y al mismo tiempo se aseguren cambios mínimos en el volumen óseo durante todo el proceso (Andersen, T. L. *et al.*, 2009).

El proceso de remodelado óseo se compone de cinco fases secuenciales: activación, resorción, reversa, formación y terminación (Figura 4).

### *1) Activación*

En un principio el hueso se mantiene en un estado quiescente hasta que las señales de inicio del remodelado son identificadas por el hueso. Las señales pueden ser hormonales (estrógenos o PTH), respuesta a cambios en la homeostasis o mecánicos (estrés mecánico o microfracturas) que se traducirán en señales biológicas detectadas por los osteocitos (Bonewald, L. F., 2007). Una vez identificada la señal de inicio las células del revestimiento óseo (periostio o endostio) son replegadas y digeridas por colagenasas que se liberan. Los precursores de los osteoclastos son reclutados desde la corriente sanguínea y activados para diferenciarse en osteoclastos maduros que migran y se adhieren a la superficie del hueso donde ocurrirá la resorción (Katsimbri, P. 2017).

### *2) Resorción*

Los osteoclastos comienzan a bombear iones de hidrógeno para acidificar el medio a un pH de 4.5, disolviendo así la matriz mineral, produciendo las lagunas de Howship. Las enzimas colagenólicas, catepsina K, metaloproteinasa y otras que son funcionales en medios ácidos, son secretadas por los osteoclastos para la degradación de los componentes orgánicos de la matriz ósea. Al finalizar la fase de resorción los osteoclastos entran en apoptosis (Katsimbri P., 2017, Raggatt L. J. & Partridge N. C. 2010). Esta fase tiene una duración de 2 a 4 semanas.

### 3) *Reversa*

Esta fase se caracteriza por la remoción de los residuos de colágeno por las denominadas células reversas y la preparación de la superficie del hueso para llevar a cabo la siguiente fase de formación. Sin embargo, aún se desconoce el linaje de la célula mononuclear que lleva a cabo esta función y las señales que unen el final de la fase de resorción con el inicio de la formación (Raggatt L. J. & Partridge N. C. 2010).

Actualmente se ha propuesto que son células de tipo macrófago las responsables de liberar factores de crecimiento a la matriz, tales como el Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), BMPs y los Factores de crecimiento insulínico I y II (IGF-1, IGF-2) que favorecen la fase de formación (Garmilla-Ezquerro P., 2014, Kini U. & Nandeesh B.N., 2012, Florencio-Silva R. *et al.*, 2015).

### 4) *Formación*

Los factores de crecimiento liberados en la fase anterior se encargan de atraer por quimiotaxis a los preosteoblastos a los sitios de remodelado, así como de estimular su proliferación (Lind M. *et al.*, 1995). Después de esto, los preosteoblastos agrupados comienzan la síntesis de la sustancia cementante sobre la cual se producirá el nuevo tejido y comienzan la expresión de BMPs que regulan su diferenciación a osteoblastos (Kini U. & Nandeesh B.N., 2012).

Después de algunos días los osteoblastos maduros sintetizan el osteoide, rellenando las cavidades dejadas por los osteoclastos.

Gradualmente la nueva matriz ósea será mineralizada formando el hueso nuevo. En cuanto a los osteoblastos aquellos que permanecen en la superficie continúan formando la matriz hasta transformarse en células quiescentes del revestimiento óseo. Los osteoblastos que son embebidos en la nueva matriz se diferencian a osteocitos formando parte de la red canalicular, mientras que el resto de los osteoblastos son eliminados por apoptosis (Katsimbri P., 2017, Kini U. & Nandeesh B.N., 2012). La fase de formación transcurre en un periodo de 4 a 6 meses.

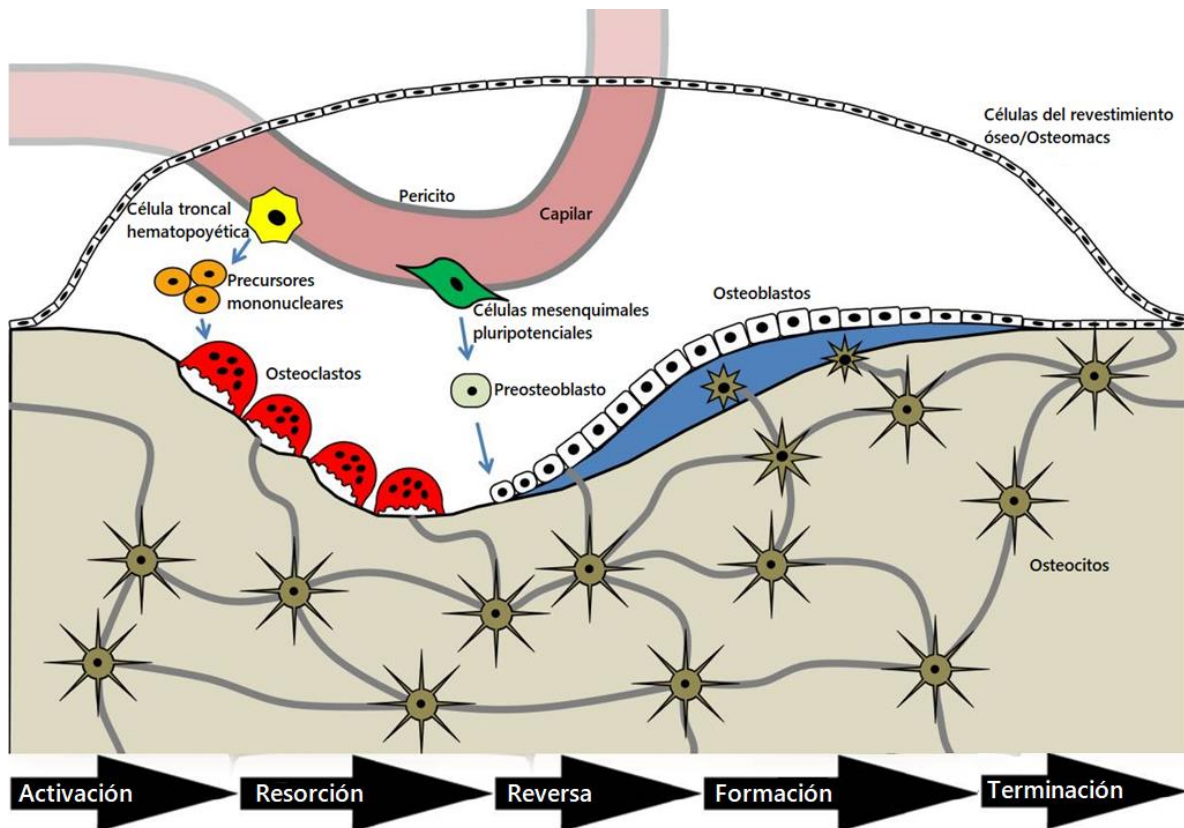
### *5) Terminación/Mineralización*

Una vez que la cantidad de hueso formado es igual a la cantidad de hueso reabsorbido, el proceso de remodelado óseo concluye dando lugar a la fase de terminación o mineralización. Esta da inicio 30 días después de la formación del osteoide y su duración varía según el tipo de hueso. En el hueso trabecular es de aproximadamente 90 días, mientras que en el hueso cortical es de alrededor de 130 días (Katsimbri P., 2017). En el hueso recién formado se tiene un bajo contenido de calcio y es capaz de intercambiar iones más fácilmente con el fluido extracelular.

En esta fase las células se caracterizan por entrar en un estado de quiescencia, el cual permanece hasta que da inicio un nuevo ciclo de remodelado.

La fase de mineralización está regulada por fosfoproteincinasas y la fosfatasa alcalina, mientras que la vitamina D estimula la mineralización de la matriz ósea no mineralizada (Katsimbri P., 2017).

Se ha propuesto que los osteocitos participan modulando la señal de terminación del remodelado óseo por medio de la expresión de esclerostina, la cual disminuye durante la resorción y regresa a sus niveles normales en la etapa de mineralización (Raggatt L. J. & Partridge N. C. 2010).



**Figura 4.** Fases del proceso de remodelado óseo dentro de una unidad multicelular básica (UMB). La renovación del tejido óseo es llevada a cabo por la acción coordinada de los tres principales tipos celulares en un proceso que se ha dividido en 5 fases: Activación; los osteocitos responden a estímulos fisiológicos, Resorción; los osteoclastos, digieren y reabsorben el tejido óseo mediante la producción de ácido y enzimas proteolíticas, Reversa; remoción de residuos celulares, Formación; los osteoblastos sintetizan la nueva matriz no mineralizada (osteóide) y Terminación; los osteocitos entran en quiescencia y comienza la mineralización de la matriz. Figura modificada de McGee-Lawrence M & Westendorf J., 2012.

## ENFERMEDADES ÓSEAS

Las enfermedades complejas o enfermedades multifactoriales son definidas como aquellos padecimientos en los cuales elementos como variantes genéticas, factores ambientales, y estilos de vida tienen participación en su origen y desarrollo (Hunter, 2005). En este tipo de enfermedades a pesar de que el componente genético que conlleva a la predisposición de la enfermedad es un factor relevante, éste solo representa una parte de la probabilidad de que la persona presente la enfermedad. La mayor probabilidad de desarrollar el fenotipo de la enfermedad depende en gran parte del ambiente y el estilo de vida.



Muchas enfermedades óseas causantes de malformaciones y fragilidad de los huesos están clasificadas dentro de este rubro como lo son el raquitismo, la osteomalacia, la osteomielitis, la enfermedad de Paget y la osteoporosis, que es por mucho, la enfermedad ósea más común.

La osteoporosis (OP) es una enfermedad metabólica y crónica del hueso que compromete la resistencia ósea. Debido a que es una enfermedad asintomática durante la mayor parte de su evolución clínica se le conoce como una enfermedad silenciosa y es prácticamente diagnosticada una vez que la pérdida gradual de masa ósea provoca la aparición de fracturas (Golchin, 2016).

La OP es una enfermedad denominada de carácter común ya que afecta tanto a hombres como a mujeres de todas las razas y etnias. Las consecuencias más graves derivadas de las fracturas se ven reflejadas en la calidad de vida de la persona, así como en la morbilidad y mortalidad (Schuiling, *et al.*, 2011).

En la OP hay un desequilibrio entre osteoblastos y osteoclastos conllevando a una pérdida de hueso, que en otras palabras ocasiona un balance negativo del remodelado óseo.

### Osteoporosis

La palabra osteoporosis se deriva de las etimologías ὀστέον (osteon)=hueso, πόρος (poros)=poro, ωσις (sis)=condición o formación y hace referencia a la pérdida de masa ósea por pérdida de densidad y aumento de los espacios huecos del hueso, lo que produce porosidad y fragilidad ósea. Esta condición es principalmente consecuencia de un menor aporte en la cantidad de componentes minerales (Cortes & Ureña, 2011).

Actualmente y de acuerdo con el “National Institute of Health” y el “International Osteoporosis Foundation”, la osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por la pérdida de masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del hueso, guiando a un aumento en la fragilidad y por consiguiente un mayor riesgo de fractura (NIH, 2001). La principal complicación de la osteoporosis es la fractura (no traumática), siendo las más frecuentes en sitios como cadera (específicamente en

la cabeza del fémur), muñeca (en cúbito y radio) y columna (vértebras). La osteoporosis está asociada con la edad y afecta principalmente a mujeres mayores de 50 años.

La OP representa un gran desafío para adultos mayores y el riesgo de padecer OP en esta etapa no se limita al sexo femenino, sino que también se encuentra relacionado con la ganancia en la densidad ósea y maduración de la arquitectura del hueso que la persona tiene a través de su vida y una vez que alcanza su pico de masa ósea máximo (Gordon C. *et al.*, 2016, Harvey N. *et al.*, 2014).

El pico de masa ósea está determinado por factores genéticos, ambientales, de salud durante el crecimiento, nutrición, niveles hormonales, género y actividad física. Una vez que la persona alcanza el pico de masa ósea aproximadamente a la edad de 30 a 35 años comienza la pérdida gradual de masa ósea (aproximadamente 0.3 a 0.5% al año) y dependerá de dichos factores que tan grande será el impacto de esta pérdida en el hueso (Linton 2007, Sözen *et al.*, 2017). Debido a lo anterior, el pico de masa ósea es considerado un fuerte predictor del riesgo de osteoporosis (Harvey N. *et al.*, 2014).

La osteoporosis puede ser diferenciada en primaria y secundaria de acuerdo a las causas que la originan.

#### *Osteoporosis primaria*

La osteoporosis primaria es relacionada a la mayoría de los casos de osteoporosis, se caracteriza por estar ligada al sexo y la edad, pero no está asociada a ninguna otra enfermedad que la provoque. Dentro de la osteoporosis primaria existen el tipo 1 y el tipo 2.

La osteoporosis primaria Tipo I también se conoce como osteoporosis posmenopáusica. Se presenta mayormente en mujeres que van de los 51 a los 70 años y está relacionada con la pérdida acelerada y desproporcionada de densidad mineral en hueso trabecular como consecuencia de la deficiencia de estrógenos, los cuales son de gran importancia para el desarrollo y mantenimiento del hueso (International Osteoporosis Foundation, 2011).

La importancia de los estrógenos radica principalmente en que inhiben la formación de UMB's por medio de la disminución en la producción de citocinas que intervienen en la activación de los osteoclastos como lo son la interleucina 1, 6, 7, 11, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  y M-CSF, además de estimular la expresión de OPG que impide que se lleve a cabo la osteoclastogénesis (Pacifci R., 2009, Cenci S. *et al.*, 2000).

En este tipo de osteoporosis también hay una disminución de la actividad de la hormona paratiroidea (PTH) para compensar la resorción ósea (Hermoso de Mendoza, 2003; Saxon, 2014). Las fracturas más comunes a esta son en vértebras y muñeca (Saxon, 2014).

Osteoporosis primaria Tipo II, también conocida como osteoporosis involutiva o senil. Es presentada tanto en hombres como mujeres mayores de 70 años. La pérdida de densidad mineral es lenta y asociada con una baja actividad del remodelado óseo principalmente debida a un déficit de vitamina D que resulta en la baja absorción de calcio e hiperparatiroidismo secundario (Hermoso de Mendoza, 2003). Las fracturas más frecuentes a este tipo son en cadera y vértebras. Involucra tanto al hueso trabecular como a hueso compacto.

Ambos tipos de osteoporosis primaria pueden presentarse simultáneamente en un mismo individuo (Saxon, 2014).

### *Osteoporosis secundaria*

Las OP en esta clasificación son derivadas como consecuencia de factores extrínsecos o enfermedades que promueven la rápida pérdida de densidad mineral ósea (Hermoso de Mendoza, 2003; Saxon, 2014). Entre los diversos factores vinculados a la osteoporosis secundaria se encuentran los fármacos (principalmente corticosteroides), deficiencia de vitamina D, desórdenes endocrinológicos (*p. ej.* hipertiroidismo, insuficiencia suprarrenal), desórdenes gastrointestinales (*p. ej.* deficiencia hepática, enfermedad celíaca) alcoholismo, tabaquismo, dieta y trastornos genéticos (osteogénesis imperfecta), entre otros (Meiner & Kazer, 2011, Mirza F. & Canalis E., 2015).

### DIAGNÓSTICO

En 1994, la OMS estableció el método diagnóstico de la osteoporosis con base en criterios epidemiológicos que tomaban en cuenta los cambios en la masa ósea con la edad y la prevalencia e incidencia de fracturas osteoporóticas en mujeres caucásicas posmenopáusicas (Hermoso de Mendoza, 2003).

El diagnóstico de la osteoporosis es llevado a cabo por medio de la medición de la Densidad Mineral Ósea (DMO), la cual es expresada en unidades de masa mineral por área de hueso escaneada ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ). Los valores de DMO son reflejados en el índice de T-score (ver Tabla 1), el cual clasifica a las personas en tres estados de acuerdo al número de desviaciones estándar (DE) por arriba o por debajo de la DMO de un grupo de referencia (hombres o mujeres jóvenes de 20 a 29 años de edad, que han alcanzado su pico máximo de masa ósea). Las personas que se encuentran por arriba de -1 DE son consideradas como sujetos sanos, aquellas encontradas entre los rangos de -1 a -2.5 son considerados en el rango de osteopenia, mientras que en valores por debajo de -2.5 se encuentran los individuos con osteoporosis. Entre más bajo sea el valor de la T-score el grado de osteoporosis será más grave aumentando el riesgo de fractura (Sözen *et al.*, 2017).

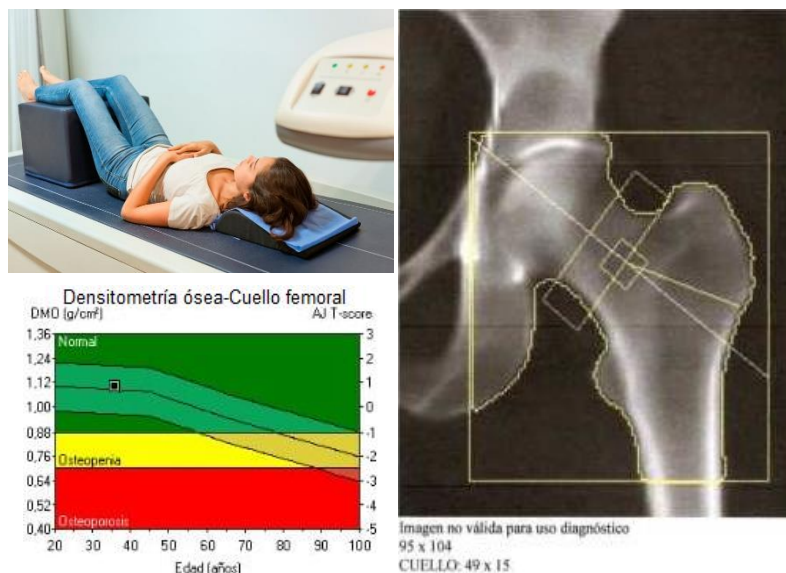
**Tabla 1.** Definiciones de Osteoporosis basadas en la DMO de acuerdo con la OMS.

<b>Clasificación</b>	<b>DMO</b>	<b>T-score</b>
<b>Normal</b>	Dentro de 1 DE de la media de una población de referencia (adultos jóvenes)	1.0 a -1.0
<b>Baja masa ósea (Osteopenia)</b>	Entre 1 a 2.5 DE por debajo de la media de referencia (adultos jóvenes)	-1.0 a -2.5
<b>Osteoporosis</b>	Más de 2.5 DE por debajo de la media de referencia (adultos jóvenes)	> -2.5
<b>Osteoporosis severa o establecida</b>	Más de 2.5 DE por debajo de la media de referencia (adultos jóvenes) y presencia de fracturas	> -2.5 con una o más fracturas

OMS: Organización Mundial de la Salud. DMO: Densidad mineral ósea. DE: Desviación Estándar. Sözen et al., 2017.

En casos donde la osteoporosis se presenta en mujeres premenopáusicas, en hombres menores a 50 años y niños también se lleva a cabo la medición de la DMO, sin embargo y de acuerdo con la Sociedad internacional de densitometría clínica (ISCD) se recomienda usar el índice de Z-score, donde la DMO de referencia es ajustada por la edad, sexo y etnicidad específica del paciente (Sözen *et al.*, 2017).

Las mediciones de DMO son realizadas por medio de la técnica de Absorciometría de Rayos X de energía dual (DXA) (Figura 5), la cual es un método no invasivo y se considera en la actualidad como el estándar de oro para el diagnóstico y monitoreo de tratamientos de la osteoporosis. En esta se hace pasar un haz de fotones de rayos X con dos picos de energía distintos en el cuerpo del paciente permitiendo evaluar el contenido mineral (Pisani *et al.*, 2013).

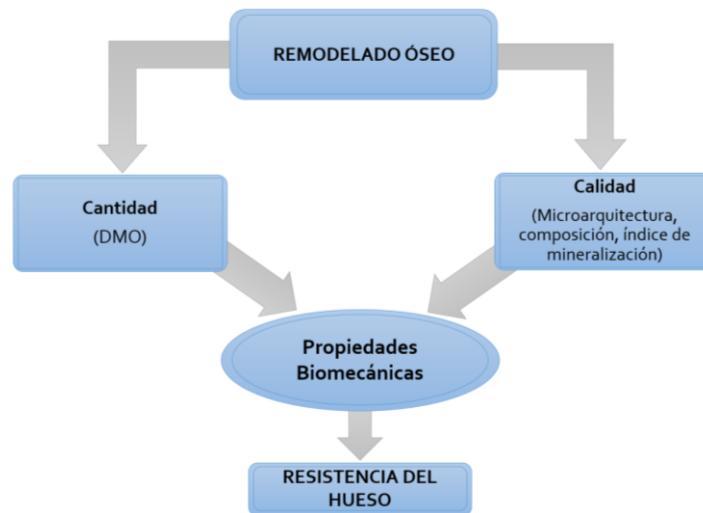


**Figura 5.** Densitometría ósea por absorciometría de rayos X de energía dual (DXA).

Se utiliza una dosis pequeña de radiación ionizante para producir imágenes del interior del cuerpo que se traducen en valores de la DMO y que a su vez son interpretados mediante el índice de T-score.

Los sitios de medición de la DMO más confiables son en cadera (región proximal del fémur), cadera total (cuello femoral, zona intertrocantérea y el triángulo de Ward), columna lumbar (en vértebras L2-L4) o haciendo una combinación de estos (Sözen *et al.*, 2017, Riancho *et al.*, 2008). La DMO también puede determinarse prácticamente en cualquier sitio como el antebrazo, calcáneo, falanges, no obstante, estos sitios no se encuentran bien estandarizados por lo que son muy variables (Schuiling *et al.*, 2011; Riancho *et al.*, 2008).

La importancia de la medición de la DMO radica en que es un componente fundamental para determinar la resistencia del hueso. Como puede observarse en la Figura 6, la resistencia del hueso se define como la capacidad para contrarrestar las fuerzas que actúan sobre este; se encuentra comprendida básicamente por la integración de dos variables: la cantidad y la calidad, ambas dependientes del remodelado óseo (Augat *et al.*, 2005). En el caso de la DMO, esta representa el 70% de la resistencia, mientras que el porcentaje restante es atribuido a la calidad ósea (microarquitectura, composición e índice de mineralización) en la cual aún no es posible saber el grado de deterioro en el contexto clínico (Sözen *et al.*, 2017; Caeiro Rey *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Factores determinantes de la resistencia ósea.

DMO: densidad mineral ósea. Tanto la cantidad como la calidad del hueso están relacionadas con la función y resistencia del hueso. Figura modificada de: Caeiro Rey *et al.*, 2005.

De acuerdo con lo anterior se sabe que existe una relación exponencial inversa entre la DMO y el riesgo de fractura, lo que quiere decir que por cada DE que disminuye la DMO el riesgo de fractura aumenta a casi el doble (Sözen *et al.*, 2017; Riancho *et al.*, 2008).

El uso de la densitometría ósea por DXA como método diagnóstico ofrece varias ventajas como lo son su precisión y fiabilidad (coeficiente de variación: 0.5-3%; error de exactitud: 3-5%). Se le considera el mejor método diagnóstico estandarizado y un estimador del riesgo de fractura. Es utilizado en la toma de decisiones respecto al tratamiento y para su monitoreo.

Además, es una técnica rápida no invasiva que coloca al paciente a una baja exposición de radiación (90% menos que una radiografía torácica estándar) (Orueta & Gómez-Caro., 2010).

Por otro lado debido a que los criterios de la técnica diagnóstica utilizada en la densitometría ósea en un principio se establecieron con fines epidemiológicos en una población específica existen limitaciones en su determinación, así como para estimar adecuadamente el riesgo de que se presenten fracturas, proporcionando únicamente un riesgo relativo (Riancho *et al.*, 2008); ya que presenta una elevada

especificidad pero una escasa sensibilidad, aunque esta puede aumentarse utilizando herramientas de evaluación de la masa ósea que consideran factores de riesgo de fractura no asociados densidad ósea (Orueta & Gómez-Caro., 2010).

Se calcula que aproximadamente el 50% de las personas que sufren de fracturas por osteoporosis se encuentran dentro del intervalo de osteopenia de acuerdo a los criterios densitométricos y el 11% son identificados como normales, lo que muestra una baja capacidad predictiva (Komadina, 2008; Rosen, 2018).

A pesar de que sus parámetros de validez son buenos existen falsos positivos y falsos negativos que pueden ser ocasionados por calcificaciones de partes blandas, osteocitos, obesidad, errores en la técnica y se debe tener en cuenta la diferencia de densidad ósea en distintas localizaciones.

Adicionalmente es una técnica que requiere de un equipo y personal especializado, lo que reduce su disponibilidad para análisis poblacionales y atención primaria. En lo que se refiere a exámenes DXA de seguimiento estos deben realizarse en la misma institución y con el mismo equipo (Orueta & Gómez-Caro., 2010).

Existen otros métodos de diagnóstico por imagen de la osteoporosis que atienden no solo a la medición de la DMO sino también al aspecto estructural. Entre estos se encuentran: ultrasonidos, tomografías computarizadas cuantitativas (TCC) (Tabla 2).



**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de los métodos de diagnóstico de las osteoporosis comúnmente disponibles.

Absorciometría dual de rayos X		Tomografía computarizada cuantitativa		Ultrasonido	
Pros	Contras	Pros	Contras	Pros	Contras
Alta precisión	Rayos X	Valores de densidad reales	Mayores dosis de radiación que la DXA	Rápido, barato y libre de radiación. Portátil.	Diferentes lineamientos para determinar osteoporosis
Evaluación en sitios de referencia (columna y cadera).	No distingue entre hueso cortical y trabecular. No distingue la microarquitectura del hueso. Relativamente costoso.	Discrimina entre hueso trabecular y cortical	Acceso limitado	Tiempos de investigación más cortos que en la DXA	Únicamente para sitios periféricos.
Estudios de validación disponibles en la literatura.	No es útil como herramienta de atención primaria	Alta resolución	No es útil como herramienta de atención primaria	Útil para investigar características estructurales y elásticas del hueso	No es comparable directamente con la DXA (estándar de oro)
				Herramienta de atención primaria	

DXA: Absorciometría de rayos X de energía dual. Herramienta de atención primaria: Tecnología o método dirigido en la atención esencial de la salud y accesible a los individuos de la comunidad. Estándar de oro: Técnica diagnóstica que define la presencia de la condición con la máxima certeza conocida.

Tabla modificada de Pisani et al., 2013.

## EPIDEMIOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS

A nivel mundial la osteoporosis es un problema de gran relevancia debido a que las fracturas por osteoporosis impactan negativamente en la calidad de vida provocando incapacidad, aumento en la morbilidad, mortalidad e intensificación en los costos de atención médica (Figura 7). Dado que la osteoporosis es una enfermedad asintomática resulta difícil establecer su prevalencia real en las poblaciones; ya que su presencia es determinada hasta que las complicaciones son evidentes (González *et al.*, 2009).

Se estima que más de 200 millones de personas en el mundo tienen osteoporosis según datos estadísticos de la Fundación Internacional de Osteoporosis (IOF) y que

1 de cada 3 mujeres mayor a 50 años, así como 1 de 5 hombres sufrirán fracturas osteoporóticas en su vida (Sözen *et al.*, 2017).

De acuerdo con datos reportados en el año 2000 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) mostrados en la Tabla 3, la osteoporosis causa más de 8.9 millones de fracturas anualmente en el mundo, de las cuales más de la mitad ocurren en América y Europa. Se prevé que el número de fracturas osteoporóticas se triplique en los próximos 50 años debido a cambios demográficos causados por el envejecimiento poblacional y una mayor esperanza de vida, afectando particularmente a Asia y Latinoamérica (WHO, 2004).

**Tabla 3.** Número estimado de fracturas osteoporóticas por sitio, en hombres y mujeres de 50 años o más en el año 2000 por región (OMS).

Región de la OMS	Número esperado de fracturas por sitio (miles)				Total de fracturas osteoporóticas	
	Cadera	Columna	Húmero proximal	Antebrazo	Número	%
<b>África</b>	8	12	6	16	75	0.8
<b>América</b>	311	214	111	248	1406	15.7
<b>Sureste de Asia</b>	221	253	121	306	1562	17.4
<b>Europa</b>	620	490	250	574	3119	34.8
<b>Mediterráneo oriental</b>	35	43	21	52	261	2.9
<b>Pacífico Occidental<sup>a</sup></b>	432	405	197	464	2536	28.6
<b>Total</b>	1672	1416	706	1660	8959	100

<sup>a</sup> Incluye Australia, China, Japón, Nueva Zelanda y República de Corea. Johnell & Kanis, 2006.

Actualmente se sabe qué factores como el sexo y la ancestría están relacionados con la DMO y la incidencia de fracturas osteoporóticas de una persona. En este orden de ideas, las mujeres tienden a tener una DMO más baja que los hombres de la misma edad y ancestría. Después de la menopausia el riesgo de fractura es de dos a tres veces más elevado que en los hombres. Las mujeres caucásicas tienen una mayor frecuencia de fracturas que las hispanas, asiáticas y afroamericanas (Silverman & Madison, 1988, Tobias *et al.*, 1994).

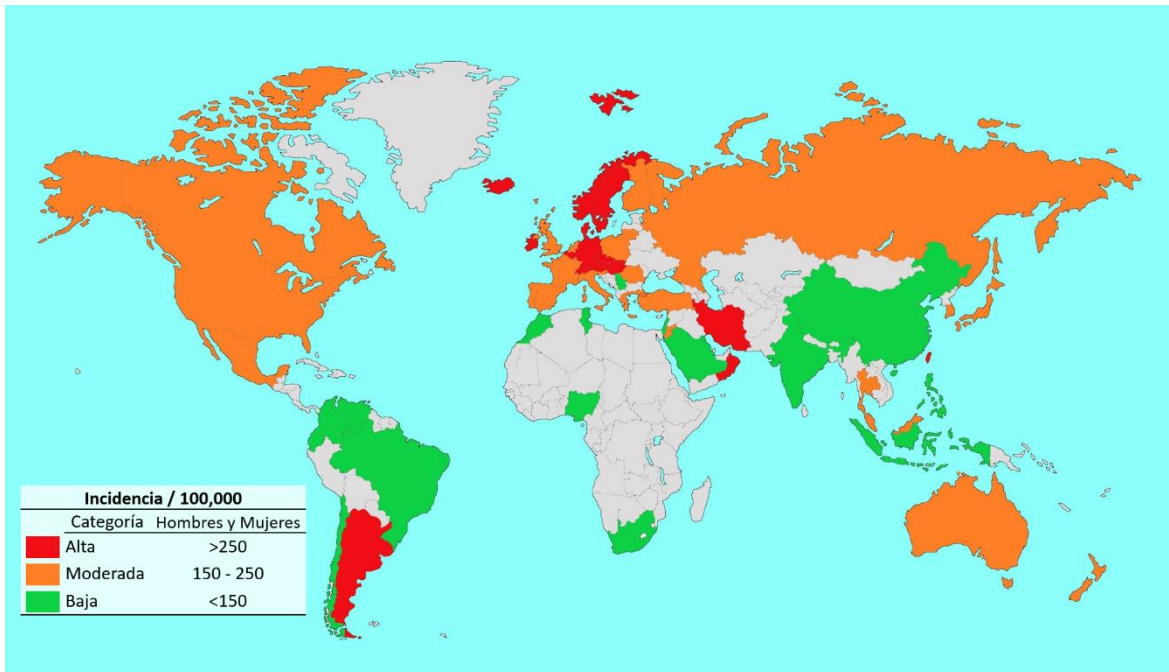
La mayoría de las mujeres que están por debajo de los 50 años tienen una DMO normal, lo que contrasta en mujeres cercanas a los 80 años, donde el 27% padece de osteopenia y el 70% osteoporosis (Cooper C., 1999, Dennison *et al.*, 2006).

Todas las fracturas osteoporóticas están relacionadas con una morbilidad significativa, no obstante, las fracturas vertebrales y especialmente en cadera están relacionadas con un aumento en la tasa de mortalidad (Dennison *et al.*, 2006), la cual se presenta de 5 hasta 10 años después de haberse sufrido la fractura (Nazrun *et al.*, 2014). Complicaciones derivadas de este tipo de fracturas como lo son infecciones, trombo embolismos, comorbilidades coexistentes y complicaciones causadas en cirugía, suman un mayor riesgo de mortalidad (González *et al.*, 2009).

En el pronóstico de mayor mortalidad, los principales factores que se consideran son el género masculino (menor índice de supervivencia), la edad avanzada, enfermedades coexistentes y un escaso estado funcional anterior a la fractura (Dennison *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que los sobrevivientes de fracturas en cadera o columna generalmente presentan algún grado de discapacidad a largo plazo o permanente. En cuanto a la recuperación funcional, esta no es recuperada por completo lo que resulta en la pérdida de independencia del individuo. Otros problemas secundarios, son el riesgo de sufrir nuevas fracturas, problemas emocionales como la depresión, aislamiento y baja autoestima (González *et al.*, 2009).

Datos arrojados por estudios como EVOS (Estudio Europeo de Osteoporosis Vertebral) (O'Neill *et al.*, 1996), LAVOS (Estudio Latinoamericano de Osteoporosis Vertebral) (Clark *et al.*, 2009) y por herramientas que permiten la evaluación del riesgo de fractura (FRAX: Fracture Risk Assessment) (Kanis *et al.*, 2012) reflejan la variación en los índices de fracturas osteoporóticas de acuerdo al área geográfica y la etnia, variando incluso dentro de un mismo país y poblaciones locales (Figura 7).



**Figura 7.** Índice anual de fracturas de cadera (hombres y mujeres) en el mundo clasificadas por riesgo.

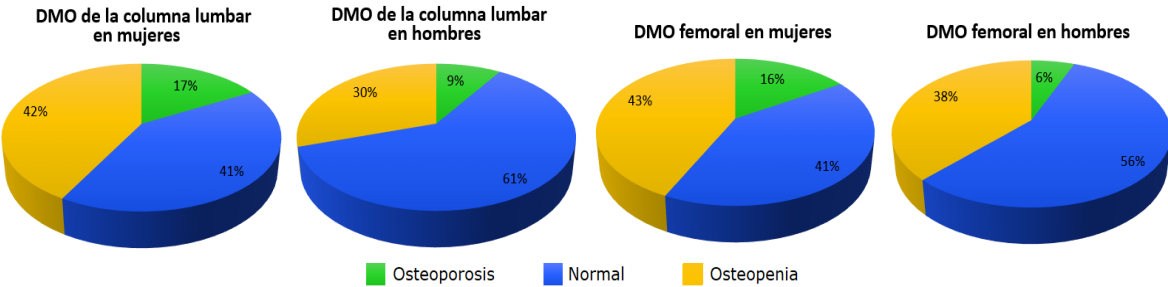
Clasificación y codificación por colores de la incidencia de fracturas en distintas regiones. Figura modificada de: Moon & Harvey, 2014.

## OSTEOPOROSIS EN MÉXICO

Actualmente en nuestro país se está llevando a cabo un rápido crecimiento de la población de adultos mayores y un aumento en la esperanza de vida. Se calcula que la población de personas mayores de 50 años sobrepase los 28 millones en el 2020 y se llegue a los 55 millones en el año 2050. Dado lo anterior enfermedades asociadas a la vejez como la osteoporosis tendrán un importante aumento y por ende también se pronostica un aumento en el número de fracturas (Clark, *et al*; 2010).

En ese mismo sentido se calcula que una de cada 12 mujeres y uno de cada 20 hombres a partir de los 50 años sufrirá una fractura de cadera, lo que equivale a una probabilidad de riesgo de 8.5% en mujeres y de un 3.8% en hombres (Clark, *et al*; 2005). En el año 2005 el número de fracturas de cadera reportadas fue de 29,732 y para el 2050 se prevé se incremente a 226,886 el número de casos, no obstante, si la incidencia específica de fracturas de cadera relacionada con la edad continúa, esto podría llevar a un aumento del 46% previsto (Johansson *et al.*, 2010).

De acuerdo con datos derivados del estudio LAVOS con base en la DMO mostrada en la Figura 8, en México la prevalencia de la osteoporosis en columna lumbar en adultos mayores de 50 años, es de un 9% en hombres y 17% para mujeres. En el caso de aquellas personas que presentan una condición anterior a la osteoporosis, es decir osteopenia, es de 30% en hombres y de un 43% en mujeres. Mientras que los porcentajes para individuos considerados sanos es de 61% en hombres y de 37% en mujeres. De manera semejante resultados del mismo estudio para osteoporosis en cadera fueron de un 6% en hombres y un 16% en mujeres con osteoporosis, en condiciones de osteopenia fue de un 56% en hombres y 41% en mujeres (Clark, *et al*; 2013).

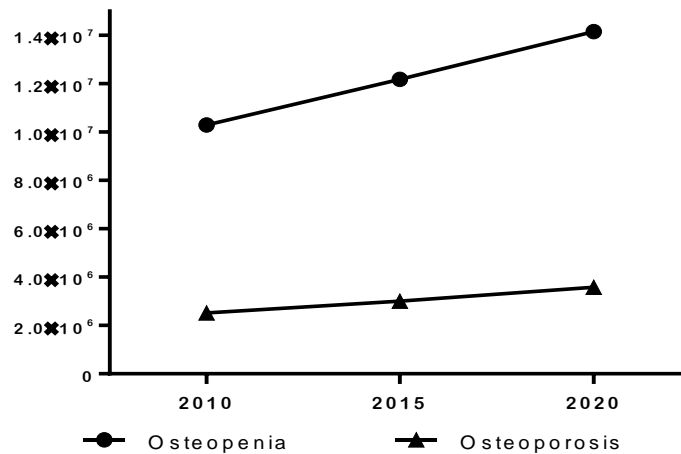


**Figura 8.** Prevalencia de la Osteoporosis en México.

Porcentaje de mujeres y hombres mayores de 50 años identificados en las categorías de Osteoporosis (Verde), Osteopenia (Amarillo) y Normal (Azul), de acuerdo a valores de la DMO. Figura modificada de: Clark *et al.*, 2010.

Cabe señalar que, en México, el número de casos de osteopenia reportados en el año 2010 fue de 10,295,128, para el año 2015 esta cifra se proyectó a 12,177,166 casos que en el año 2020 se calculó en 14,160,056. Al mismo tiempo el número de casos de osteoporosis reportados en el 2010 fue de 2,521,791 que en el año 2015 se estimó en 3,006,258 casos y para el 2020 ascendería a 3,577,499 casos (Carlos, *et al*; 2013) (Figura 9).

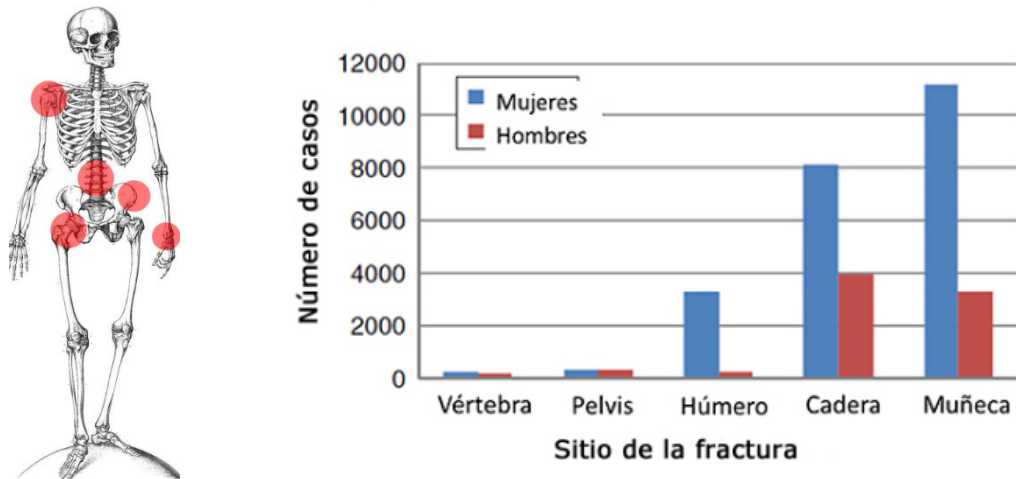
Número de casos de Osteopenia y Osteoporosis



**Figura 9.** Frecuencia de personas con osteopenia u osteoporosis.

Casos reportados de OP y Osteopenia en 2010, 2015 y esperados en 2020. Figura de: Carlos et al., 2013.

Las fracturas osteopóroticas más comunes en la población mexicana para hombres y mujeres mayores de 50 años son a nivel de muñeca, cadera, húmero, pelvis y vértebras en orden de frecuencia (Figura 10).



**Figura 10.** Principales fracturas en México.

Casos reportados de fractura de acuerdo al sitio anatómico (hombres y mujeres mexicanos). Figura de: Clark P. et al., 2010.

En lo que se refiere al costo directo por tratamiento de fracturas en cadera ocasionadas por osteoporosis en México, tan solo en el 2006 fue de 97 millones de dólares, de acuerdo a los costos reportados por paciente en instituciones de salud

pública como el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (ver Tabla 4) (Clark *et al.*, 2007). Para el 2020 el costo esperado se calculó entre los 213 y 466 millones y para el 2050 el pronóstico se encuentra entre los 555 y 4088 millones de dólares (Clark, *et al.*, 2010). Dado el contexto actual de la enfermedad y el impacto exponencial en el sector social como económico que tendrá en un futuro, la osteoporosis es considerada como un problema importante de salud pública en México.

**Tabla 4.** Costos directos e indirectos en el tratamiento de fracturas de cadera.

Asignación del recurso por caso	<sup>a</sup> IMSS <sup>b</sup> (\$)	Costos Indirectos
Cirugía	1,110.6	Pérdida de productividad del paciente
Prótesis	660.5	Cambios negativos en la calidad de vida
Estancia hospitalaria	1,893.3	Limitación en las actividades de familiares debido a la dependencia del paciente
Pruebas de laboratorio e imagen	226.80	
Costos médicos	3,891.2	
Transporte	14.60	
Comidas	15.30	
Costos no médicos	29.90	
Costos totales (Dólares, 2006)	3,921.1	

<sup>a</sup> IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social. <sup>b</sup> Los costos son expresados en Dólares (Norteamericanos) del 2006. Los datos son tomados del IMSS como referencia de un sistema de salud popular en el país. Para los costos indirectos, aún se desconoce su impacto económico. Tabla modificada de Clark *et al.*, 2010.

## NUEVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Es claro que la detección temprana de la osteoporosis es crucial para la prevención de fracturas por lo que el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico es de gran importancia.

Como se ha venido mencionando, durante el proceso de remodelado óseo se pueden encontrar distintas moléculas derivadas de las actividades de resorción y formación, como lo son productos de degradación del tejido óseo (Telopéptidos de colágeno tipo I y Calcio) y productos de la actividad enzimática de osteoblastos y osteoclastos (ALP y TRAP) (Garnero, 2017). Estas moléculas son aprovechadas para el monitoreo de tratamientos y como predictores del riesgo de fractura, además de ser considerados como mínimamente invasivos al encontrarse en fluidos biológicos tales como sangre total, suero, plasma, orina y saliva, entre otros.

Ejemplo de marcadores bioquímicos del remodelado óseo son los mostrados en la Tabla 5.

El uso de marcadores en el diagnóstico de la osteoporosis está enfocado en la detección temprana para la identificación y el tratamiento oportuno de los pacientes con riesgo de fracturas osteoporóticas.

No obstante, las metodologías de medición de estas moléculas presentan varias limitaciones como lo son su poca especificidad para el tejido óseo, ya que no reflejan la actividad de cada linaje celular y poseen un alto grado de variabilidad.

**Tabla 5.** Marcadores bioquímicos clásicos del remodelado óseo.

Formación de hueso (suero)	Resorción de hueso (suero/orina)
Osteocalcina; intacta, total, o parcialmente carboxilada (OC)	Fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP)
Fosfatasa Alcalina del ósea (ALP Hueso)	Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX).
Propéptido N-terminal del procolágeno tipo I (PINP)	Telopéptido N-terminal del colágeno tipo I (NTX).
Propéptido C-terminal del procolágeno tipo I (PICP)	Telopéptido C-terminal del colágeno tipo I generado por MMPs (CTX-MMP o ICTP).
	Deoxipiridinolina (DPD libre o total)
	Piridinolina (PYD)
	Calcio

Marcadores recomendados por la IOF-IFCC como marcadores de referencia para uso en estudios clínicos. IOF: Fundación Internacional de Osteoporosis. IFCC: Federación Internacional de Química clínica y Medicina de Laboratorio. MMP's: Metaloproteinasas. Tabla modificada de Garnero P., 2017.

Como una estrategia para el mejoramiento del diagnóstico se ha sugerido el uso de nuevas moléculas que permitan una óptima interpretación clínica y que ayuden en la evaluación del riesgo de fractura, como son: proteínas de la matriz extracelular (Periostina), citocinas reguladoras del remodelado óseo (OPG, RANKL, DKK-1, Sclerostina, S1P), enzimas osteoclásticas (Catepsina K) y otras moléculas no proteicas (miRNAs) (Garnero, 2017). Algunos ejemplos de nuevos marcadores se muestran en la Tabla 6.



**Tabla 6.** Nuevos marcadores biológicos del metabolismo óseo en osteoporosis.

No-colágenas	Enzimas osteoclásticas	Moléculas reguladoras	Hormonas	No proteínas
Periostina	Catepsina K	OPG RANKL DKK-1 Esclerostina Esfingosina-1 fosfato	FGF-23 Klotho	miRNAs

OPG: Osteoprotegerina; RANKL: Ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B; DKK-1: Dickkopf-1. FGF-23: Factor de crecimiento fibroblástico 23; S1P: esfingosina-1 fosfato; miRNAs: MicroRNAs. Garnero P., 2017.

Dentro de los nuevos marcadores encontramos a los ácidos nucleicos como los microRNAs (miRNAs), particularmente los miRNAs circulantes, que surgen como una nueva clase de marcador que puede ayudar al diagnóstico temprano de la osteoporosis (Garnero, 2017). Los miRNAs son una clase de RNAs pequeños no codificantes, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, de cadena sencilla muy abundantes ya que son transcritos activamente desde el genoma (Dluzen, D. F. *et al.*, 2016). Se encuentran implicados en múltiples procesos biológicos incluyendo la diferenciación celular, la homeostasis y el envejecimiento, así como el desarrollo de enfermedades (Vidigal & Ventura, 2015; Sato-Kuwabara *et al.*, 2015). Actúan regulando la expresión postranscripcional de su RNA mensajero blanco por medio del reconocimiento y la unión específica de secuencias en la región 3'UTR llevando a cabo así dos tipos de mecanismos: degradación del RNAm (complementariedad de secuencias perfecta, frecuente en plantas) y represión de la traducción (complementariedad entre secuencias imperfecta, frecuente en mamíferos) (Garnero, 2017; Pogribny, 2017).

#### BIOGÉNESIS DE LOS MICRORNAS

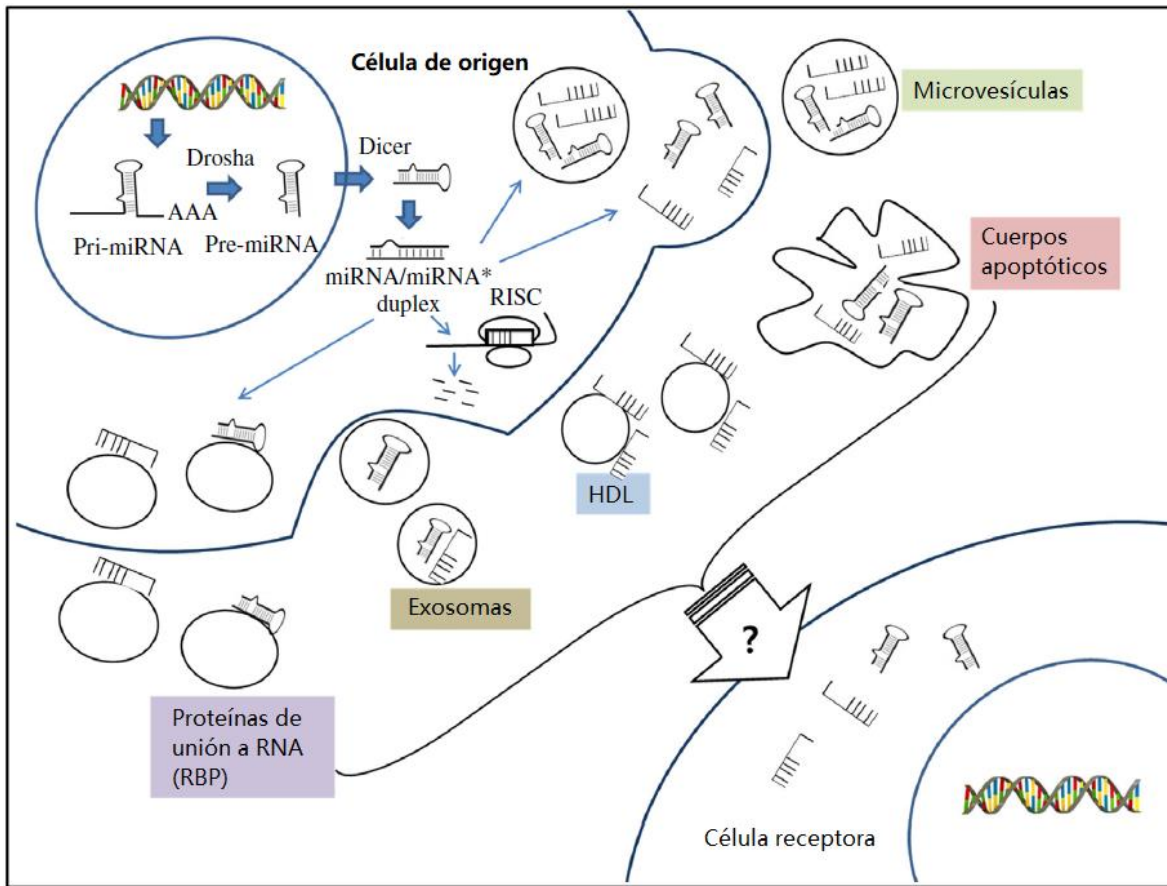
Los microRNAs o miRNAs son originados a partir de secuencias que se encuentran en todo el genoma de organismos eucariontes en regiones intergénicas, intrónicas, exónicas y regiones UTR (regiones no traducidas de los genes) donde comúnmente son localizados en grupos.

La transcripción de dichas secuencias inicia en el núcleo por medio de la RNA polimerasa II para formar los llamados miRNAs primarios (o pri-miRNAs) que

presentan una longitud de aproximadamente 100-1000 nucleótidos con una estructura característica de tallo-asa. El procesamiento de los pri-miRNAs (Figura 11) comienza cuando su estructura es cortada por el complejo enzimático Drosha/DGCR8 para dar lugar al miRNA precursor (pre-miRNA) con una longitud de ~70 nucleótidos. Drosha es una RNAsa III específica para RNA de doble cadena y DGCR8 (Proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome de DiGeorge) es su cofactor esencial que regula la biogénesis de los miRNAs. Los pre-miRNA son exportados al citoplasma por la Exportina 5 (XPO5), donde son procesados por otra RNAsa III para RNA de doble cadena llamada Dicer que se encarga de retirar la estructura de asa, generando así un RNA dúplex compuesto por el miRNA maduro de ~22 nucleótidos y una cadena pasajera, que en muchos casos da origen a otro miRNA maduro. Ambas cadenas pueden llegar a ser funcionales dependiendo del tipo celular celular y su contexto. El miRNA maduro posteriormente se integrará a la proteína Argonauta (Ago) formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Una vez que el complejo RISC está formado, el miRNA se encarga de dirigir el complejo a la secuencia denominada semilla dentro de la región 3' UTR del RNAm blanco donde se unirá complementariamente de manera imperfecta (forma de unión común en mamíferos) y llevará a cabo la inhibición de la expresión génica (Jung, H. J., & Suh, Y., 2014, Pogribny, 2017., Dluzen, D. F. *et al.*, 2016, Vidigal & Ventura, 2015, Lian, J. B. *et al.*, 2012, Lin, S., & Gregory R. I., 2015).

Cada miRNA puede unirse a múltiples RNAm blanco y un solo RNAm blanco puede ser regulado por múltiples miRNAs. Este efecto pleiotrópico les permite controlar distintas redes de interacción entre proteínas (Jung, H. J., & Suh, Y., 2014, Vidigal & Ventura, 2015, Garnero, 2017).

Los miRNAs pueden participar en la comunicación intercelular al ser liberados de las células a los fluidos biológicos por medio de cuerpos vesiculares (exosomas/microvesículas), cuerpos apoptóticos o asociados a proteínas (Ago y lipoproteínas) para protegerse de la degradación y así poder llegar al tejido u órgano donde lleven a cabo su función (Sato-Kuwabara *et al.*, 2015., Arroyo J.D. *et al.*, 2011, Garnero, 2017) (Figura 11).



**Figura 11.** Biogénesis y comunicación intercelular de los microRNAs.

La secuencia que contiene al miRNA es transcrita como pri-miRNA por la RNA polimerasa II en el núcleo. El pri-miRNA es cortado por el complejo Drosha/DGCR8 para producir al pre-miRNA con una longitud de ~70 nucleótidos. Posteriormente el pre-miRNA es exportado al citoplasma por la XPO5 y después procesado por Dicer. Una de las cadenas del miRNA maduro es contenida en el complejo RISC, el cual será dirigido a un RNAm blanco por medio de la unión complementaria de secuencias (perfecta/imperfecta) dando lugar a la inhibición de la traducción del RNAm. Los miRNAs pueden ejercer su función en células remotas a las de su origen mediante su incorporación a vesículas derivadas de la membrana (exosomas, microvesículas, así como a proteínas (Ago, lipoproteínas) o cuerpos apoptóticos. HDL: Lipoproteínas de alta densidad. Figura de: Jung, H. J., & Suh, Y., 2014.

## MiRNAs CIRCULANTES

La descripción de los miRNAs en la regulación de los genes a nivel pos transcripcional en procesos celulares normales como la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, comunicación, apoptosis y hematopoyesis, así como en condiciones patológicas donde hay una correspondencia con perfiles de expresión alterados, ha conducido a considerarlos una opción importante en la búsqueda de biomarcadores potenciales para el diagnóstico (Ortiz-Quintero, 2016, Liang et al.,

2018., Schulte et al., 2015, Jia & Liu, 2016, Li B. X. et al., 2015). En este orden de ideas, muchos miRNAs se han caracterizado por ser expresados en tejidos específicos, y muchos más son ubicuos en el organismo.

De la misma forma que los mRNA reflejan un patrón de expresión, los miRNAs presentes en tejidos han sido propuestos por diversos estudios como una firma de identidad celular, esto debido a que algunos miRNAs se distinguen por sus altos niveles de expresión y tienen la ventaja de estar restringidos en ciertos tejidos, situándose como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de diversas enfermedades (Mori et al., 2019, Bandiera et al., 2015, Horak et al., 2016, Wei et al., 2014).

**Tabla 7.** miRNAs expresados en tejidos específicos

Tejido	miRNA	Expresión	Referencias
Hígado	miR-122	Alta	<i>Bandiera et al., 2015; Jopling 2012; Sengupta et al., 2020</i>
	miR-194/192	Alta	<i>Krützfeldt et al., 2011, Morimoto et al., 2017</i>
Cerebro	miR-9-5p	Alta	<i>Zottel et al., 2020</i>
	miR-124-3p	Alta	
	miR-375-3p	Alta	<i>Xu et al., 2021</i>
Músculo	miR-1	Alta	<i>Schiffer et al., 2021</i>
	miR-133	Alta	<i>Li et al., 2021</i>
	miR-499	Alta	<i>Duran et al., 2020</i>
Riñón	miR-204-5p	Alta	<i>Cheng et al., 2020</i>
			<i>Li et al., 2019</i>
	miR-192-5p	Alta	<i>Baker et al., 2019</i> <i>Chandrasekaran et al., 2012</i>

Estos miRNAs expresados en tejidos a pesar de su gran valor en el uso clínico implican un gran obstáculo en tejidos de difícil acceso para la obtención de la muestra, como ocurre en los tejidos óseos, blandos y de órganos internos, donde se requiere de metodologías demasiado invasivas para el paciente (Ortiz-Quintero, 2016).

A partir de los resultados obtenidos por Mitchell et al y Chen et al (Mitchell et al., 2008 y Chen et al., 2008) en 2008, se observó la presencia de miRNAs extracelulares en suero y plasma humanos. En ambos trabajos los miRNAs se

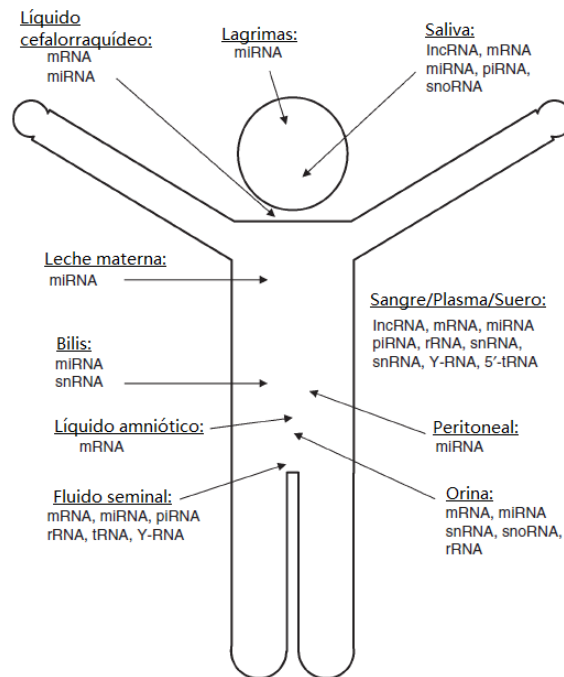
caracterizaron por ser obtenidos de individuos sanos y estar protegidos de la degradación por RNAsas en sangre. Además, estos miRNAs permanecieron en una forma funcional tras someterse a cambios ambientales (pH, temperatura, congelamiento y descongelamiento), a diferencia de miRNAs sintéticos o RNAs de secuencias largas que eran rápidamente degradadas; sugiriendo así, un sistema de protección en el que se encuentran involucrados exosomas y complejos proteicos (Ortiz-Quintero, 2016).

Estudios recientes han revelado que estos miRNAs extracelulares son liberados por diversos tipos celulares tanto en condiciones saludables como patológicas, y se encuentran en prácticamente todos los fluidos biológicos humanos, incluyendo sangre (suero y plasma), lagrimas, orina, saliva, líquido amniótico, leche materna, fluidos pleurales, entre otros. Estos miRNAs secretados o circulantes son altamente estables y pueden ser transportados a otras células para llevar a cabo su función, participando así en la regulación de la comunicación entre células y la expresión de genes (Ortiz-Quintero, 2016, Mori et al., 2019, Weber et al., 2010, Mitchell 2008).

Tanto por su accesibilidad y estabilidad, los miRNAs extracelulares han sido objeto de distintos estudios que los han asociado con diversas patologías incluyendo, enfermedades metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, entre otras (Safdar et al., 2016, Li B. X. et al., 2015, Schulte et al., 2015, Jia & Liu, 2016). Además la evidencia ha mostrado una correlación con los factores ambientales particulares de los individuos (tales como, la dieta, la contaminación, el ejercicio, composición de la microbiota intestinal y demás factores), con los niveles de los miRNAs extracelulares o en circulación, sugiriendo así su uso como biomarcadores potenciales mínimamente invasivos que indiquen el estado fisiológico de los individuos para el diagnóstico, pronóstico o bien el monitoreo de tratamientos farmacológicos (Flowers et al., 2015, Rome, 2015, Whitham et al., 2018, Beatty et al., 2014, Mori et al., 2019).

## MiRNAs COMO BIOMARCADORES

La capacidad que tienen los miRNAs como marcadores biológicos en la osteoporosis radica en su participación en la diferenciación y homeostasis de osteoclastos y osteoblastos, reflejando alteraciones en el metabolismo óseo. Su participación a nivel postranscripcional tiene un gran potencial para servir como un biomarcador mínimamente invasivo en el diagnóstico molecular temprano al igual que en el monitoreo de tratamientos (Garnero, 2017, Pogribny, 2017, Lian, J. B. *et al.*, 2012). Otra ventaja que ofrecen yace en el método de detección el cual es a partir de RT-PCR cuantitativa, que es altamente específico y sensible. Se debe considerar también el hecho de que son moléculas altamente estables en fluidos biológicos como lo es el suero y plasma (Figura 12), ya que al ser cortos y transportarse de manera conjunta con proteínas o vesículas (microvesículas o exosomas) son resistentes a la actividad de RNAsas y pueden servir como óptimos biomarcadores proporcionando información valiosa incluso antes que los marcadores basados en proteínas (Cheng J. *et al.*, 2016, Sato-Kuwabara *et al.*, 2015).



**Figura 12.** Resumen de fluidos biológicos conteniendo RNA.

Fluidos biológicos y los RNA extracelulares específicos reportados. mRNA: RNA mensajero, miRNA: microRNA, lncRNA: RNAs largas no codificantes, piRNA: RNA asociado a Piwi, snoRNA: RNA

*pequeño nucleolar, rRNA: RNA ribosomal, Y-RNA: RNA pequeño no codificante derivado de ribonucleoproteínas, 5'-tRNA: Extremo 5' del RNA de transferencia, snRNA: RNA pequeño nuclear. Figura de: Dluzen, D. F. et al., 2016.*

## miRNAs y osteoporosis

Uno de los objetivos principales de los biomarcadores es ser utilizados como herramientas en la investigación básica, así como en el área clínica enfocada al diagnóstico de enfermedades. Sin embargo, los marcadores bioquímicos reportados a la fecha en el contexto de enfermedades de hueso como la osteoporosis no están bien establecidos y se han centrado en el proceso de remodelado óseo mostrando limitaciones por no ser realmente cuantificables ya que no producen resultados exactos ni reproducibles. Aunado a esto, la necesidad de validación en múltiples poblaciones probando su asociación con la enfermedad de interés no se encuentra reportada, por lo cual únicamente son empleados en el monitoreo de tratamientos.

Como consecuencia de su carencia de especificidad y de estandarización en el control de calidad hacen surgir la necesidad de la identificación de nuevos marcadores que provean un mejor entendimiento de la enfermedad y evaluación en el riesgo de fractura (Hackl *et al.*, 2015).

En los últimos años, el estudio del control de la expresión génica ha sido un recurso valioso para descifrar la base molecular de muchos procesos biológicos normales y patológicos. La regulación génica mediada por miRNAs se considera un mecanismo epigenético importante. Varios estudios *in vitro* y *ex vivo* han reportado el papel de los miRNAs en el metabolismo óseo, asociándolos con la regulación de la formación, resorción, remodelado y diferenciación celular de los huesos (Cao *et al.*, 2014., Zhang *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2017). Así mismo, la expresión de ciertos miRNAs en el tejido óseo, está altamente asociada con su presencia en el suero de pacientes osteoporóticos (Feichtinger *et al.*, 2018; Mandourah *et al.*, 2018). Además, la existencia de ciertos miRNAs en el suero de pacientes con fracturas osteoporóticas puede regular la actividad de osteoblastos u osteoclastos, tal es el caso de los miRNAs miR 29b-3p, miR-30e-5p y miR-140-5p todos ellos expresados

en otros tejidos distintos al tejido óseo (Kocijan *et al.*, 2016; Li Z. *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2015). En estas condiciones, los niveles circulantes de estos miRNAs pueden estar directamente relacionados con cambios en el metabolismo óseo (Kocijan *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016; Takano *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2014). Las modificaciones de la función y supervivencia de los osteoblastos y osteoclastos son determinantes clave en el desarrollo y progreso de la osteoporosis.

Equipos de investigación que se han centrado en la caracterización ya sea en solitario o en conjunto de miRNAs circulantes relacionados a la osteoporosis u osteopenia sirven como antecedentes a este proyecto y sugieren la utilidad de los miRNAs como posibles nuevos marcadores, debido al importante papel regulatorio que tienen en células del tejido óseo.

Uno de ellos es el estudio realizado por Garmilla-Ezquerria *et al.*, 2015, donde se compararon perfiles de miRNAs diferencialmente expresados entre dos grupos de mujeres posmenopáusicas, a partir de muestras de hueso trabecular, uno con datos de fractura por osteoporosis y otro con osteoartritis.

Por medio de la tecnología de TLDA (Taqman Low Density Arrays) identificaron a los miRNAs, hsa-miR-187 y hsa-miR-518f diferencialmente expresados entre ambos grupos, con un valor de  $p < 0.05$  y un nivel de cambio de -1 ó 1. En el caso del hsa-miR-187 se encontró 5.3 veces más expresado en las muestras que no presentaban fracturas. Por el contrario, en el caso del hsa-miR-518f, su expresión se vio favorecida en las muestras de fracturas debido a osteoporosis llegando a ser 8.6 veces mayor respecto al grupo que no presentó fracturas. El análisis bioinformático mostró que los miRNAs miR-518f y miR-187 tienen un papel relevante en el metabolismo óseo y tienen como posibles blancos a genes de la vía canónica WNT (*DKK1*, *WISP1*, y *CTNNBIP1*) y de la respuesta inflamatoria (*IL-6* y *TNF*) respectivamente. Estos resultados muestran que los miRNAs y sus respectivos genes blancos están involucrados en procesos de diferenciación de osteoblastos (Moorer. & Riddle, 2018, Teufel & Hartmann, 2019, Huang *et al.*, 2018, Yoshida *et al.*, 2018, Maeda *et al.*, 2015), así como en el favorecimiento del linaje



monocito-osteoclasto (Amarasekara *et al.*, 2018, Yoshitake *et al.*, 2008, Axmann, 2009, Blanchard *et al.*, 2009).

En otro estudio similar realizado por el equipo de trabajo de Panach *et al.*, 2015, se llevó a cabo la identificación de miRNAs en muestras de suero de mujeres posmenopáusicas registradas con fracturas debidas a osteoporosis y con osteoartritis. Utilizando la misma tecnología de TLDAs se analizaron 179 miRNAs específicos de suero. Con base en valores de significancia, la relación con el metabolismo óseo y pruebas para evaluar el potencial diagnóstico de los miRNAs, se seleccionaron los miR-122-5p, miR-125b-5p y miR-21-5p como posibles marcadores candidatos para el uso diagnóstico. Un aspecto importante a resaltar es que el miR-21-5p que tuvo los mejores resultados en cuanto a significancia biológica y estadística, también es uno de los miRNAs que se ha encontrado directamente relacionado a la diferenciación de osteoclastos (Lian *et al.*, 2012), al favorecer la acción del factor de transcripción c-Fos (Grigoriadis, 1994). La expresión relativa de miR-21-5p también se encontró relacionado a la concentración en suero del Telopéptido carboxilo terminal del colágeno tipo I, el cual es un marcador de la actividad de resorción ósea.

En un estudio previo, mediante la comparación de perfiles de miRNAs específicos de suero y plasma se reportó la expresión diferencial de seis miRNAs presentes tanto en suero como en tejido óseo de individuos con osteoporosis que presentaban fracturas. De los miRNAs identificados (miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-25-3p, miR-100-5p y miR-125b-5p), el miR-21-5p se encontró principalmente expresado en el grupo de osteoporosis (Seeliger *et al.*, 2014). De igual forma los resultados de análisis bioinformáticos y la lectura revisada lo ponen en el contexto del desarrollo de osteoclastos (Sugatani *et al.*, 2013, Grigoriadis, 1994, Lian *et al.*, 2012).

Para el resto de los miRNAs identificados en este estudio excepto para el miR-25-3p se les encontró relacionados al desarrollo de osteoblastos y osteoclastos de acuerdo a la literatura. En el caso de los miRNAs miR-23a-3p y miR-24-3p se mostró

un mecanismo de regulación interesante al inhibir la diferenciación de osteoblastos por medio del factor de expresión RUNX2.

#### ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO

En investigaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo y empleando dos metodologías distintas (microarreglos y secuenciación de RNA) descritas a continuación, se identificaron miRNAs expresados en monocitos circulantes de mujeres mexicanas posmenopáusicas con osteoporosis, así como sus posibles genes blanco que tenían relación con el metabolismo óseo.

Por medio del análisis de 12 muestras de RNA (6 mujeres sanas y 6 mujeres con osteoporosis) sujetas a un ensayo en microarreglos y una etapa de validación realizada con una qPCR, se determinó una mayor expresión del miR-1270 en la condición de osteoporosis (Jiménez-Ortega, 2017). Mediante un análisis bioinformático se reconocieron genes blanco asociados al metabolismo óseo; entre los que destacó *IRF8*, el cual fue posteriormente validado por RT-qPCR. Este gen se encuentra expresado en células inmunes incluyendo monocitos (Yáñez *et al*; 2016) y juega un papel importante en la regulación negativa de la diferenciación de osteoclastos (Kimura *et al*; 2015).

Mediante la tecnología de secuenciación de RNA y su posterior validación en RT-qPCR se analizaron los RNA pequeños presentes en monocitos circulantes obtenidos de 14 muestras (7 mujeres sanas y 7 mujeres con osteoporosis), se observó una alta expresión del miR-708-5p (De La Cruz Montoya; 2018). Después de un análisis bioinformático se identificaron sus posibles genes blanco relacionados al metabolismo óseo los cuales fueron validados por una RT-qPCR. Finalmente se observó que *AKT1*, *AKT2*, *PARP1*, *FKBP5* y *MP2K3* se encontraban con una baja expresión cuando el miR-708-5p se hallaba sobreexpresado en las mujeres osteoporóticas. Estos cinco genes se encontraron fuertemente asociados al metabolismo óseo, por lo que se consideran potenciales marcadores en la osteoporosis.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La osteoporosis es una enfermedad con un alto impacto socio-económico. Hasta la fecha, el único método de diagnóstico aceptado y considerado como el “estándar de oro” para medir la DMO ha sido la absorciometría dual de rayos X. Sin embargo, existe una gran superposición en las mediciones de la DMO en pacientes con y sin osteoporosis. En este sentido el uso de moléculas derivadas del proceso de remodelado óseo como marcadores séricos sería de gran ayuda en el diagnóstico de la osteoporosis. No obstante, los marcadores específicos en pacientes osteoporóticos no están bien establecidos y sólo existen unos pocos biomarcadores concernientes a la evaluación de la formación y resorción ósea.

Debido a que los miRNAs tienen un papel clave en diversos procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos, incluyendo su asociación en alteraciones del metabolismo óseo, resulta muy atractivo desde un punto de vista diagnóstico el uso de miRNAs circulantes en fluidos biológicos, tal como el suero. En consecuencia, los miRNAs surgen como posibles candidatos en el diagnóstico de la osteoporosis, y posiblemente mucho más temprano que los biomarcadores basados en proteínas.

## JUSTIFICACIÓN

En México la osteoporosis se considera un problema de salud pública debido al impacto negativo sobre la calidad de vida de los individuos, provocando dependencia, morbilidad y un mayor índice de mortalidad; además de la intensificación en los costos por atención médica. Actualmente el método de diagnóstico de la osteoporosis está dado por la medición de la DMO a través de la técnica de DXA, considerada el estándar de oro, sin embargo, esta presenta varias limitaciones como su poca accesibilidad debido al uso de equipo y personal especializados, y su baja precisión al estimar el riesgo de fracturas.

Además de la DXA, varios marcadores bioquímicos resultantes del recambio óseo y de la actividad enzimática de osteoblastos y osteoclastos han sido considerados herramientas de interés en el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad, no obstante, estos marcadores bioquímicos no están bien establecidos y carecen de métodos estandarizados en su medición por lo que no son utilizados en la práctica clínica regular. Debido a lo anterior se ha considerado el uso de nuevas moléculas conocidas como biomarcadores entre las que se encuentran los miRNAs. Los miRNAs son moléculas de RNA cortas, de cadena sencilla, no codificantes que participan en la regulación génica a nivel postranscripcional y por lo tanto tienen un papel importante en procesos biológicos normales y patológicos.

En años recientes miRNAs extracelulares también llamados circulantes, localizados en la corriente sanguínea y diversos fluidos corporales han sido de especial interés por estar involucrados en el desarrollo de enfermedades como la osteoporosis. La identificación de miRNAs que regulan genes clave del metabolismo óseo, puede proporcionar biomarcadores útiles para la reducción de la masa ósea y, por lo tanto, un mayor riesgo de fractura. Para abordar este problema, se investigaron las diferencias en la abundancia de miRNAs en suero de mujeres mexicanas posmenopáusicas con: osteoporosis / osteopenia / fracturas asociadas a osteoporosis.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar los cambios en los patrones de expresión de los miRNAs circulantes en muestras de suero de mujeres posmenopáusicas y evaluar su posible utilidad como biomarcadores para el diagnóstico de la osteoporosis.

### Objetivos particulares

- Identificar los miRNAs diferencialmente expresados en muestras de suero de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis con respecto a un grupo de mujeres posmenopáusicas sanas.
- Determinar un panel de miRNAs circulantes que puedan ser utilizados como biomarcador y herramienta de apoyo para el diagnóstico y pronóstico de la osteoporosis.

## METODOLOGÍA

### Población de estudio. Fase de descubrimiento

Las mujeres posmenopáusicas incluidas en el estudio fueron de origen mestizo-mexicano y fueron seleccionadas del estudio de “Cohorte de Trabajadores IMSS Morelos” (CTIM) el cual es un estudio longitudinal iniciado en octubre de 1998, en Cuernavaca, México, que ha sido utilizado exitosamente para evaluar la relación entre factores de estilos de vida y el desarrollo de enfermedades crónicas de relevancia epidemiológica (Denova-Gutiérrez *et al.*, 2016).

A partir de 1026 individuos de la cohorte, los criterios de inclusión fueron los siguientes: se identificaron a los individuos que fueran mujeres, mayores de 50 años y en periodo de posmenopausia. La posmenopausia se definió como la presentación de la última menstruación al menos un año antes de ingresar al estudio, resultando en una población de n=400 mujeres posmenopáusicas.

La medición de la DMO expresada en  $\text{g/cm}^2$  se realizó mediante absorciometría de doble energía con un equipo Lunar DPX NT (Lunar Radiation Corp., Madison WI, E.E.U.U.), en columna lumbar con incidencia frontal (L2-L4) y en cadera (cuello trocánter, triangulo de Ward y total).

A continuación, se usaron los siguientes criterios de exclusión: se excluyeron a aquellos individuos que estuvieran bajo tratamientos anti-osteoporóticos, tratamiento con corticosteroides, que padecieran enfermedades crónicas severas (cáncer, diabetes, afecciones cardiacas, etc.) distintas a la osteoporosis, así como aquellos que fumaran, consumieran alcohol o drogas conocidas por intervenir en el metabolismo óseo.

La población de mujeres posmenopáusicas se distribuyó en dos fenotipos de acuerdo a la medición de la DMO en cadera y los criterios de clasificación de la OMS. Las mujeres que tuvieron una T-score de cadera (DMO de cadera)  $< -2.5$ , se denominaron como osteoporóticas (debajo del 20% de la población correspondiente con edad, sexo y etnia); y aquellas que tuvieron una T-score de cadera  $> -1.0$ , se denominaron como normales.

De los extremos de ambos fenotipos de la muestra se seleccionaron 20 mujeres con alta DMO para conformar el grupo denominado como “Normal” (control) y 20 mujeres con baja DMO que formaron el grupo denominado “Osteoporosis” (caso). A manera de un criterio de inclusión en esta etapa de selección, ambos grupos fueron ajustados considerando sus valores de Edad e Índice de Masa Corporal (IMC), lo anterior con el fin de homogenizar las características de los individuos que integran los grupos de estudio.

#### Evaluaciones antropométricas y bioquímicas en sujetos de estudio

La colección de datos fue obtenida de análisis clínicos y de un cuestionario auto aplicado, diseñados para recabar factores de riesgo de enfermedades crónicas. Estos datos incluyeron: estilo de vida, historial médico, mediciones antropométricas y evaluaciones clínicas. Para el presente estudio se consideraron el peso corporal, la altura, edad, glucosa en sangre, consumo de alcohol y tabaco, edad de la menarca, así como actividad física, uso de tratamientos hormonales postmenopáusicos, y suplementos alimenticios que intervinieran en el metabolismo óseo. El IMC fue calculado a partir del peso del individuo (Kg) dividido por su altura (m<sup>2</sup>). Las características clínicas detalladas de la población fueron previamente reportadas por Denova-Gutierrez et al., 2016.

Por otro lado la presencia de patologías distintas a la osteoporosis, como insuficiencia renal crónica evaluada por niveles de creatinina en suero (>1.9 mg/dl), diabetes mellitus, enfermedad crónica del hígado o alcoholismo, tratamientos con corticosteroides, artritis reumatoide o colagenopatías, igualmente síndromes en otros órganos endocrinos que pudieran afectar la masa ósea, como hipertiroidismo, tratamientos con bifosfonatos, terapias de remplazo hormonal y condiciones con un origen distinto al genético que modificaran la DMO fueron descartados de la población de estudio.

#### Extracción de RNA en suero

Previo a la obtención de la muestra de sangre, los donantes firmaron una carta de consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Instituto Nacional de Medicina Genómica, basados en los

principios establecidos en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

La muestra de suero se obtuvo a partir de 4 ml de sangre periférica realizada en condiciones de ayuno. La obtención de suero se hizo mediante la centrifugación de las muestras a 3000 rpm durante 10 minutos, inmediatamente las alícuotas de suero fueron mantenidas a -80°C para su posterior procesamiento.

Mediante el uso del kit miRNeasy Serum/Plasma (cat. 217184, QIAGEN, Hilden, Germany) se efectuó la extracción de RNA total (principalmente miRNAs y otros RNAs pequeños), Este kit emplea columnas con membrana de sílica donde las moléculas de RNA se unen por afinidad electrónica, permitiendo eliminar los contaminantes con lavados, esto con el fin de disminuir la posible contaminación con sales o fenol; y obtener una alta pureza para el análisis. Para la obtención de los miRNAs se utilizaron 200 µl de suero de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Tanto la concentración como la pureza de las muestras de RNA obtenidas fueron cuantificadas usando el Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, E.E.U.U). Todas las muestras se mantuvieron a -80°C, antes de la RT-qPCR, para evitar su degradación.

#### Control de calidad de muestras de suero y RNA

Debido a que la contaminación celular y la hemólisis de eritrocitos ocurre muy frecuentemente durante la toma de muestra y su procesamiento, llegando a ser las causas principales en la variación de los niveles de biomarcadores basados en miRNAs encontrados en suero y plasma; y no a diferencias biológicas (Kirschner, *et al.*, 2013; Blondal, *et al.*, 2013), se evaluó la calidad de las muestras con respecto a la hemólisis midiendo la absorbancia de la hemoglobina a  $\lambda$  414 nm en el equipo Nanodrop ND-1000.

Además, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad para miRNAs y otros RNAs pequeños en las muestras por medio del chip Small RNA Analysis en el bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc, CA, E.E.U.U).



## Procesamiento de muestras de miRNAs

Con el fin de disminuir la variabilidad entre individuos e incrementar nuestro poder estadístico, así como reducir el sesgo que introduce cada miembro de una población se decidió trabajar usando más de una muestra de RNA de cada grupo por análisis de expresión ("*pools*").

El uso de *pools* es frecuente en ensayos de expresión diferencial de miRNAs, especialmente si el interés principal es evaluar los niveles de expresión promedio en una población y no la variación de esa expresión dentro de los individuos de la población, además de que es una forma de maximizar la precisión de los resultados.

Se hicieron cuatro *pools* para cada grupo, los cuales estaban integrados por cinco muestras. La concentración de cada muestra por individuo fue de 30 ng/ $\mu$ l, como resultado cada *pool* estuvo constituido por 150 ng/ $\mu$ l de RNA., finalmente se tomaron 30 ng para llevar a cabo el paso a cDNA.

## Análisis de miRNAs en suero. Fase de descubrimiento

Para iniciar la detección de miRNAs en plasma se realizó la reacción de retro transcripción para el paso a cDNA (RT-PCR), la cual se llevó a cabo con los oligonucleótidos de Megaplex RT Primers Human Pool A v2.1 y Pool B v3.0 y el Kit TaqMan miRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.E.U.U.). Para la mezcla de la reacción se utilizaron los siguientes parámetros: 40 ciclos a 16°C por 2 minutos, 42°C por 1 minuto y 50°C por 1 segundo. Después se mantuvo a 85°C por 5 minutos para generar la librería de cDNA.

Posteriormente se llevó a cabo una reacción de pre-amplificación global (PCR multiplex), con el fin de generar copias suficientes de blancos específicos de cDNA para un adecuado análisis de expresión.

La estrategia más común en una reacción de pre amplificación está basada en el uso de pools de oligonucleótidos específicos (PCR multiplex). La PCR de pre-amplificación consiste en un número limitado de ciclos con el fin de evitar la competencia de reactivos entre reacciones paralelas. Con el propósito de reducir la formación de productos de PCR no específicos, la concentración de

oligonucleótidos es de 10 a 20 veces menor que una reacción de PCR standard, sin embargo, las bajas concentraciones en los oligonucleótidos son compensadas con amplios periodos de alineamiento (Andersson, *et al.*, 2015).

Para la reacción de pre-amplificación se utilizaron los oligonucleótidos de Megaplex PreAmp Primers y la mezcla de TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems Foster City, CA, E.E.U.U.), siguiendo las instrucciones del proveedor. El perfil térmico fue el siguiente: 95°C por 10 minutos, 55°C por 2 minutos y 72° por 2 minutos, a continuación, se mantuvo por 12 ciclos a, 95°C por 15 segundos y 60°C por 4 minutos, finalmente se dejó a 99.9°C por 10 minutos y cada reacción se diluyó en 75 µl de agua libre de RNAsas.

El análisis cuantitativo del perfil global de miRNAs en suero se realizó en el equipo de PCR en Tiempo-Real QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System de Applied Biosystems usando un sistema de placas Taq Man Array Human MicroRNA A + B Card Set v3.0 (Applied Biosystems Foster City, CA, E.E.U.U.), diseñado para identificar 754 miRNAs descritos en humano y biológicamente más relevantes de acuerdo a la base de datos miRBase v21.

La reacción de PCR cuantitativa (qPCR) se realizó con el TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems Foster City, CA, E.E.U.U.), para amplificar el cDNA previamente pre amplificado, usando secuencias específicas de oligonucleótidos en el sistema de TaqMan Human Array Card A y Card B v3.0, siguiendo el perfil térmico dado por el proveedor: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y a 60° C por 60 segundos. Una vez finalizadas las reacciones, se seleccionaron los valores para el análisis de expresión diferencial con un umbral a 0.02 y se consideraron únicamente valores de Ct (ciclo umbral, número de ciclo en el que la reacción de la muestra supera el umbral de fluorescencia) por debajo de 40. La cuantificación relativa de miRNAs fue realizada mediante el software Expression Suite 1.3 (Applied Biosystems Foster City, CA, E.E.U.U.). Para normalizar la expresión de los miRNAs se utilizaron los niveles del RNU6 (Small nuclear RNU6), el cual es uno de los RNA´s pequeños comúnmente reportados como control, debido a su expresión constitutiva en células eucariontes

de mamíferos. Aquellos miRNAs que presentaron veces de cambio (Log 2 Fold-Change) mayores a 2 y un valor de significancia (Valor-p) menor a 0.05 fueron considerados con una expresión diferencial para el grupo de mujeres con Osteoporosis.

#### Fase de validación

En la etapa de validación se continuó trabajando con los dos grupos de estudio: Normal y Osteoporosis.

Los individuos integrantes de la población de estudio, incluidos en la fase de validación se derivaron de tres cohortes, 1) la cohorte de Trabajadores IMSS Morelos, que integra algunas de las muestras consideradas en la fase de descubrimiento; 2) La cohorte del Hospital Central Sur de Alta Especialidad PEMEX; y 3) La cohorte del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

La cohorte del INR contempló 21 mujeres con fracturas debidas a osteoporosis, (17 de ellas con fractura en el cuello femoral, 3 en muñeca y 1 en espina lumbar), integrando el grupo denominado de “Fractura”, con el cual se buscó analizar individuos en un grado avanzado de osteoporosis. El tiempo transcurrido entre la fractura y la toma de muestra para todas las mujeres fue de 1 día hasta 1 mes. Ninguna de las muestras fue obtenida después de 31 días de la fractura. Lo anterior con el fin de evitar alteraciones en los perfiles de los miRNAs debido a la reparación de las fracturas. Únicamente para este grupo no se obtuvieron datos recientes de la DMO. Tanto el grupo Normal como el grupo de Osteoporosis estuvieron conformados por individuos de la cohorte CTIM y del Hospital de PEMEX. En síntesis, para la etapa de validación se reclutaron 22 mujeres para el grupo Normal, 44 mujeres en el grupo de Osteoporosis y 21 mujeres con fractura. Todas las mujeres del estudio firmaron el consentimiento informado previo al estudio.

#### Análisis de expresión de miRNAs – Fase de Validación

Una vez que se seleccionaron los miRNAs diferencialmente expresados por medio del nivel de cambio y valores de significancia (valor de p) obtenidos en la etapa de descubrimiento, se continuó con el ensayo de RT-qPCR en las muestras independientes.

La reacción de reverso-transcripción para convertir los miRNAs a cDNA, se hizo a partir de 5 µl por muestra utilizando el Kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems Foster City, CA, E.E.U.U.) y pools de oligonucleótidos para hsa-miR-23b, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-885-5p y el RNU6 como control de expresión interno (RT-PCR multiplex). A continuación, se llevó a cabo una reacción de pre-amplificación con el objetivo de aumentar el número de copias para la cuantificación de los productos de cDNA obtenidos.

La reacción de qPCR se llevó a cabo con el TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems Foster City, CA, E.E.U.U.) y sondas TaqMan: miR-23b-3p (Assay ID. 000400), miR-140-3p (Assay ID. 002234) y el miR-885-5p (Assay ID 002296); de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Todas las reacciones incluyeron controles sin templado y se trabajaron por triplicado. Los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a la expresión de RNU6 (Assay ID. 001973). Los valores de la cuantificación relativa de los miRNAs de cada muestra se calcularon por medio del método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = [CT_{miRNA} - CT_{U6}] - [\Delta Ct_{all\ samples\ mean}]$ . Los valores de expresión son expresados como Log2 Fold Change.

#### Análisis de curvas ROC

Con el fin de evaluar el potencial diagnóstico de los miRNAs se realizaron análisis de curvas ROC, las cuales miden la discriminación diagnóstica por medio de la sensibilidad y la especificidad de una prueba en relación a un criterio de referencia, que se considera verdadero. La sensibilidad nos indica la capacidad de detectar a un sujeto enfermo, mientras que la especificidad indica la capacidad que tiene la prueba de identificar como sanos a los que realmente no están enfermos. Los valores de sensibilidad y especificidad conforman un área bajo la curva la cual nos indica la probabilidad de reconocer la condición de interés. Las curvas ROC y su correspondiente área bajo la curva (AUC) estimada fueron hechas de manera individual para cada miRNA con un intervalo de confianza del 95% para los valores del AUC.

## Análisis Estadístico

El análisis estadístico, así como las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.01v. Los datos provenientes de la comparación de expresión son expresados en Log2 Fold Change para su normalización y fueron analizados mediante pruebas no paramétricas de Mann-Whitney de dos colas. Se consideró estadísticamente significativo a aquellos que presentaran valores de  $p < 0.05$ . Los datos descriptivos de los grupos de estudio son expresados como Media  $\pm$  Desviación estándar (DE). Se llevó a cabo un análisis de correlación para ver la relación que existe entre las variables de edad y DMO, con la expresión relativa (Log2 FC), mediante una prueba de correlación de Spearman. El valor de correlación (pendiente) para la hipótesis nula fue de  $R=0$ , mientras que su valor de significancia fue de 0.05 (valor- $p < 0.005$ ).

## Predicción de genes blanco y Red de interacción

Con el objetivo de evaluar los posibles blancos de los miRNAs validados por RT-qPCR se realizó un análisis bioinformático. La búsqueda de sus genes blanco se hizo en las siguientes bases de datos: miRWalk v3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>), PicTar (<https://pictar.mdc-berlin.de>), miRDB (<http://mirdb.org>), PITA ([https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07\\_prediction.html](https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html)), DIANA (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>), Rna22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive>), miRBridge y TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_72](http://www.targetscan.org/vert_72)), tomando como criterio de corte que estuvieran presentes en al menos 3 bases de datos. Estos programas de predicción de genes putativos se conducen mediante diferentes algoritmos que toman en cuenta características en común al ocurrir la interacción miRNA/mRNA como lo son el apareamiento de la región semilla, regiones conservadas, energía libre y accesibilidad al sitio de unión (Peterson, *et al.*, 2014).

Posteriormente para tener una aproximación del papel de estos microRNAs en un contexto biológico, principalmente enfocado en el metabolismo óseo; los genes blancos identificados para estos miRNAs fueron utilizados en un análisis de vías de señalización a través de las bases de datos DAVID

(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>), KOBAS v2.0 ([http://kobas.cbi.pku.edu.cn/anno\\_iden.php](http://kobas.cbi.pku.edu.cn/anno_iden.php)) (Wu *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2011) y KEGG pathway (<https://www.genome.jp/kegg/>). Las vías resultantes fueron seleccionadas tomando en cuenta los valores de FDR y su asociación con el metabolismo óseo.

Para el enriquecimiento en la selección de los genes candidatos se hizo una búsqueda en PubMed de los genes y los miRNAs reportados con relación al metabolismo óseo.

Posteriormente se extrajeron los genes que participan en las vías de señalización seleccionadas para construir una red de interacción entre 11 potenciales genes y 2 miRNAs. Finalmente se elaboró una red de asociación entre genes y miRNAs con ayuda de la base de datos STRING (<https://string-db.org>) y el software Cytoscape v3.5.1 (Shannon, *et al.*, 2003), para representar la posible participación y funcionalidad entre estos.

## RESULTADOS

### Características clínicas

Las características detalladas de las mujeres posmenopáusicas en las muestras de descubrimiento y validación se muestran en la Tabla 7. No se observaron diferencias significativas en la edad y el IMC entre los casos y los controles, en la muestra de descubrimiento, siendo el IMC de 23.73 kg/m<sup>2</sup> para el grupo normal y de 23.85 kg/m<sup>2</sup> para el grupo de osteoporosis. En lo que respecta a la edad media del grupo de osteoporosis fue 73.35 ± 4.46 años y 71.1 ± 3.72 años para el grupo normal; sin embargo, la DMO de cadera fue significativamente diferente entre los grupos ( $p = 1.450 \times 10^{-11}$ ).

En las muestras de validación, se observaron diferencias en la edad para el grupo de osteoporosis (67.3 años;  $p=0.0067$ ) y fractura (82.8 años;  $p=4.08 \times 10^{-7}$ ), siendo la edad mayor en estos grupos en comparación con el grupo normal (61 años). Además, se encontró una diferencia estadísticamente significativa para el grupo de fractura (24.3 kg/m<sup>2</sup>;  $p=0.030$ ) en el IMC respecto a los controles (27.6 kg/m<sup>2</sup>).

En ambas etapas experimentales se mostraron diferencias significativas en la variable de glucosa, no obstante, el promedio en ambos grupos era muy semejante y las concentraciones consideradas como hiperglicémicas son características en individuos con edades avanzadas (Lee & Halter, 2017). Cabe mencionar que estos niveles no afectan a nuestro grupo de interés.

**Tabla 8.** Características de la población de estudio.

<i>Etapa experimental</i>	<i>Edad (años)</i>	<i>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</i>	<i>Glucosa (mg/dl)</i>	<i>DMO Cadera (g/cm<sup>2</sup>)</i>
<b>Descubrimiento</b>				
Normal (n = 20)	71.1 ± 3.72	23.73 ± 1.07	115 ± 30.69	0.915 ± 0.05
Osteoporosis (n = 20)	73.35 ± 4.46 p = 0.114	23.85 ± 2.78 p = 0.323	96.05 ± 10.15 p = 0.0156	0.644 ± 0.03 p = 1.450E-11
<b>Validación</b>				
Normal (n = 22)	61 ± 6.89	27.60 ± 4.83	107.80 ± 31.85	0.951 ± 0.09
Osteoporosis (n = 44)	67.31 ± 8.98 p = 0.0067	26.48 ± 5.19 p = 0.5039	101.35 ± 26.80 p = 0.0809	0.709 ± 0.10 p = 2.34E-08
Fractura (n = 21)	82.85 ± 8.54 p = 4.084E-7	24.32 ± 3.87 p = 0.0308	–	–

Los datos son expresados como Media ± DE. Los valores de DE y de p son en relación al grupo Normal particular al grupo de descubrimiento o de validación.

#### Análisis de microRNAs – Etapa de descubrimiento

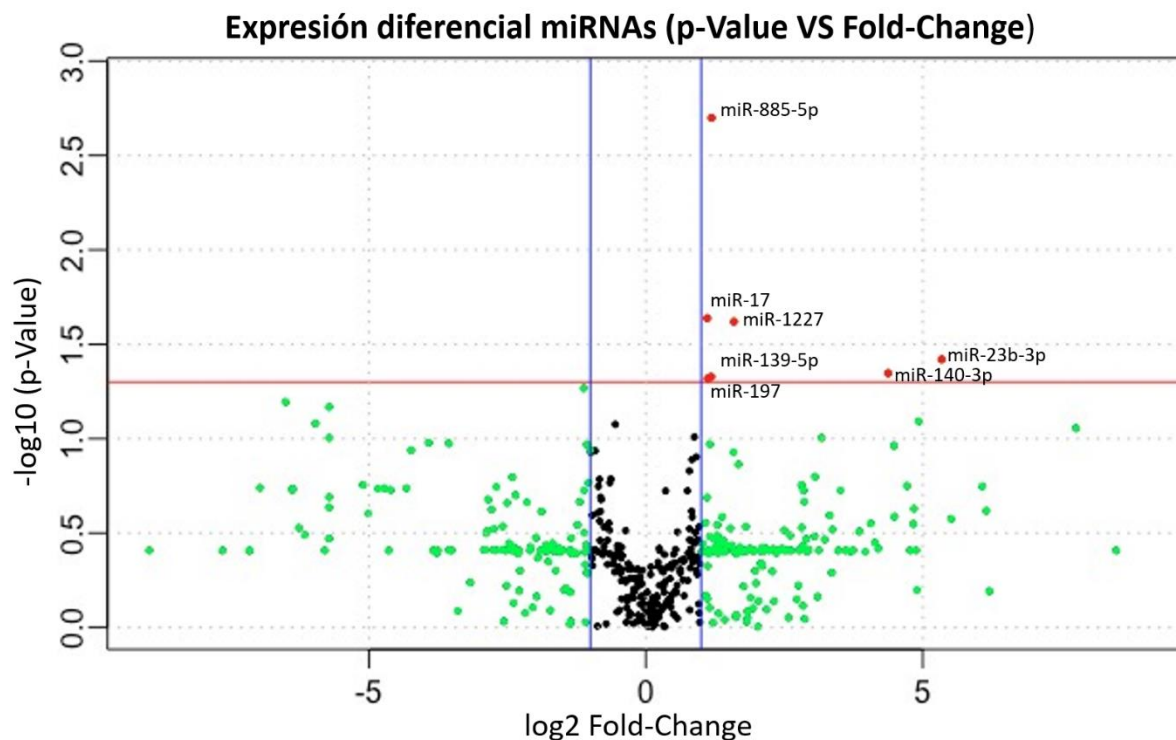
El análisis consideró únicamente a los miRNAs que presentaran un valor  $C_t < 40$ . No hubo microRNAs que no fueran detectados en alguna de las muestras en ambos grupos.

No se encontraron diferencias en los  $C_t$  para los miRNAs evaluados como controles de calidad (miR-15b, miR-16, miR-24 y miR-122), asegurándose así la homogeneidad de las muestras y que las diferencias en los niveles de microRNAs no eran debidos a la técnica de extracción. Para evaluar el porcentaje de hemólisis de las muestras se midió la absorbancia a 414 nm para cuantificar la cantidad de hemoglobina en suero. Sí la lectura excedía un valor de 0.2 se consideraba hemolizada de acuerdo con reportes anteriores (Kirschner *et al.*, 2013). Todas las muestras presentaron lecturas de absorbancia entre 0.14 y 0.18, indicando que no había presencia de hemólisis.

El análisis de los ensayos de RT-qPCR para evaluar la expresión diferencial de miRNAs en las muestras de suero mostró que de los 754 miRNAs estudiados, 270 (35.8%) fueron detectados en todas las muestras, tanto casos como controles. Los 270 miRNAs detectados dentro de ambos pools fueron similares a los reportados previamente en muestras de suero y de hueso trabecular de personas con fracturas osteoporóticas (Garmilla-Ezquerro *et al.*, 2015; Kocijan *et al.*, 2016).



El análisis de los niveles de expresión de miRNAs donde se comparan las muestras del grupo de osteoporosis respecto al grupo normal permitió la identificación de siete miRNAs con una expresión significativamente más alta (miR-885-5p, miR-17, miR-1227, miR-139-5p, miR-197, miR-23b-3p y miR-140-3p) en el grupo de osteoporosis. Como se puede observar en la grafica de volcano (Figura 13), estos miRNAs se encuentran en color rojo, lo que indica que sus valores de cambio referentes a su expresión (FC) son mayores a 1 (eje horizontal). Esta significancia biológica además es acompañada de una significancia estadística (valor p) menor a 0.05 (eje vertical). Los miRNAs con alta expresión y sus valores se muestran en la Tabla 8.



**Figura 13.** Análisis de expresión diferencial de miRNAs.

Gráfica de Volcano plot, donde se muestra la expresión de los miRNAs en los grupos de Normales vs Osteoporosis. Los miRNAs miR-885-5p, miR-140-3p y miR-23b-3p fueron seleccionados para su validación en muestras independientes de acuerdo a los niveles de expresión y significancia estadística.

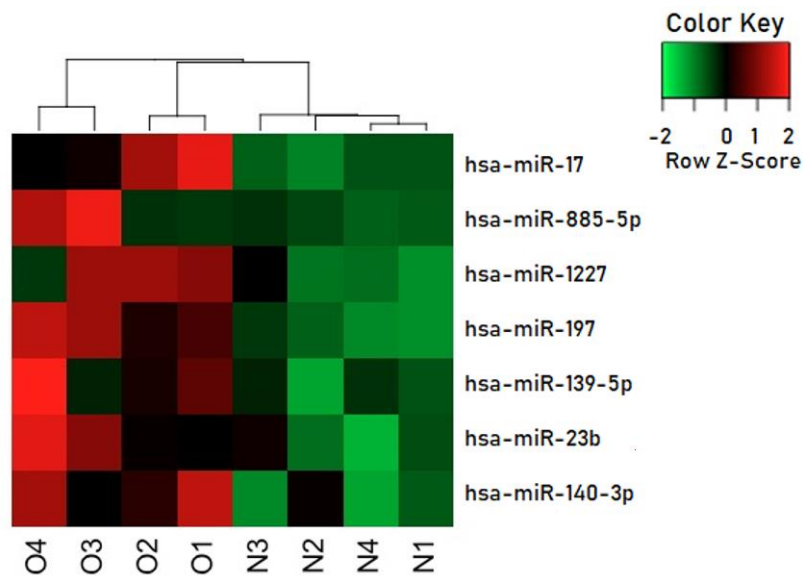
Usando un análisis jerárquico de agrupamiento euclidiano se realizó un mapa de calor (Figura 14) donde se observa el comportamiento de los siete miRNAs con expresión

diferencial entre los pools que componen a los grupos experimentales. El color indica el valor de cambio, rojo se refiere a un aumento y verde a una disminución.

**Tabla 9.** Valores de cambio y significancia de los miRNAs con expresión diferencial.

MicroRNA	Log <sub>2</sub> FC	Valor p
<i>hsa-miR-23b-3p</i>	5.342	0.038
<i>hsa-miR-140-3p</i>	4.375	0.045
<i>hsa-miR-885-5p</i>	1.188	0.002
<i>hsa-miR-139-5p</i>	1.182	0.047
<i>hsa-miR-17</i>	1.11	0.023
<i>hsa-miR-197</i>	1.119	0.048
<i>hsa-miR1227</i>	1.593	0.024

Valores de cambio FC (Log2) y valores p (<0.05), resultantes del análisis de expresión diferencial. Los miRNAs seleccionados en la etapa de validación son resaltados.



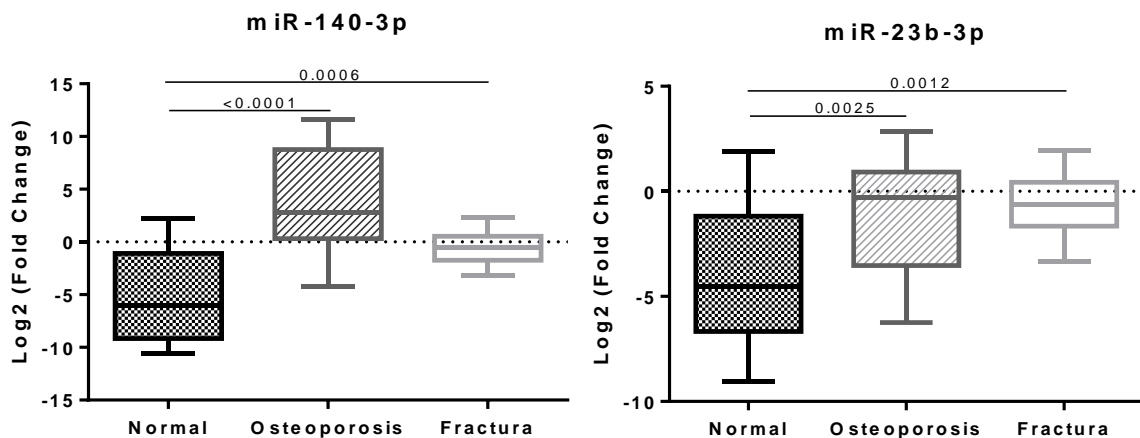
**Figura 14.** Heatmap (mapa de calor) de la expresión diferencial entre los grupos. Se muestra en verde los miRNAs sub expresados y en rojo los sobre expresados. La distancia entre los grupos se hizo mediante un análisis euclidiano, donde se observan los dos conjuntos con respecto a sus valores de expresión.

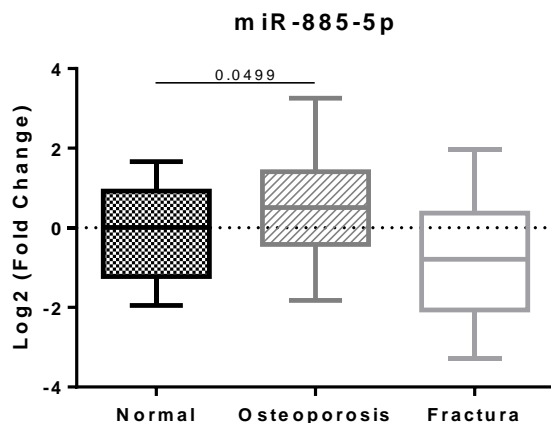
### Análisis de miRNAs – Etapa de validación

Teniendo en cuenta las diferencias significativas en la expresión identificadas en la etapa de descubrimiento, los miRNAs miR-23b-3p, miR-140-3p y miR-885-5p fueron seleccionados para su validación en función de sus valores de cambio (*Fold Change*) y su relación con el metabolismo óseo. Estos microRNAs fueron

analizados en tres grupos independientes, incluyendo muestras de 21 mujeres con fracturas osteoporóticas de cuello femoral, 44 mujeres con osteoporosis y 22 mujeres sanas. En la Figura 15 se muestran los niveles de expresión de los tres miRNAs en suero en los grupos de fractura de cuello femoral y osteoporosis en comparación con el grupo control.

Se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión del miR-140-3p en los grupos de osteoporosis ( $p = 3.898 \times 10^{-8}$ ), y fractura ( $p = 0.0006$ ) con respecto al grupo control (Figura 15). En particular para el grupo de osteoporosis, el aumento en el nivel de expresión del miR-140-3p fue similar al presentado en la etapa de descubrimiento, no obstante, como ya se mencionó su significancia estadística fue mayor. En lo que se refiere al miR-23b-3p, su ganancia en nivel de expresión fue significativamente diferente para el grupo de osteoporosis ( $p = 0.0025$ ) y fractura ( $p = 0.0012$ ). No obstante, para el grupo de osteoporosis, el miR-23b-3p disminuyó su valor de expresión en comparación a los obtenidos en la fase de descubrimiento. Por su parte, el aumento en el nivel del miR-885-5p fue solo ligeramente significativo para el grupo de osteoporosis ( $p = 0.0499$ ). Cabe señalar que el valor de cambio del miR-885-5p en el grupo de osteoporosis se mantiene similar al obtenido en la fase de descubrimiento.

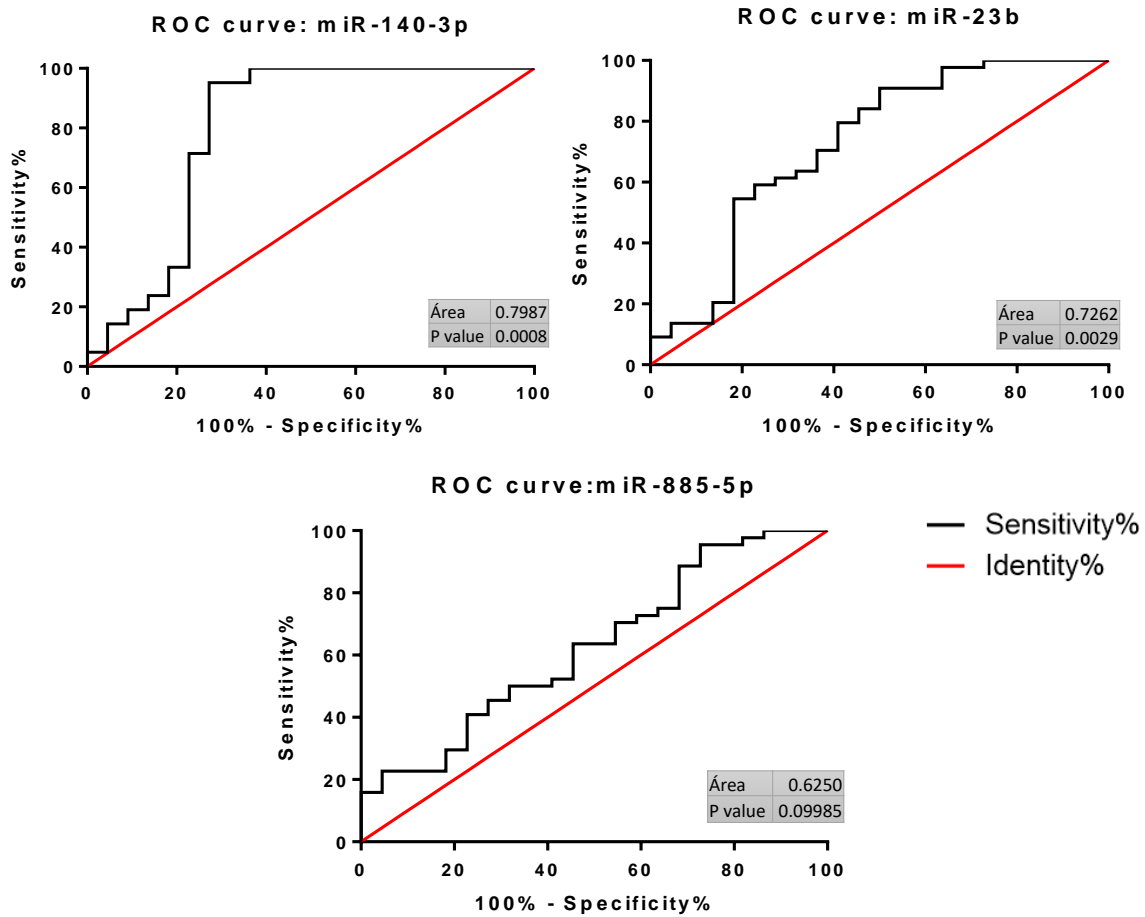




**Figura 15.** Expresión relativa en la fase de validación para el hsa-miR-140-3p, hsa-miR-23b y hsa-miR-885-5p en los grupos de Normal, Osteoporosis y Fractura. La expresión relativa es expresada en Log2 Fold Change. Los tres miRNAs muestran diferencias significativas en la comparación del grupo Osteoporosis con respecto al grupo Normal.

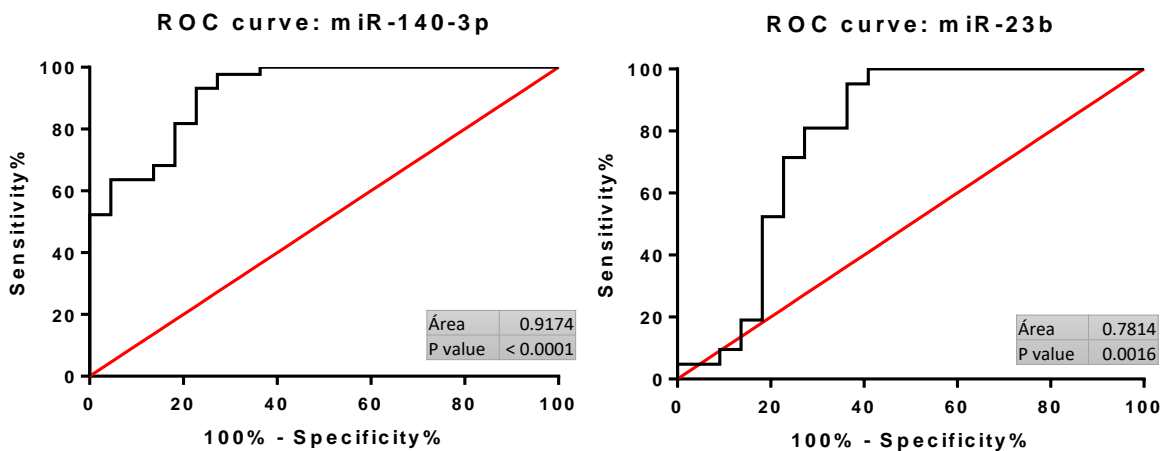
Se realizaron análisis de curvas Características Operativas del Receptor (ROC) para el miR-140-3p, el miR-23b-3p y el miR-885-5p para evaluar su potencial discriminatorio entre las mujeres sanas y con osteoporosis (Figuras 16 y 17). Para el miR-140-3p, las áreas bajo la curva se calcularon en el grupo de osteoporosis (AUC = 0.7987) y fractura (AUC = 0.9174). Para estos grupos se encontraron valores  $p$  inferiores o cercanos a 0.0001. En el caso del miR-23b-3p se obtuvieron valores menos significativos para osteoporosis (AUC = 0.7262,  $p$  = 0.0029) y fractura (AUC = 0.7814,  $p$  = 0.0016). Sin embargo, para el miR-885-5p, ninguno de los grupos presentó significancia. Nuestros resultados demuestran que los miR-140-3p y miR-23b-3p son potenciales candidatos como marcadores de la pérdida de DMO, así como en la evaluación del riesgo de fractura (Figuras 16 y 17).

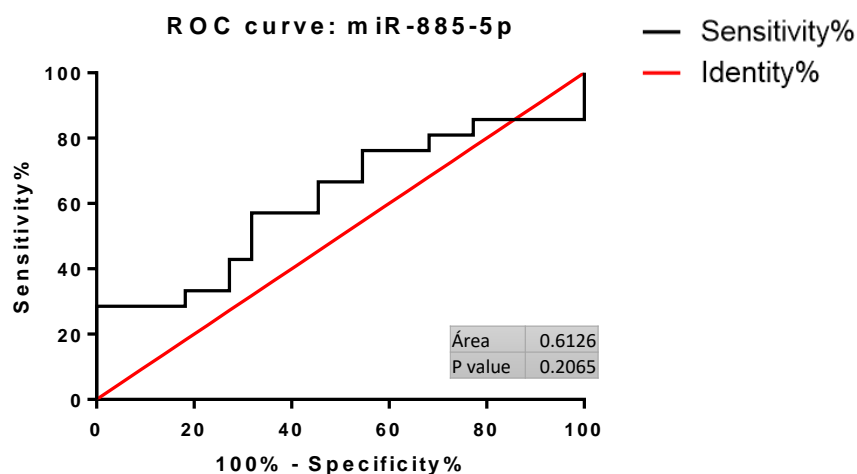
## Análisis de curvas ROC: Normal vs Osteoporosis



**Figura 16.** Análisis de curvas ROC: Normal vs Osteoporosis. Se muestra el potencial diagnóstico de los miRNAs: miR-140-3p, miR-23b y miR-885-5p, para el grupo Normal y Osteoporosis.

## Análisis de curvas ROC: Normal vs Fractura





**Figura 17.** Análisis de curvas ROC: Normal vs Fractura.

Se muestra el potencial diagnóstico de los miRNAs: miR-140-3p, miR-23b y miR-885-5p, para el grupo Normal y Fractura.

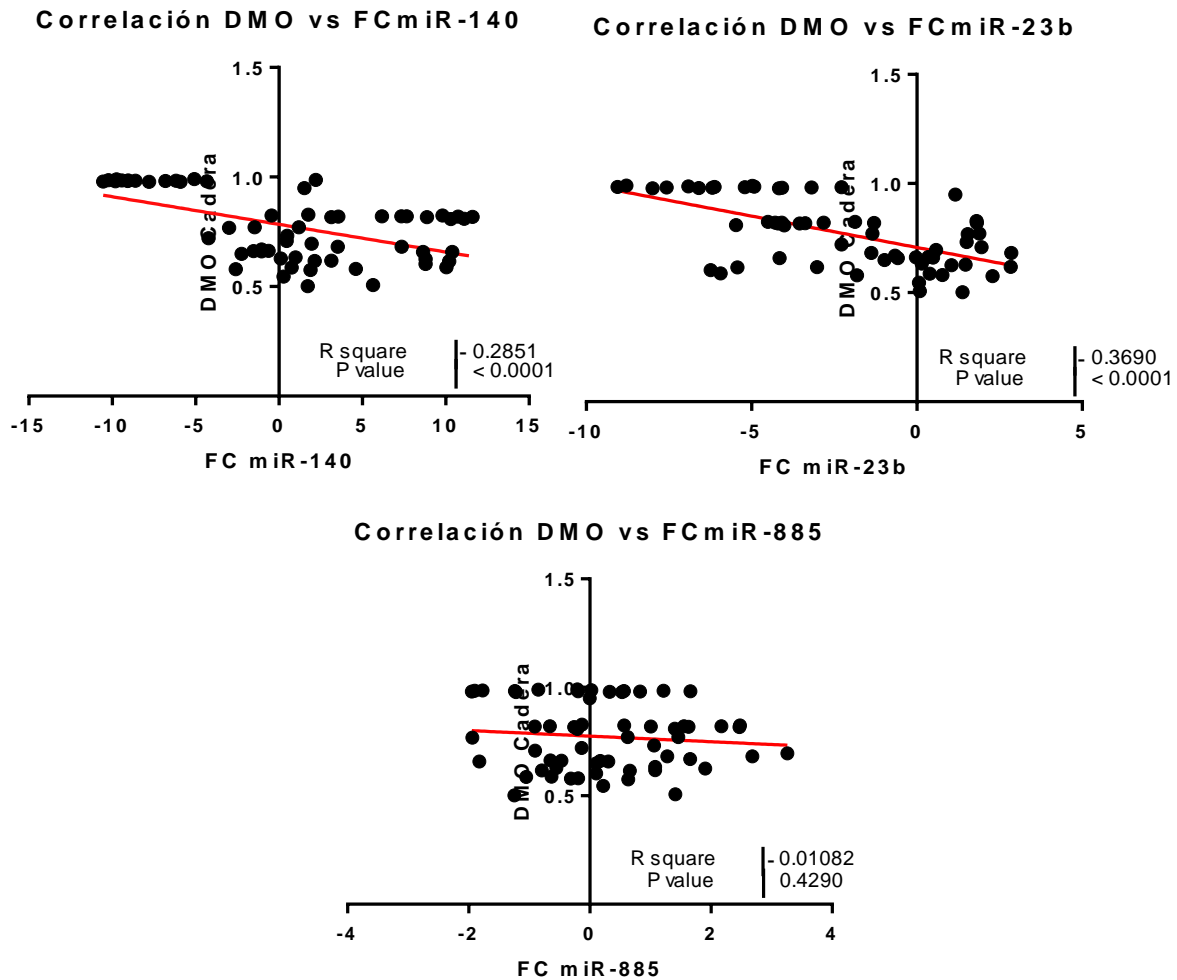
**Tabla 10.** Valores de análisis de curvas ROC.

miRNA	Grupos de estudio	AUC	95% CI	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	p-Value
miR-23b-3p	Norm VS OP	0.726	0.5840 - 0.8685	57.657	65.314	0.0029
	Norm VS Frac	0.781	0.6303 - 0.9325	64.739	64.069	0.0015
miR-140-3p	Norm VS OP	0.917	0.8469 - 0.9878	64.125	78.251	<0.0001
	Norm vs Frac	0.798	0.6513 - 0.9461	65.646	64.934	0.0008
miR-885-5p	Norm VS OP	0.625	0.4810 - 0.7690	54.230	58.461	0.0998
	Norm VS Frac	0.612	0.4391 - 0.7860	55.894	55.627	0.2065

Correlación de la DMO de cadera y niveles séricos de los miRNAs analizados.

Se evaluó la correlación entre los niveles séricos de miR-140-3p, miR-23b-3p y miR-885-5p, y la DMO correspondiente a las mujeres que proporcionaron las muestras de suero analizadas en la fase de validación. Se encontró una correlación negativa significativa para el miR-140-3p ( $r = -0.2851$ ,  $p = < 0.0001$ ) y el miR-23b-3p ( $r = -0.3690$ ,  $p = < 0.0001$ ). Esta correlación negativa indica que tanto el miR-23b-3p como el miR-140-3p se encuentran elevados en individuos con osteoporosis, donde la DMO se encuentra reducida, lo cual concuerda con lo observado en el estudio de casos y controles. Por consiguiente, a una menor DMO corresponde un mayor

aumento en los niveles de expresión de miR-140-3p y miR-23b-3p. Con respecto al miR-885-5p, no se encontró una correlación significativa (Figura 18).

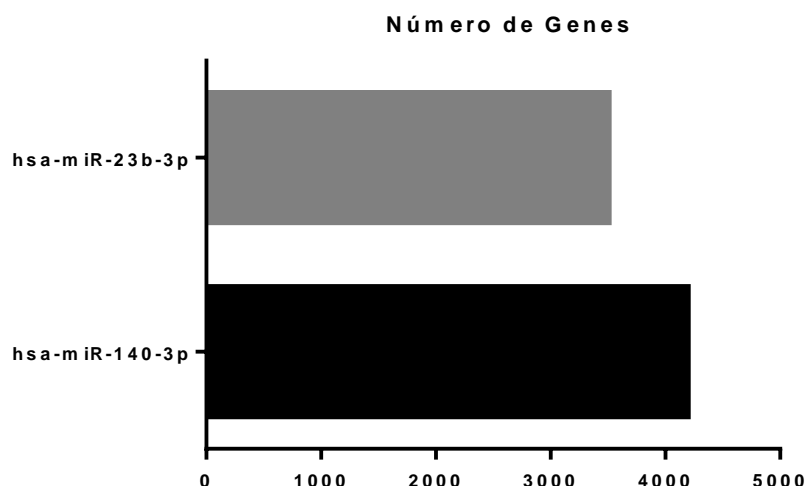


**Figura 18.** Análisis de correlación entre la variable DMO y la expresión del miRNA. Se puede observar que tanto para el hsa-miR-23b y el hsa-miR-140-3p el valor de correlación ( $R^2$ ) es significativo, resultando en una correlación negativa, mientras que para el hsa-miR-885-5p, no hay correlación entre las variables, y la significancia es nula.

#### Predicción de genes blanco y Análisis in silico

Mediante análisis bioinformático, se encontraron 4195 genes blanco para el miR-140-3p, al mismo tiempo que para el miR-23b-3p, se predijeron 3507 genes blanco (Figura 19). Más adelante estos genes se filtraron en un análisis de vías de señalización, centrándonos en varios genes asociados con vías KEGG relacionadas al metabolismo óseo (Tabla 10) de acuerdo con la literatura. Con los genes que integran las vías de interacción resultantes, se construyó una red de interacción

centrada en once genes cuyo papel ha sido reportado en el metabolismo óseo (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *BMP2*, *FOXO3*, *GSK3B*, *IL6R*, *PRKACB*, *RUNX2* y *WNT5*) (Figura 20).



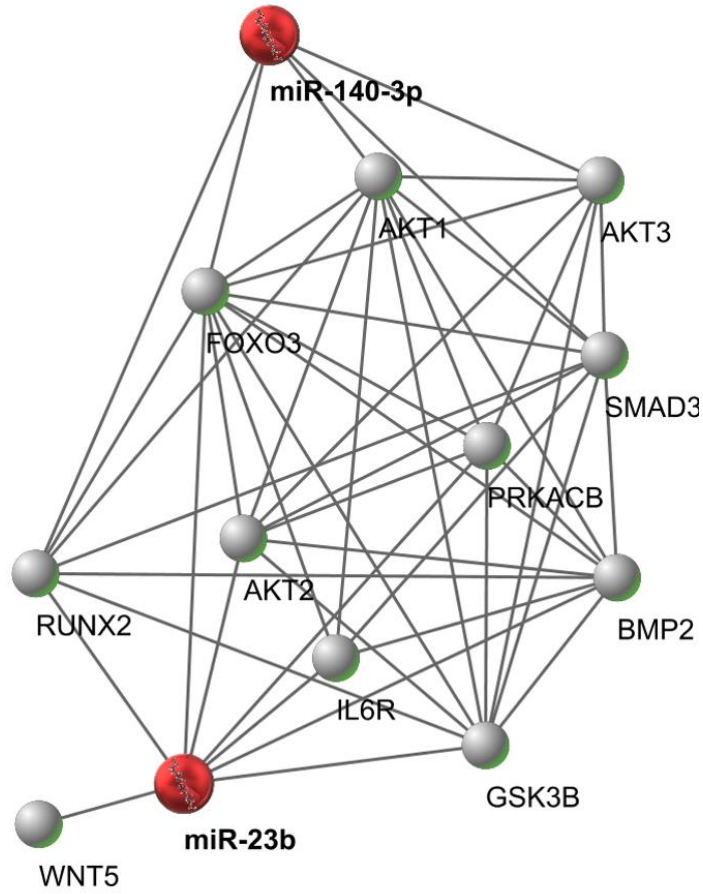
**Figura 19.** Búsqueda de genes blanco totales en bases de datos para el hsa-miR-140-3p y el hsa-miR-23b-3p.

**Tabla 11.** Análisis de vías KEGG para genes blanco del miR-23b-3p & miR-140-3p, relacionados al metabolismo óseo

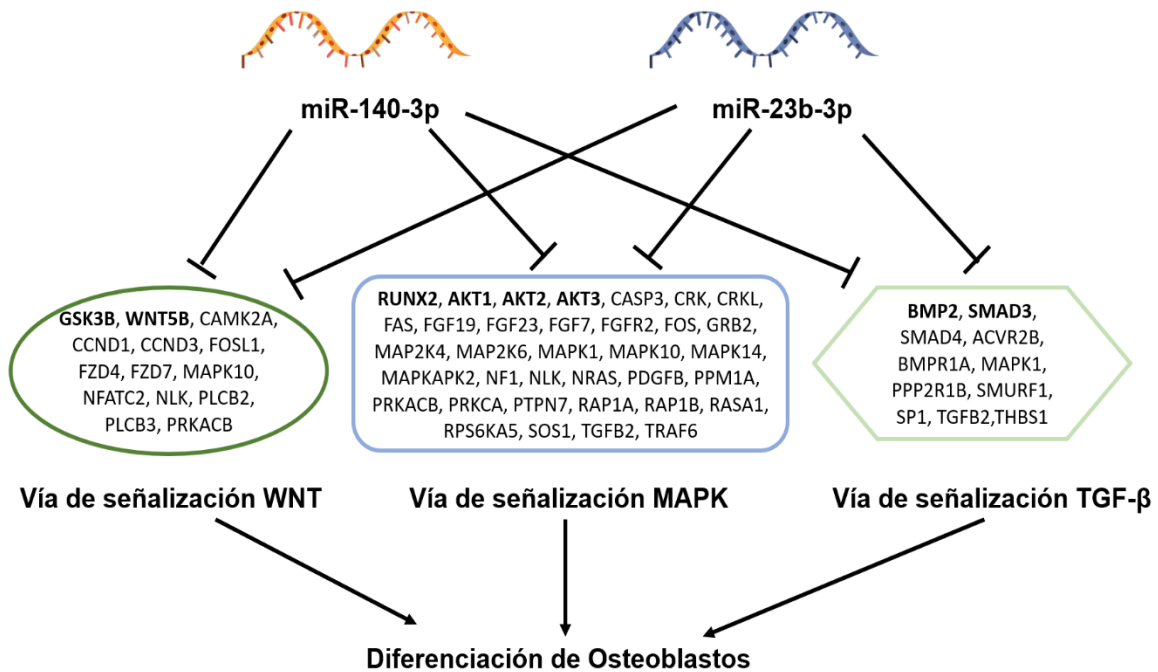
KEGG pathway	Pathway ID	Genes blanco de miR-23b-3p y miR-140-3p, presentes en la vía de señalización	Genes totales en la vía	p-Value	Valor de p corregido
Ras signaling pathway	hsa04014	49	228	$1.05 \times 10^{-08}$	$2.80 \times 10^{-07}$
MAPK signaling pathway	hsa04010	52	255	$1.71 \times 10^{-08}$	$3.60 \times 10^{-07}$
FoxO signaling pathway	hsa04068	35	134	$2.27 \times 10^{-08}$	$4.18 \times 10^{-07}$
Jak-STAT signaling pathway	hsa04630	38	158	$3.78 \times 10^{-08}$	$6.17 \times 10^{-07}$
Focal adhesion	hsa04510	44	203	$4.65 \times 10^{-08}$	$7.00 \times 10^{-07}$
TNF signaling pathway	hsa04668	29	110	$2.98 \times 10^{-07}$	$2.97 \times 10^{-06}$
Estrogen signaling pathway	hsa04915	27	99	$4.29 \times 10^{-07}$	$3.71 \times 10^{-06}$
Regulation of actin cytoskeleton	hsa04810	43	215	$4.46 \times 10^{-07}$	$3.75 \times 10^{-06}$
PI3K-Akt signaling pathway	hsa04151	58	342	$6.79 \times 10^{-07}$	$5.05 \times 10^{-06}$
Osteoclast differentiation	hsa04380	28	132	$1.69 \times 10^{-05}$	$7.30 \times 10^{-05}$
Wnt signaling pathway	hsa04310	27	143	$1.33 \times 10^{-04}$	$4.43 \times 10^{-04}$
TGF-beta signaling pathway	hsa04350	15	84	0.006	0.012
Mineral absorption	hsa04978	10	52	0.015	0.028
NF-kappa B signaling pathway	hsa04064	14	93	0.026	0.045

Se muestran las vías de señalización que incluyen a los genes blanco del miR-140-3p y el miR-23b-3p, el valor de FDR (<0.05) muestra la importancia de la vía, tomando en cuenta el número de genes que participa.





**Figura 20.** Red de interacción de miRNAs y sus genes blanco. Se muestran los genes blanco de miR-140-3p y miR-23b, así como sus interacciones funcionales.



**Figura 21.** Análisis funcional *in silico* de la regulación de miR-140-3p y el miR-23b-3p en la diferenciación de osteoblastos.

Los genes resaltados en negritas, son genes blanco confirmados experimentalmente para ambos miRNAs de acuerdo a la literatura, mientras que el resto de los genes, son blancos predecidos mediante análisis *in silico*.

## DISCUSIÓN

La función que desempeñan los miRNAs en diferentes procesos metabólicos, así como su presencia, monitoreo y estabilidad en diferentes fluidos biológicos, hacen que estas moléculas sean consideradas como importantes candidatos a biomarcadores en la detección oportuna de distintas enfermedades incluida la osteoporosis.

La detección de los miRNAs en suero tiene varias ventajas que contemplan costos, tiempo, recursos y asequibilidad de la muestra, características que son de gran relevancia con métodos de diagnóstico clínico. La detección de biomarcadores en suero permite un análisis sin necesidad de recurrir a la DXA, lo cual reduce la exposición de radiación en pacientes. Además, la relación costo-eficiencia de las pruebas basadas en miRNAs en suero es mayor comparada con los métodos densitométricos.

Por otro lado, se debe contemplar que tanto el manejo de la muestra, la toma y su procesamiento son más sencillos. Lo anterior corresponde a que los métodos de obtención de la muestra son mínimamente invasivos para el paciente, y a que la metodología de análisis por PCR es considerada actualmente el estándar de oro para la cuantificación de ácidos nucleicos debido a su alta especificidad y sensibilidad.

En el presente estudio, se analizaron los niveles de expresión de 754 miRNAs en muestras de suero de una cohorte de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, así como de mujeres sanas. Estos 754 miRNAs incluyen a algunos de los miRNA mejor descritos y más abundantes en humano de acuerdo a la base de datos miRBase v21. Un subgrupo de 7 miRNAs fue encontrado expresado diferencialmente en mujeres con osteoporosis. La validación por RT-qPCR para 3 de estos microRNAs mostró diferencias significativas en solo dos de ellos (miR-23b-3p y el miR-140-3p) entre los grupos. La alta significancia en los valores del AUC en las pruebas ROC para el miR-23b-3p y el miR-140-3p revelaron una adecuada capacidad de discriminación entre mujeres con osteoporosis y mujeres sanas.

Este es el primer estudio que reporta cambios en el perfil de expresión de microRNAs en suero asociados a osteoporosis en una población de mujeres posmenopáusicas mexicanas.

En este estudio, encontramos que miRNAs circulantes específicos mostraron una expresión diferencial en muestras de mujeres con osteoporosis. Derivado de nuestros resultados, se propone que los microRNAs circulantes (miR-23b-3p y miR-140-3p) son potenciales marcadores que pueden ser utilizados para evaluar la osteoporosis; sin embargo, la realización de más estudios se debe llevar a cabo para asegurar esto.

Actualmente diversos grupos de trabajo han sugerido como objeto de estudio la identificación de cambios en los niveles de expresión de miRNAs específicos asociados con la baja DMO y/o con fracturas, como lo son: miR-21-5p, miR-125b-5p, miR-122-5p, miR-93-5p, miR-23a-3p, miR-100-5p, miR-133a, miR-124-3p y miR-422a (Panach *et al* 2015; Seeliger *et al.*, 2014; Kocijan *et al.*, 2016; Weilner *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2014; Yavropoulou *et al.*, 2017), todos ellos vinculados a la diferenciación de osteoblastos y/o osteoclastos y hallados en muestras de suero y plasma como miRNAs circulantes, por lo que son considerados marcadores potenciales para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

Si bien es cierto que todos los miRNAs reportados previamente fueron incluidos en nuestro panel de miRNAs analizados, no fue posible reproducir tales resultados en este trabajo, tal vez debido a las posibles diferencias en el diseño experimental (métodos de detección, normalización y análisis), así como en las herramientas bioinformáticas utilizadas. De la misma forma, se deben considerar las variaciones en el trasfondo genético de los individuos y en las características clínicas de la población (edad, IMC, enfermedades metabólicas) que afectan la compatibilidad con resultados de otros laboratorios (Kocijan *et al.*, 2016, Hackl *et al.*, 2015). Sin embargo, el diseño experimental empleado en el presente trabajo permitió por primera vez encontrar altos niveles de diferentes miRNAs en el suero de mujeres mexicanas con osteoporosis y/o con fractura y se hizo la validación en una cohorte independiente confirmando estos resultados.

Con respecto al análisis funcional *in silico*, este reveló que la mayoría de los genes blanco de ambos miRNAs se encontraban contenidos en 15 vías de señalización involucradas en el remodelado óseo, especialmente en la diferenciación de osteoclastos y la diferenciación de osteoblastos.

De las 15 vías de señalización observadas, destacaron las reguladas por FOXO, PI3K-Akt, Jak-STAT, TGF $\beta$ , WNT, así como la vía de diferenciación de osteoclastos. Destacando las vías TGF $\beta$ , WNT y la de diferenciación de osteoclastos que tienen una participación más evidente en el metabolismo óseo (Wu M., *et al.*, 2016; Florencio-Silva *et al.*, 2015, Capulli M., *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013; Arbolea, L. & Castañeda S., 2014). En el caso de las vías PI3K-Akt, Jak-STAT y FOXO, si bien no son procesos relacionados de manera directa al metabolismo óseo, son de gran relevancia, ya que juegan un papel central en el control de la supervivencia, crecimiento y proliferación de muchas células. Con respecto al hueso, y particularmente a los osteoblastos, existe una cantidad creciente de evidencia de que muchas moléculas de señalización ejercen alguno de sus efectos específicos en hueso mediante la activación selectiva de ciertos efectos comunes en estas vías (McGonnell *et al.*, 2012; Lee & Kim, 2011; Li, 2013; Tang *et al.*, 2019).

Ejemplo de lo anterior se puede observar en la vía FOXO, en la que se ha evidenciado que factores de transcripción entre los que se encuentra FOXO3, juegan un rol importante en el metabolismo óseo protegiendo a los osteoblastos y pre-osteoblastos del estrés oxidante y la apoptosis (Tang *et al.*, 2019; Gómez-Puerto *et al.*, 2016). Otro ejemplo ocurre en la vía Jak-STAT, en la cual participan múltiples citocinas como las interleucinas entre las que destaca IL6, la cual ha sido observada en monocitos de ratón y humanos como un inhibidor de la osteoclastogénesis por medio de la represión de RANKL (Lee & Kim, 2011; Li, 2013; Del Fattore *et al.*, 2013). De manera semejante, para la vía PI3K-Akt, se ha reportado en modelos de ratón knockout para Akt-1 una baja densidad mineral ósea, además de una disminución en la expresión de Runx2 y RANKL, resultando en un descenso de osteoclastogénesis inducido por los osteoblastos y un remodelado óseo lento (McGonnell *et al.*, 2012). En otro estudio en el que se inhibió la vía PI3K-

Akt, se originó una disminución en la expresión de Runx2, resultado en la baja expresión de genes como ALP, Osterix y OCN en osteoblastos, y también una alta expresión de proteínas apoptóticas (caspasas) indicando la importancia de la vía en la diferenciación y sobrevivencia de osteoblastos (Xi *et al.*, 2015).

Mediante la revisión de literatura se identificaron 11 genes blanco para ambos miRNAs (*AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *BMP2*, *FOXO3*, *GSK3B*, *IL6R*, *PRKACB*, *SMAD3*, *RUNX2* y *WNT5B*), los cuales han sido reportados en experimentos *in vitro* e *in vivo* en procesos de diferenciación de osteoblastos y osteoclastos (Bae *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014; Yoo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

En la red de interacción generada con los genes blanco, se observa que el miR-23b-3p puede regular la expresión de 8 genes (*AKT2*, *BMP2*, *FOXO3*, *GSK3B*, *IL6R*, *PRKACB*, *RUNX2* y *WNT5B*), mientras que miR-140-3p modula 5 genes (*AKT1*, *AKT3*, *SMAD3*, *FOXO3* y *RUNX2*), lo cual nos indica que ambos miRNAs comparten genes blanco, lo cual supondría un efecto más marcado en la regulación de la expresión.

Investigaciones recientes han demostrado que el miR-23b-3p se encuentra regulado por distintos estímulos, tanto de activación como de inhibición. De acuerdo con lo anterior, se ha reportado que el miR-23b-3p participa en la diferenciación de pre-osteoblastos regulando negativamente el control de la expresión de Smad3, un factor importante para la vía WNT (Wang *et al.*, 2016). La sobreexpresión de este miRNA también ha sido descrita en pacientes con fracturas osteoporóticas en una población caucásica (Panach *et al.*, 2015). En este mismo sentido, en un modelo murino se observó su participación en la inhibición osteogénica actuando directamente sobre Runx2 (Deng *et al.*, 2017). En lo referente a nuestros resultados obtenidos para el miR-23b-3p, sus altos niveles en el suero de mujeres con osteoporosis podrían indicar la relevancia que tiene como mediador en la pérdida de densidad mineral, no obstante, aun es necesario comprender su mecanismo en la diferenciación de osteoblastos.

Con respecto al miR-140-3p se ha reportado su papel en la reparación de fracturas a través de la regulación de la respuesta inflamatoria (Waki *et al.*, 2016; Tu *et al.*,

2017), así como su participación en la condrogénesis y osteogénesis (Tardif *et al.*, 2009; Nicolas *et al.*, 2011). Al mismo tiempo este miRNA se ha observado elevado en exosomas originados en osteoblastos mineralizantes de ratón (células MC3T3-E1) (Cui *et al.*, 2015). Cabe mencionar que, en distintos modelos animales, este miRNA se ha encontrado inhibiendo la expresión de BMP2, una molécula clave en la formación de osteoblastos (Nicolas *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2017). Recientemente se ha sugerido su participación en la diferenciación de osteoblastos siendo un factor regulador crítico entre las vías WNT y la TGF $\beta$ 3 (Fushimi *et al.*, 2018). Lo anterior demuestra que el miR-140-3p juega un papel importante en el desarrollo esquelético de los vertebrados; sin embargo, son necesarios más estudios en modelos celulares humanos que permitan un mejor entendimiento de su función.

Como se ha descrito de acuerdo a la literatura ambos miRNAs tienen genes que están involucrados en la diferenciación de osteoblastos, los cuales también participan en vías de señalización de importancia para las células óseas (Figura 21).

De acuerdo al Human miRNA Tissue Atlas (Ludwig *et al.*, 2016), ambos miRNAs son expresados en hueso y en otros tejidos, siendo el miR-140-3p más predominante en hueso. Este dato resulta interesante, ya que alteraciones en la expresión del miR-23b-3p y el miR-140-3p podrían derivar en cambios en la concentración en suero de pacientes con osteoporosis u osteopenia, indicando así un pronóstico del desarrollo de la enfermedad por la regulación de la expresión de genes relevantes en la diferenciación de osteoblastos, como se ha propuesto en otros estudios (Fang *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2017).

Finalmente, los resultados de este estudio muestran, por primera vez, que el miR-23b-3p y el miR-140-3p están asociados con una baja densidad mineral ósea, sugiriendo en ambos miRNAs un alto potencial discriminatorio entre mujeres con osteoporosis de mujeres sanas. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios que integren un mayor número de muestras, especialmente de pacientes con osteopenia y pacientes con fracturas causadas por osteoporosis con el fin de confirmar su uso en el diagnóstico temprano de la osteoporosis y pronóstico de fracturas, tal como lo sugieren nuestros resultados.

## CONCLUSIONES

1. Se identificaron dos miRNAs circulantes diferencialmente expresados en muestras de suero de mujeres mexicanas posmenopáusicas con osteoporosis: miR-23b-3p y miR-140-3p.
2. Mediante análisis bioinformáticos, se identificaron genes blanco que podrían tener un papel importante en el metabolismo óseo, los cuales ponen de manifiesto la importancia de los dos miRNAs como biomoléculas claves en el desarrollo de la osteoporosis.
3. Los resultados obtenidos del análisis bioinformático en conjunto con reportes de la literatura, sugieren que los genes *AKT1*, *AKT2*, *AKT3*, *BMP2*, *FOXO3*, *GSK3B*, *IL6R*, *SMAD3*, *PRKACB*, *RUNX2* y *WNT5B*, podrían tener un papel importante en procesos de diferenciación de osteoblastos y osteoclastos.
4. La identificación de estos dos miRNAs en muestras de suero de las mujeres posmenopáusicas, sugiere que podrían examinarse en combinación con otros miRNAs previamente descritos como biomarcadores potenciales para la osteoporosis, lo que puede tener un impacto benéfico en la forma en la que la osteoporosis se diagnostica y trata actualmente.
5. Nuestros hallazgos brindan respuestas a preguntas sobre el papel de los miRNAs circulantes en la pérdida de densidad mineral ósea y demuestran la necesidad de comprender mejor los orígenes biológicos y los roles de estos miRNAs circulantes en el contexto del metabolismo óseo. Siendo este el primer estudio que describe al miR23b-3p y al miR-140-3p asociados con una baja densidad mineral ósea, en mujeres posmenopáusicas Sin embargo son necesarios estudios adicionales para determinar su posible papel en la fisiopatología de la osteoporosis.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarasekara, D. S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., & Rho, J. (2018). Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Network*, 18(1). doi:10.4110/in.2018.18.e8.
- Andersen, T. L., Sondergaard, T. E., Skorzynska, K. E., Dagnaes-Hansen, F., Plesner, T. L., Hauge, E. M., *et al.* (2009). A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *American Journal of Pathology*. vol. 174, no. 1, pp. 239–247. Retrieved from <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080627>
- Andersson, D., Akrap, N., Svec, D., Godfrey, T. E., Kubista, M., Landberg, G., & Ståhlberg, A. (2015). Properties of targeted preamplification in DNA and cDNA quantification. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15(8), 1085–1100. doi:10.1586/14737159.2015.1057124.
- Arboleya, L., & Castañeda, S. (2014). Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 6(4), 109–121. Retrieved from <https://doi.org/10.4321/s1889-836x2014000400007>.
- Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., Tait, J.F., Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 5003e5008. doi:10.1073/pnas.1019055108.
- Augat, P., Simon, U., Liedert, A., & Claes, L. (2005). Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporosis International*, 16(S02), S36–S43. doi:10.1007/s00198-004-1728-9.
- Axmann, R., Böhm, C., Krönke, G., Zwerina, J., Smolen, J., & Schett, G. (2009). Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis & Rheumatism*, 60(9), 2747–2756. doi:10.1002/art.24781.
- Bae, S.J., Kim, H.J., Won, H.Y., Min, Y.K., Hwang, E.S. (2017). Acceleration of osteoblast differentiation by a novel osteogenic compound, DMP-PYT, through activation of both the BMP and Wnt pathways. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08190-9>.

- Blanchard, F., Duplomb, L., Baud'huin, M., & Brounais, B. (2009). The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(1), 19–28. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.11.004.
- Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teilm, M., & Dahlsveen, I. K. (2013). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods*, 59(1), S1–S6. doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.015
- Bonewald, L. F. (2007). Osteocytes as dynamic multifunctional cells. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1116, 281–290. Retrieved from <https://doi.org/10.1196/annals.1402.018>.
- Boyce, B. F. & Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. vol. 473, no. 2, pp. 139–146. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018>.
- Boyce, B. F., Xiu, Y., Li, J., Xing, L., & Yao, Z. (2015). NF-κB-mediated regulation of osteoclastogenesis. *Endocrinology and Metabolism*. 30(1), 35-44. Retrieved from <https://doi.org/10.3803/EnM.2015.30.1.35>.
- Brandi, M. L. (2009). Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology*, 48(suppl 4), iv3–iv8. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep273>.
- Caeiro Rey, J. R., Dapía Robleda, S., Vaquero Cervino, E., Roca Ruiz, L., & Blanco Ramos, M. A. (2005). Factores determinantes de la resistencia ósea. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, 14(4), 67–74. doi: 10.1016/S1132-8460(05)72686-6.
- Cao, Z., Moore, B.T., Wang, Y., Peng, X.-H.H., Lappe, J.M., Recker, R.R., Xiao, P. (2014). MiR-422a as a potential cellular MicroRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS One* 9, e97098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097098>.
- Capulli, M., Paone, R., & Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. vol. 561, pp. 3–12. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>.
- Carlos, F., Clark, P., Galindo-Suárez, R. M., & Chico-Barba, L. G. (2013). Health care costs of osteopenia, osteoporosis, and fragility fractures in Mexico. *Archives of Osteoporosis*, 8(1-2). doi:10.1007/s11657-013-0125-4.

- Cenci, S., Weitzmann, M. N., Roggia, C., Namba, N., Novack, D., Woodring, J., & Pacifici, R. (2000). Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- $\alpha$ . *Journal of Clinical Investigation*. vol. 106, no. 10, pp. 1229-1237. Retrieved from <https://doi.org/10.1172/JCI11066>.
- Chen, J., Li, K., Pang, Q., Yang, C., Zhang, H., Wu, F., Cao, H., Liu, H., Wan, Y., Xia, W., Wang, J., Dai, Z. & Li, Y. (2016). Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep36347.
- Civitelli, R., Lecanda, F., Jørgensen, N. R. & Steinberg, T. H. (2002). Intercellular junctions and cell-cell communication in bone. In Bilezikian, J. P., Raisz L., & Rodan, G. A. (Eds) *Principles of Bone Biology*. pp. 287–302, Academic Press, San Diego, Calif, USA. <https://doi.org/10.1016/B978-012098652-1.50120-7>
- Clark P, Tamayo JA, Cisneros F, Rivera FC, Valdés M. (2013). Epidemiology of osteoporosis in Mexico. Present and future directions. *Rev Invest Clin*. 65(2):183-91. doi 10.1007/s11657-010-0042-8.
- Clark, P., Carlos, F., Barrera, C., Guzman, J., Maetzel, A., Lavielle, P., Ramírez E., Robinson V., Rodríguez-Cabrera R., Tamayo J., Tugwell, P. (2007). Direct costs of osteoporosis and hip fracture: an analysis for the Mexican healthcare system. *Osteoporosis International*, 19(3), 269–276. doi:10.1007/s00198-007-0496-8.
- Clark, P., Carlos, F., Vázquez Martínez, J. L. (2010). Epidemiología, costos y carga de la osteoporosis en México. *Rev Metab Óseo y Min*. 8 (5): 152-161.
- Clark, P., Cons-Molina, F., Deleze, M., Ragi, S., Haddock, L., Zanchetta, J. R., Cummings, S. R., *et al.* (2009). The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: The Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). *Osteoporosis International*. 20(2), 275–282. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00198-008-0657-4>
- Clark, P., Lavielle, P., Franco-Marina, F., Ramírez, E., Salmerón, J., Kanis, J. A., & Cummings, S. R. (2005). Incidence rates and life-time risk of hip fractures in Mexicans over 50 years of age: a population-based study. *Osteoporosis International*, 16(12), 2025–2030. doi:10.1007/s00198-005-1991-4.
- Cooper C. (1999). Epidemiology of osteoporosis. *Osteoporosis International*. 9(1): S2-S8. doi:10.1007/PL00004156.

- Cortés Gabaudan, F. & Ureña Bracero, J. (2011). Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico. Vniversidad D Salamanca. <https://dicciomed.usal.es>.
- Crockett, J.C., Mellis, D.J., Scott, D.I. & Helfrich, M., H. (2011). New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int.* 22: 1. pp. 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1272-8>.
- Cui, Y., Luan, J., Li, H., Zhou, X., Han, J. (2015). Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression. *FEBS Lett.* 590, 185–192. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12024>.
- Dallas, S. L., Prideaux, M., & Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: An endocrine cell...and more. *Endocrine Reviews.* 34(5), 658-90. Retrieved from <https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>.
- Damoulis, P. D., & Hauschka, P. V. (1997). Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research.* <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.3.412>
- Del Fattore, A., Cappariello, A., Capulli, M., Rucci, N., Muraca, M., De Benedetti, F., & Teti, A. (2013). An experimental therapy to improve skeletal growth and prevent bone loss in a mouse model overexpressing IL-6. *Osteoporosis International*, 25(2), 681–692. doi:10.1007/s00198-013-2479-2.
- De-La-Cruz-Montoya, A. H., Ramírez-Salazar, E. G., Martínez-Aguilar, M. M., González-de-la-Rosa, P. M., Quiterio, M., Abreu-Goodger, C., Salmerón, J., Velázquez-Cruz, R. (2018). Identification of miR-708-5p in peripheral blood monocytes: Potential marker for postmenopausal osteoporosis in Mexican-Mestizo population. *Experimental Biology and Medicine.* 243(13):1027-1036. doi:10.1177/1535370218806828.
- Dempster DW. (2006). Anatomy and functions of the adult skeleton. In: Favus MJ, *et al.*, editors. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research. pp. 7–11. doi: 10.1002/9781119266594.
- Deng, L., Hu, G., Jin, L., Wang, C., Niu, H. (2017). Involvement of microRNA-23b in TNF- $\alpha$ -reduced BMSC osteogenic differentiation via targeting runx2. *J. Bone Miner. Metab.* <https://doi.org/10.1007/s00774-017-0886-8>.

- Dennison, E., Mohamed, M. A., & Cooper, C. (2006). Epidemiology of Osteoporosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 32(4), 617–629. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2006.08.003>.
- Denova-Gutiérrez, E., Flores, Y.N., Gallegos-Carrillo, K., Ramírez-Palacios, P., Rivera-Paredes, B., Muñoz-Aguirre, P., Velázquez-Cruz, R., Torres-Ibarra, L., Meneses-León, J., Méndez-Hernández, P., Hernández-López, R., Salazar-Martínez, E., Talavera, J.O., Tamayo, J., Castañón, S., Osuna-Ramírez, I., León-Maldonado, L., Flores, M., Macías, N., Antúnez, D., Huitrón-Bravo, G., Salmerón, J. (2016). Health workers cohort study: methods and study design. *Salud Pública Mex.* 58, 708–716. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i6.8299>.
- Ding, W., Li, J., Singh, J., Alif, R., Vazquez-Padron, R. I., Gomes, S. A., Hare, J. M., Shehadeh, L. A. (2015). miR-30e targets IGF2-regulated osteogenesis in bone marrow-derived mesenchymal stem cells, aortic smooth muscle cells, and ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovascular research*, 106(1), 131–142. doi:10.1093/cvr/cvv030.
- Dluzen, D. F., Noren Hooten, N., & Evans, M. K. (2016). Extracellular RNA in aging. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(2), e1385. doi:10.1002/wrna.1385.
- Donahue, H. J., Mcleod, K. J., Rubin, C. T., Andersen, J., Grine, E. A., Hertzberg, E. L., & Brink, P. R. (1995). Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: Cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *Journal of Bone and Mineral Research*. vol. 10, no. 6, pp. 881-889. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650100609>.
- Everts, V., Delaissié, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., & Beertsen, W. (2002). The bone lining cell: Its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*. vol. 17, no. 1, pp. 77–90, 2002. Retrieved from <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.1.77>.
- Fakhry, M. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of Stem Cells*. vol. 5, no. 4, pp. 136–148. Retrieved from <https://doi.org/10.4252/wjsc.v5.i4.136>
- Fang, S., Deng, Y., Gu, P., & Fan, X. (2015). MicroRNAs Regulate Bone Development and Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 8227–8253. doi:10.3390/ijms16048227

- Feichtinger, X., Muschitz, C., Heimel, P., Baierl, A., Fahrleitner-Pammer, A., Redl, H., Resch, H., Geiger, E., Skalicky, S., Dormann, R., Plachel, F., Pietschmann, P., Grillari, J., Hackl, M., Kocijan, R. (2018). Bone-related circulating MicroRNAs miR-29b-3p, miR-550a-3p, and miR-324-3p and their association to bone microstructure and histomorphometry. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22844-2>.
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, Isabel, Alobera Gracia, Miguel Angel, Canto Pingarrón, Mariano del, & Blanco Jerez, Luis. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* (Internet), 11(1), 47-51. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S169869462006000100011&lng=es&nrm=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169869462006000100011&lng=es&nrm=iso).
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. 1–17 Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- Franz-Odenaal, T. A., Hall, B. K., & Witten, P. E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Developmental Dynamics*. vol. 235, no. 1, pp. 176–190. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>.
- Fushimi, S., Nohno, T., Nagatsuka, H., & Katsuyama, H. (2018). Involvement of miR-140-3p in Wnt3a and TGFβ3 signaling pathways during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Genes to Cells*, 23(7), 517–527. doi:10.1111/gtc.12591.
- Galliera, E., Locati, M., Mantovani, A., & Corsi, M. M. (2008). Chemokines and bone remodeling. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 21(3), 485–491. Retrieved from <https://doi.org/10.1177/039463200802100301>.
- Garmilla-Ezquerro P. (2014). Papel de los micro-ARNs en enfermedades del metabolismo óseo (Tesis doctoral). Universidad de Cantabria. Departamento de Medicina y Psiquiatría. Santander. <http://hdl.handle.net/10902/5016>.
- Garmilla-Ezquerro, P., Sañudo, C., Delgado-Calle, J., Pérez-Nuñez, M. I., Sumillera, M., & Riancho, J. A. (2015). Analysis of the Bone MicroRNome in Osteoporotic Fractures. *Calcified Tissue International*, 96(1), 30–37. doi:10.1007/s00223-014-9935-7.

- Gamero, P. (2017). The Utility of Biomarkers in Osteoporosis Management. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 21(4), 401–418. doi:10.1007/s40291-017-0272-1.
- Golchin, M. M., Heidari, L., Hossein Ghaderian, S. M. & Akhavan-Niaki, H. (2016). Osteoporosis: A Silent Disease with Complex Genetic Contribution. *J. Genet. Genomics* 43, 49–61. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.12.001>.
- Gómez-Puerto, M. C., Verhagen, L. P., Braat, A. K., Lam, E. W.-F., Coffey, P. J., & Lorenowicz, M. J. (2016). Activation of autophagy by FOXO3 regulates redox homeostasis during osteogenic differentiation. *Autophagy*, 12(10), 1804–1816. doi:10.1080/15548627.2016.1203484.
- González, L. A., Vásquez, G. M., & Molina, J. F. (2009). Epidemiología de la osteoporosis. *Revista Colombiana de Reumatología*. 16(1), 61-75. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0121-8123\(09\)70119-7](https://doi.org/10.1016/S0121-8123(09)70119-7)
- Gordon C., Zemel B., Wren T., Leonard M., Bachrach L., Rauch F., Gilsanz V., Rosen C. and Winer K. (2016). The Determinants of Peak Bone Mass. *Journal of Pediatrics*, 180, 261-269. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.09.056>
- Grabowski, P. (2015). Physiology of Bone. In *Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents*. Endocr Dev. Basel, Karger. 2nd ed. vol 16, pp 33–55 (Chapter 3). <https://doi.org/10.1159/000223687>.
- Grigoriadis, A., Wang, Z., Cecchini, M., Hofstetter, W., Felix, R., Fleisch, H., & Wagner, E. (1994). c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 266(5184), 443–448. doi:10.1126/science.7939685.
- Guglielmi, G., Balzano, R. F., & Cheng, X. (2018). What is changed in the diagnosis of osteoporosis: the role of radiologists. *Quantitative imaging in medicine and surgery*, 8 (1), 1–4. doi:10.21037/qims.2018.02.04.
- Hackl, M., Heilmeier, U., Weilner, S., & Grillari, J. (2015). Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases – Complex signatures for multifactorial diseases? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 432, 83–95. doi:10.1016/j.mce.2015.10.015.
- Harada S, Rodan GA (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423: 349–355. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature01660>
- Harvey N, Dennison E, Cooper C. (2014). Osteoporosis: a lifecourse approach. *J Bone Miner Res*. 29(9):1917–1925. doi:10.1002/jbmr.2286.

- Hermoso de Mendoza, M.T. (2003). Clasificación de la osteoporosis: Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26 (Supl. 3), 29-52. [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272003000600004&lng=es&tlng=e](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000600004&lng=es&tlng=e).
- <http://acadameic.kellogg.cc.mi.us>
- [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bone\\_cross-section\\_esp.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bone_cross-section_esp.jpg).
- Huang, P., Yan, R., Zhang, X., Wang, L., Ke, X., & Qu, Y. (2018). Activating Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway for Disease Therapy: Challenges and Opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.11.008
- Hunter, D. J. (2005). Gene-environment interactions in human diseases. *Nature Reviews Genetics*. 6(4), 287–298. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrg1578>
- International Osteoporosis Foundation. (2011). The International Osteoporosis Foundation. <http://www.iofbonehealth.org/health-professionals/about-osteoporosis.html>.
- Jiao, H., Xiao, E., & Graves, D. T. (2015). Diabetes and Its Effect on Bone and Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*. 13(5), 327-35. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0286-8>.
- Jiménez-Ortega, R. F., Ramírez-Salazar, E. G., Parra-Torres, A. Y., Muñoz-Montero, S. A., Rangel-Escareño, C., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M., Quiterio, M., Salmerón, J., Velázquez-Cruz, R. (2017). Identification of microRNAs in human circulating monocytes of postmenopausal osteoporotic Mexican-Mestizo women: A pilot study. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14: 5464-5472. doi: 10.3892/etm.2017.5260.
- Johansson, H., Clark, P., Carlos, F., Oden, A., McCloskey, E. V., & Kanis, J. A. (2010). Increasing age- and sex-specific rates of hip fracture in Mexico: a survey of the Mexican institute of social security. *Osteoporosis International*, 22(8), 2359–2364. doi:10.1007/s00198-010-1475-z.
- Johnell, O., & Kanis, J. A. (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis International*, 17(12), 1726–1733. doi:10.1007/s00198-006-0172-4.



- Jung, H. J., & Suh, Y. (2014). Circulating miRNAs in Ageing and Ageing-Related Diseases. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(9), 465–472. doi:10.1016/j.jgg.2014.07.003.
- Kamioka, H., Honjo, T., & Takano-Yamamoto, T. (2001). A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone*, 28(2), 145–149. doi:10.1016/s8756-3282(00)00421-x.
- Kanis, J. A., Odén, A., McCloskey, E. V., Johansson, H., Wahl, D. A., & Cooper, C. (2012). A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. *Osteoporosis International*, 23(9), 2239–2256. doi:10.1007/s00198-012-1964-3.
- Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*, 26(6), e12740. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>.
- Kim, J. H., Liu, X., Wang, J., Chen, X., Zhang, H., Kim, S. H., Cui, J., Li, R., Zhang, W., Kong, Y., Zhang, J., Shui, W., Lamplot, J., Rogers, M.R., Zhao, C., Wang N, Rajan, P., Tomal, J., Statz, J., Wu, N., Luu, H.H., Haydon, R.C., He, T. C. (2013). Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 5(1), 13–31. doi:10.1177/1759720X12466608
- Kimura, T., Jiang, S., Yoshida, N., Sakamoto, R., & Nishizawa, M. (2015). Interferon-alpha competing endogenous RNA network antagonizes microRNA-1270. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(14), 2749–2761. doi:10.1007/s00018-015-1875-5.
- Kini, U., Nandeesh, B.N. (2012) Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman I., Gnanasegaran G., van der Wall H. (eds) Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9_2).
- Kirschner, M.B., Edelman, J.J.B., Kao, S.C.H., Vallely, M.P., Van Zandwijk, N., Reid, G. (2013). The impact of hemolysis on cell-free microRNA biomarkers. *Front. Genet.* 4,1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00094>.
- Knothe Tate, M. L. (2003). “Whither flows the fluid in bone?” An osteocyte’s perspective. *Journal of Biomechanics*, 36(10), 1409–1424. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00123-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00123-4).

- Kobayashi, S., Takahashi, H. E., Ito, A., Saito, N., Nawata, M., Horiuchi, H., Takaoka, K. *et al.* (2003). Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone*. 32:163–169. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(02\)00947-X](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(02)00947-X).
- Kocijan, R., Muschitz, C., Geiger, E., Skalicky, S., Baierl, A., Dormann, R., Plachel, F., Feichtinger, X., Heimel, P., Fahrleitner-Pammer, A., Grillari, J., Redl, H., Resch, H., Hackl, M. (2016). Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 4125–4134. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2365>.
- Komadina, R. (2008). Hip, Osteoporosis: New Paradigm. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 34(2), 163–170. doi:10.1007/s00068-007-7004-x.
- Lanyon, L. E. (1993). Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcified Tissue International*. 53:102-7 Retrieved from <https://doi.org/10.1007/BF01673415>
- Lee, P. G., & Halter, J. B. (2017). The Pathophysiology of Hyperglycemia in Older Adults: Clinical Considerations. *Diabetes Care*, 40(4), 444–452. doi:10.2337/dc16-1732.
- Lee, Y. K., & Kim, H. H. (2011). The Role of Jak/STAT Pathways in Osteoclast Differentiation. *Biomolecules and Therapeutics*, 19(2), 141–148. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2011.19.2.141>
- Li J. (2013). JAK-STAT and bone metabolism. *JAK-STAT*, 2(3), e23930. doi:10.4161/jkst.23930
- Li, M., Thompson, D. D., & Paralkar, V. M. (2007). Prostaglandin E2 receptors in bone formation. *International Orthopaedics*. 31(6), 767-72. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00264-007-0406-x>.
- Li, W., Liu, Z., Chen, L., Zhou, L., Yao, Y. (2014). MicroRNA-23b is an independent prognostic marker and suppresses ovarian cancer progression by targeting runt-related transcription factor-2. *FEBS Lett.* 588, 1608–1615. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.055>.
- Li, Z., Hassan, M. Q., Jafferji, M., Aqeilan, R. I., Garzon, R., Croce, C. M., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., Lian, J. B. (2009). Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 284(23), 15676–15684. doi:10.1074/jbc.M809787200.

- Lian, J. B., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Hassan, M. Q., Gaur, T., & Zhang, Y. (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(4), 212–227. doi:10.1038/nrendo.2011.234.
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15(6), 321–333. doi:10.1038/nrc3932.
- Lind, M., Deleuran, B., Thestrup-Pedersen, K., Søballe, K., Eriksen, E. F., Bünger, C. (1995). Chemotaxis of human osteoblasts: Effects of osteotropic growth factors. *APMIS*. 103:140–146. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1995.tb01089.x>.
- Lindsay, R., Cosman, F., Zhou, H., Bostrom, M. P., Shen, V. W., Cruz, J. A. D., Dempster, D. W., *et al.* (2006). A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest bone biopsy: Early actions of teriparatide. *Journal of Bone and Mineral Research*. 21:366-373. Retrieved from <https://doi.org/10.1359/JBMR.051109>.
- Linton, A. D. (2007). Musculoskeletal system. In Linton, A. D. & Lach, H. W. (Eds). *Matteson & McConnell's gerontological nursing*. 3rd ed., pp. 259-312. St. Louis: Saunders Elsevier.
- Ludwig, Nicole, *et al.* Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucleic acids research* 44.8 (2016): 3865-3877. doi:10.1093/nar/gkw116.
- Maeda, A., Ono, M., Holmbeck, K., Li, L., Kilts, T. M., Kram, V., Noonan, M. L., Yoshioka, Y., Young, M. F., *et al.* (2015). WNT1-induced Secreted Protein-1 (WISP1), a Novel Regulator of Bone Turnover and Wnt Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 14004–14018. doi:10.1074/jbc.m114.628818.
- Mandourah, A.Y., Ranganath, L., Barraclough, R., Vinjamuri, S., Hof, R.V., Hamill, S., Czanner, G., Dera, A.A., Wang, D., Barraclough, D.L. (2018). Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for osteoporosis. *Sci. Rep.* 8 (8421). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26525-y>.
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*. 21(2), 115–137. Retrieved from <https://doi.org/10.1210/er.21.2.115>.
- Marieb, E. N., Hoehn, K. (2013). *Human Anatomy & Physiology*. 9th Edition. 1270 pp. Pearson. USA.

- Marieb, E.N., Wilhelm, P.B., Mallatt, J.B., 2014. Bones and skeletal tissues. In: Human Anatomy, 7th edition. Pearson Education, USA, pp. 123–149 (Chapter 6). <https://doi.org/10.1007/BF00845519>.
- Marks, S. C., & Popoff, S. N. (1988). Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy*. vol. 183, no. 1, pp. 1–44. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/aja.1001830102>.
- McGee-Lawrence, M. E., & Westendorf, J. J. (2011). Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance. *Gene*, 474(1-2), 1–11. doi:10.1016/j.gene.2010.12.003.
- McGonnell, I. M., Grigoriadis, A. E., Lam, E. W., Price, J. S., & Sunter, A. (2012). A specific role for phosphoinositide 3-kinase and AKT in osteoblasts?. *Frontiers in endocrinology*, 3, 88. doi:10.3389/fendo.2012.00088
- Meiner, S. E. & Kazer, M. W. (2011). *Gerontological Nursing. Nursing and Health Studies Faculty Book Gallery*. 4th Edition 55. <https://digitalcommons.fairfield.edu/nursing-books/55>.
- Mirza, F., & Canalis, E. (2015). Management of endocrine disease: Secondary osteoporosis: pathophysiology and management. *European journal of endocrinology*, 173(3), R131-51. Retrieved from <https://doi.org/10.1530/eje-15-0118>.
- Moon, R. J., & Harvey, N. C. (2014). Identification of patient profile for treatment. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(6), 767–782. doi:10.1016/j.beem.2014.04.005.
- Moorer, M. C., & Riddle, R. C. (2018). Regulation of Osteoblast Metabolism by Wnt Signaling. *Endocrinology and Metabolism*, 33(3), 318. doi:10.3803/enm.2018.33.3.318.
- Mosley, J. R. (2000). Osteoporosis and bone functional adaptation: Mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. *Journal of Rehabilitation Research and Development*. vol. 37, no. 2, pp. 189–199. PMID:10850825.
- Moura, A. P., Taddei, S. R. A., Queiroz-Junior, C. M., Madeira, M. F. M., Rodrigues, L. F. D., Garlet, G. P., Souza, D. G., Machado, F. S. and Silva, T. A. (2014). The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading. *Bone*. 69, 133–138. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.019>.

- Nakashima, T., Hayashi, M., & Takayanagi, H. (2012). New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 23:582-90. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.005>.
- Nazrun, A. S., Tzar, M. N., Mokhtar, S. A., & Mohamed, I. N. (2014). A systematic review of the outcomes of osteoporotic fracture patients after hospital discharge: morbidity, subsequent fractures, and mortality. *Therapeutics and clinical risk management*, 10, 937-48. doi:10.2147/TCRM.S72456
- Nicolas, F. E., Pais, H., Schwach, F., Lindow, M., Kauppinen, S., Moulton, V., & Dalmay, T. (2011). mRNA expression profiling reveals conserved and non-conserved miR-140 targets. *RNA Biology*, 8(4), 607–615. doi:10.4161/rna.8.4.15390.
- Niedźwiedzki, T., & Filipowska, J. (2015). Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: The role of osteocytes and the nervous system. *Journal of Molecular Endocrinology*. 55(2), R23-R36. Retrieved from <https://doi.org/10.1530/JME-15-0067>.
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. (2001). *Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy*. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 285(6), 785–795. doi:10.1001/jama.285.6.785
- O'Neill TW, Felsenberg D, Varlow J, Cooper C, Kanis JA, Silman AJ. (1996). The prevalence of vertebral deformity in european men and women: the European Vertebral Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 11: 1010-1018. doi:10.1002/jbmr.5650110719.
- Orueta, R., & Gómez-Caro, S. (2010). Interpretación de la densitometría ósea. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 36(1), 27–30. doi: 10.1016/j.semerg.2009.05.00.
- Pacifici, R. (2009). Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. vol. 11, no. 8, pp. 1043–1051. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110802>.
- Panach, L., Mifsut, D., Tarín, J. J., Cano, A., & García-Pérez, M. Á. (2015). Serum Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture. *Calcified Tissue International*, 97(5), 495–505. doi:10.1007/s00223-015-0036-z.
- Peterson, S. M., Thompson, J. A., Ufkin, M. L., Sathyanarayana, P., Liaw, L., & Congdon, C. B. (2014). Common features of microRNA target prediction tools. *Frontiers in Genetics*, 5. doi:10.3389/fgene.2014.00023.

- Pettit, A. R., Chang, M. K., Hume, D. A., & Raggatt, L. J. (2008). Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics. *Bone*. 43, 976–982. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.08.128>
- Phan, T. C. A., Xu, J., & Zheng, M. H. (2004). Interaction between osteoblast and osteoclast: Impact in bone disease. *Histology and Histopathology*. vol. 19, no. 4, pp. 1325–1344. doi: 10.14670/HH-19.1325.
- Pisani, P., Renna, M. D., Conversano, F., Casciaro, E., Muratore, M., Quarta, E., Di Paola, M., Casciaro, S. (2013). Screening and early diagnosis of osteoporosis through X-ray and ultrasound based techniques. *World Journal of Radiology*. Retrieved from <https://doi.org/10.4329/wjr.v5.i11.398>
- Pogribny, I. P. (2017). MicroRNAs as biomarkers for clinical studies. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 283–290. doi:10.1177/1535370217731291.
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103–25108. doi:10.1074/jbc.r109.041087.
- Riancho, J. A., Hernández, J. L., & González-Macías, J. (2008). Siete preguntas sobre la osteopenia. *Medicina Clínica*, 131(4), 136–140. doi:10.1157/13124102.
- Rochefort, G. Y., Pallu, S., & Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: The unrecognised side of bone tissue. *Osteoporosis International*, 21, 1457–1469. doi: 10.1007/s00198-010-1194-5.
- Rosen, C. J. (2018). A Not-So-New Treatment for Old Bones. *New England Journal of Medicine*. doi:10.1056/nejme1812434.
- Sato-Kuwabara, Y., Melo, S. A., Soares, F. A., & Calin, G. A. (2015). The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles--diagnostic and therapeutic implications (Review). *International journal of oncology*, 46(1), 17–27. doi:10.3892/ijo.2014.2712.
- Saxon, S.V., Etten, M.J., Perkins, E.A. (2014). *Physical Change and Aging: A Guide for the Helping Professions*. 6th ed. pp. 504. Springer Publishing Company.
- Schaffler, M. B., Cheung, W. Y., Majeska, R., & Kennedy, O. (2013). Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcified tissue international*. 94(1), 5-24. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9790-y>.

- Schuiling, K. D., Robinia, K., & Nye, R. (2011). Osteoporosis Update. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 56(6), 615–627. <https://doi.org/10.1111/j.1542-2011.2011.00135.x>
- Seeliger, C., Karpinski, K., Haug, A. T., Vester, H., Schmitt, A., Bauer, J. S. & van Griensven, M. (2014). Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs Are Associated With Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res*, 29: 1718-1728.
- Shannon, P. (2003). Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. doi:10.1101/gr.1239303.
- Silverman, S. L., & Madison, R. E. (1988). Decreased incidence of hip fracture in Hispanics, Asians, and blacks: California Hospital Discharge Data. *American journal of public health*, 78(11), 1482-3. Retrieved from <https://doi.org/10.2105/AJPH.78.11.1482>.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.-L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R., Boyle, W.J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*; 89 (2), 309-19. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80209-3).
- Sözen, T., Ozisik, L., & Calik Basaran, N. (2017). An overview and management of osteoporosis. *European Journal of Rheumatology*, 4(1), 46–56. Retrieved from <https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2016.048>.
- Sugatani, T., & Hruska, K. A. (2013). Down-regulation of miR-21 biogenesis by estrogen action contributes to osteoclastic apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(6), 1217–1222. doi:10.1002/jcb.24471.
- Sun, M., Zhou, X., Chen, L., Huang, S., Leung, V., Wu, N., Pan, H., Zhen, W., Lu, W., Peng, S. (2016). The regulatory roles of MicroRNAs in bone remodeling and perspectives as biomarkers in osteoporosis. *Biomed. Res. Int.* 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/1652417>.
- Takano, A., Fukuda, T., Shinjo, T., Iwashita, M., Matsuzaki, E., Yamamichi, K., Takeshita, M., Sanui, T., Nishimura, F. (2017). Angiopoietin-like protein 2 is a positive regulator of

osteoblast differentiation. *Metabolism* 69, 157–170.  
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.006>.

- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., Taniguchi, T. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental Cell*. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00369-6](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00369-6).
- Tang, K. C., Pan, W., Doschak, M. R., & Alexander, R. T. (2019). Increased FoxO3a expression prevents osteoblast differentiation and matrix calcification. *Bone Reports*, 10, 100206. doi:10.1016/j.bonr.2019.100206.
- Tardif, G., Hum, D., Pelletier, J.-P., Duval, N., & Martel-Pelletier, J. (2009). Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 10(1). doi:10.1186/1471-2474-10-148.
- Teufel, S., & Hartmann, C. (2019). Wnt-signaling in skeletal development. *Current Topics in Developmental Biology*, 235–279. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.11.010
- Tobias JH, Cook DG, Chambers TJ & Dalzell N. (1994). A comparison of bone mineral density between Caucasian, Asian and Afro-Caribbean women. *Clin Sci*. 87: 587-591. Retrieved from <https://doi.org/10.1042/cs0870587>.
- Tomkinson A., Gevers E.F., Wit J.M., Reeve J., Noble B.S. (1998). The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 13:1243–1250. Retrieved from <https://doi.org/10.1359/jbmr.1998.13.8.1243>
- Tortora, G.J. & Derrickson, B.H., (2012). The skeletal system: bone tissue. In: *Principles of Anatomy and Physiology*, 13th edition. John Wiley & Sons, USA, pp. 182–207 (Chapter 6). [https://doi.org/10.1016/S0031-9406\(05\)60992-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9406(05)60992-3).
- Tu, M., Tang, J., He, H., Cheng, P., & Chen, C. (2017). MiR-142-5p promotes bone repair by maintaining osteoblast activity. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 35(3), 255–264. doi:10.1007/s00774-016-0757-8
- Ubara, Y., Fushimi, T., Tagami, T., Sawa, N., Hoshino, J., Yokota, M., Hara, S. *et al.* (2003). Histomorphometric features of bone in patients with primary and secondary



- hypoparathyroidism. *Kidney International*. 63:1809-1816. Retrieved from <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00916.x>.
- Ubara, Y., Tagami, T., Nakanishi, S., Sawa, N., Hoshino, J., Suwabe, T., Takaichi, K. *et al.*(2005). Significance of minimodeling in dialysis patients with adynamic bone disease. *Kidney International*. 68:833–839. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00464.x>.
  - Väänänen HK & Zhao H. (2008). Osteoclast function: biology and mechanisms In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ. *Principles of Bone Biology (Third Edition)*. Filadelfia: Elsevier Inc; p:193-209. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373884-4.00030-6>.
  - Van Der Eerden, B.C.J. (2014). MicroRNAs in the skeleton: cell-restricted or potent intercellular communicators? *Arch. Biochem. Biophys.* 561, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.04.016>.
  - Vidigal, J. A., & Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 137–147. doi:10.1016/j.tcb.2014.11.004.
  - Waki, T., Lee, S.Y., Niikura, T., Iwakura, T., Dogaki, Y., Okumachi, E., Oe, K., Kuroda, R., Kurosaka, M. (2016). Profiling microRNA expression during fracture healing. *BMC Musculoskelet. Disord.* 17 (83). <https://doi.org/10.1186/s12891-016-0931-0>.
  - Wang, X., Su, H., Liu, H., Hao, W. (2016). miR-23b targets Smad 3 and ameliorates the LPS-inhibited osteogenic differentiation in preosteoblast MC3T3-E1 cells. *J. Toxicol. Sci.* 41, 185–193. <https://doi.org/10.2131/jts.41.185>.
  - Weilner, S., Skalicky, S., Salzer, B., Keider, V., Wagner, M., Hildner, F., Gabriel, C., Dovjak, P., Pietschmann, P., Grillari-Voglauer, R., Grillari, J., Hackl, M. (2015). Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone* 79, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.027>.
  - Weinstein R.S., Jilka R.L., Parfitt A.M., Manolagas S.C. (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102:274–282. Retrieved from <https://doi.org/10.1172/JCI2799>

- WHO (2004) Scientific group on the assessment of Osteoporosis at primary health care level. World Health Organization, Geneva. Summary Meeting Report. World Health Organization. Brussels, Belgium. <https://www.who.int/chp/topics/Osteoporosis.pdf>.
- Wu, J., Mao, X., Cai, T., Luo, J., Wei, L. (2006). KOBAS server: a web-based platform for automated annotation and pathway identification. *Nucleic Acids Res.* 34, 720–724. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl167>.
- Wu, M., Chen, G., & Li, Y. P. (2016). TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone research*, 4, 16009. doi:10.1038/boneres.2016.9.
- Xi, J.-C., Zang, H.-Y., Guo, L.-X., Xue, H.-B., Liu, X.-D., Bai, Y.-B., & Ma, Y.-Z. (2015). The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(6), 640–645. doi:10.3109/10799893.2015.1041647.
- Xiao, W., Wang, Y., Pacios, S., Li, S., & Graves, D. T. (2016). Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Frontiers of Oral Biology*. 9-16 Retrieved from <https://doi.org/10.1159/000351895>.
- Xie, C., Mao, X., Huang, J., Ding, Y., Wu, J., Dong, S., Kong, L., Gao, G., Li, C.Y., Wei, L. (2011). KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res.* 39, 316–322. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr483>.
- Xie, Y., Chen, Y., Zhang, L., Ge, W., Tang, P. (2017). The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* 21,1033–1041. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13039>.
- Yáñez, A., & Goodridge, H. S. (2016). Interferon regulatory factor 8 and the regulation of neutrophil, monocyte, and dendritic cell production. *Current Opinion in Hematology*, 23(1), 11–17. doi:10.1097/moh.0000000000000196.
- Yavropoulou, M.P., Anastasilakis, A.D., Makras, P., Grammatiki, M., Yovos, J.G., Tsalikakis, D.G., Grammatiki, M., Yovos, J.G. (2017). Expression of microRNAs that regulate bone turnover in the serum of postmenopausal women with low bone mass and vertebral fractures. *Eur. J. Endocrinol.* 176, 169–176. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0583>.

- Yoo, S.H., Kim, J.G., Kim, B.S., Lee, J., Pi, S.H., Lim, H.D., Shin, H.I., Cho, E.S., You, H.K. (2016). BST2 mediates osteoblast differentiation via the BMP2 signaling pathway in human alveolar-derived bone marrow stromal cells. *PLoS One* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158481>.
- Yoshida, Y., Yamasaki, S., Oi, K., Kuranobu, T., Nojima, T., Miyaki, S., Ida, H., Sugiyama, E. (2018). IL-1 $\beta$  Enhances Wnt Signal by Inhibiting DKK1. *Inflammation*. doi:10.1007/s10753-018-0838-z
- Yoshitake, F., Itoh, S., Narita, H., Ishihara, K., & Ebisu, S. (2008). Interleukin-6 Directly Inhibits Osteoclast Differentiation by Suppressing Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11535–11540. doi:10.1074/jbc.m607999200.
- Zhang, X., Chen, K., Wei, B., Liu, X., Lei, Z., Bai, X. (2016). Chemico-biological interactions Ginsenosides Rg3 attenuates glucocorticoid-induced osteoporosis through regulating BMP-2/BMPR1A/Runx2 signaling pathway. *Chem. Biol. Interact.* 256, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.07.003>.
- Zhang, Y., Gao, Y., Cai, L., Li, F., Lou, Y., Xu, N., Kang, Y., Yang, H. (2017). MicroRNA-221 is involved in the regulation of osteoporosis through regulates RUNX2 protein expression and osteoblast differentiation. *Am. J. Transl. Res.* 9, 126-135.
- Zhao, H., Zhang, J., Shao, H., Liu, J., Jin, M., Chen, J., Huang, Y. (2017). MiRNA-340 inhibits osteoclast differentiation via repression of MITF. *Biosci. Rep.* <https://doi.org/10.1042/BSR20170302>.
- Zhao, X., Xu, D., Li, Y., Zhang, J., Liu, T., Ji, Y., Wang, J., Zhou, G., Xie, X. (2014). MicroRNAs regulate bone metabolism. *J. Bone Miner. Metab.* 32, 221–231. <https://doi.org/10.1007/s00774-013-0537-7>.
- Zhu, S., Yao, F., Qiu, H., Zhang, G., Xu, H., & Xu, J. (2017). Coupling factors and exosomal packaging microRNAs involved in the regulation of bone remodelling. *Biological Reviews*, 93(1), 469–480. doi:10.1111/brv.12353.