

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Juan Miguel Castagnino†

MicroARN circulantes y su potencialidad como futuros biomarcadores óseos

► Estefanía Magalí Zeni Coronel^{1a,b}, Marina Soledad Bonanno^{2a,c}, Mariana Seijo^{3a}, Susana Noemí Zeni^{4a*}

¹ Médica Veterinaria.

² Licenciada en Biotecnología.

³ Doctora en Medicina, Magíster en Efectividad Clínica.

⁴ Doctora en Ciencias Químicas.

^a Laboratorio de Osteopatías Metabólicas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^b Cátedra de Bioestadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

^c Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología. Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

El remodelamiento óseo es ejercido por la actividad de osteoblastos y osteoclastos y puede evaluarse por marcadores bioquímicos de formación y resorción ósea. Sin embargo, el nivel de los marcadores óseos está sometido a una enorme cantidad de variables y, además, carece o presenta escaso valor pronóstico. Los microARN (miARN) fueron recientemente estudiados como una alternativa potencial para ser utilizados como nuevos marcadores óseos. Los miARN son pequeñas moléculas de ARN no codificantes (15-25 nucleótidos) que, a través de la inhibición o degradación de ARN mensajeros, modifican una serie de funciones biológicas. Los miARN específicos de hueso ejercen funciones reguladoras sobre factores transcripcionales involucrados en la osteoblastogénesis y osteoclastogénesis, modificando el remodelamiento óseo. La mayoría de los miARN permanecen dentro de la célula, pero algunos son liberados a la circulación donde pueden ser dosados. Los miARN circulantes presentan gran estabilidad en fluidos biológicos, lo que los hace potenciales candidatos a ser utilizados como nuevos biomarcadores óseos. Cambios en el patrón normal de miARN circulantes específicos de hueso reflejarán modificaciones en el metabolismo óseo y señalan el posible inicio o progresión de enfermedades óseas, como la osteoporosis. Si bien es promisorio, el uso en la práctica clínica de los miARN específicos circulantes como nuevos biomarcadores óseos, ello implica primeramente cumplir con una serie de requisitos que permitan estandarizar las condiciones preanalíticas, analíticas y posanalíticas de estas moléculas. La presente revisión brinda información reciente sobre los estudios clínicos tendientes a determinar el posible uso de los miARN circulantes como nuevos biomarcadores óseos, ya que cuentan con elevada sensibilidad y especificidad diagnósticas, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Palabras clave: MicroARN; Remodelamiento óseo; Osteoporosis

Circulating microRNAs and their potential use as future bone biomarkers

Abstract

Osteoblasts and osteoclasts activity determines the level of the bone remodeling process which can be assessed by biochemical markers of bone formation and resorption. However, bone marker levels are subject to a series of variables

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

and, furthermore, they lack or have little prognostic values. MicroRNAs (miRNAs) were recently studied as a potential alternative to be used as new bone biomarkers. The miRNAs are endogenous small noncoding RNA molecules (15–25 nucleotides) that regulate many biological functions by inhibiting or degrading specific messenger RNAs. Bone-specific miRNAs exert regulatory functions on key transcriptional factors involved in osteoblastogenesis and osteoclastogenesis, modifying the bone remodelling process. Most miRNAs remain within the cell, but some of them are released into circulation. Circulating miRNAs show great stability in biological fluids, which makes them excellent candidates to be used as new bone biomarkers. Modifications in the normal pattern of bone-specific circulating miRNA might reflect changes in bone metabolism, signalling the possible onset or progression of bone diseases, such as osteoporosis. Although promising, the use of specific circulating miRNAs as new bone biomarkers in clinical practice implies fulfilling a series of requirements that lead to standardising the pre-analytical, analytical and post-analytical conditions of these molecules. The present review gives an overview on the clinical studies related to the possible use of specific circulating miRNAs as new bone biomarkers.

Keywords: MicroRNAs; Bone remodelling; Osteoporosis

MicroRNAs circulantes e a sua potencialidade como futuros biomarcadores ósseos

Resumo

A remodelação óssea é exercida pela atividade dos osteoblastos e osteoclastos e pode ser avaliada para a medição dos marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea. No entanto, o nível dos marcadores ósseos está sujeito a grande quantidade de variáveis e, além disso, carece ou tem pouco valor prognóstico. Os microARN (miARN) foram estudados recentemente como uma alternativa potencial para serem utilizados como novos marcadores ósseos. Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificantes (15-25 nucleotídeos) que, através da inibição ou degradação de RNA mensageiros modificam uma série de funções biológicas. Os miRNAs específicos de osso exercem funções reguladoras sobre fatores transcricionais envolvidos na osteoblastogênese e na osteoclastogênese, modificando o processo de remodelação óssea. A maioria dos miRNAs permanece dentro da célula, mas de RNA mensageiros alguns são liberados na circulação, onde podem ser determinados bioquimicamente. Os miRNAs circulantes apresentam grande estabilidade em fluidos biológicos, o que os torna excelentes candidatos para serem usados como novos biomarcadores ósseos. Mudanças no padrão normal de miRNA circulantes específicos do osso mostrarão mudanças no metabolismo ósseo, sinalizando o possível início ou progressão de doenças ósseas, como osteoporose. Embora promissor, o uso de miRNAs específicas circulantes na prática clínica como novos biomarcadores ósseos, implica primeiramente, atender uma série de requisitos que permitem padronizar as condições pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas dessas moléculas. A presente revisão fornece informações recentes sobre estudos clínicos destinados a determinar o possível uso dos miRNAs circulantes como novos biomarcadores ósseos, visto que contam com elevada sensibilidade e especificidade diagnósticas, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo.

Palavras-chave: MicroRNAs; Remodelação óssea; Osteoporose

Introducción

La osteoporosis es una enfermedad en la cual la cantidad y la calidad del hueso están disminuidas, lo que aumenta el riesgo de fracturas, especialmente de columna, muñecas y caderas. Produce una importante morbilidad y mortalidad y afecta a una numerosa población. En 1994 la OMS propuso una definición operacional de la osteoporosis basada en la medición de la densidad mineral ósea (DMO) y en la presencia de fracturas. La densitometría ósea es un método que utiliza la técnica de absorciometría dual de rayos X (DXA) y es la herramienta utilizada para el diagnóstico de osteoporosis. Di-

cha técnica evalúa la DMO y el contenido mineral óseo (CMO) que, comparados con los valores de referencia adecuados, determinarán el riesgo de fracturas por fragilidad ósea (1). Por otra parte, la progresión de la enfermedad ósea o el control de un determinado tratamiento se realiza mediante la medición bioquímica en suero de los marcadores específicos de remodelamiento óseo. La determinación de estos marcadores permite identificar aumentos en el remodelamiento que conducen a la pérdida de hueso, ya que la resorción es más rápida (12 días) que la formación ósea (1 mes). Al mismo tiempo, los marcadores bioquímicos permiten evaluar en un período corto de tratamiento (3-6 meses) la res-

puesta y/o adherencia al mismo. La Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio ha recomendado el uso del propéptido N-terminal del procolágeno tipo I (s-PINP) de formación y telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (*Crosslaps* o CTX) de resorción como marcadores bioquímicos de referencia (2). Ambos metabolitos del colágeno reflejan la actividad de osteoblastos (OBL) y osteoclastos (OCL). En la búsqueda de marcadores más sensibles que puedan predecir, además, el riesgo de fracturas o evaluar cambios en el remodelamiento de hueso cortical y trabecular, se ensayaron otros marcadores específicos de hueso o de otros tejidos relacionados al esqueleto, como periostina, catepsina K (CATK), ligando del receptor activador de NF-KB (RANKL), esclerostina y factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23) (3). Los niveles circulantes de los marcadores óseos se encuentran sujetos a una serie de variables, pero además carecen o presentan escaso valor pronóstico; por ello, recientemente se ha evaluado a los microARN (miARN) como una alternativa potencial para su uso clínico. Los miARN específicos de hueso son las únicas moléculas que controlan la señal intracelular del proceso de remodelamiento óseo a través de funciones reguladoras sobre la osteoblastogénesis y osteoclastogénesis, lo que los hace excelentes candidatos a ser utilizados como nuevos biomarcadores óseos (4) (5).

Biogénesis y función de los microARN

Los miARN son pequeñas moléculas de ARN monocatenarias no codificantes de 18 a 25 nucleótidos (NT) (6) (7) (8) que participan en la regulación epigenética de procesos celulares complejos como el crecimiento, el ciclo celular, la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, el metabolismo y la homeostasis (9) (10).

La biogénesis de los miARN se realiza mediante una serie de pasos (11) a través de dos vías diferentes:

- *Vía alternativa o no canónica:* sólo fue descrita para organismos inferiores como *Drosophila melanogaster*, *Giardia lamblia*, *zebrafish* y *gamma-herpesvirus* murino 68 (6).
- *Vía clásica o canónica:* proceso estrictamente regulado y dependiente de las proteínas droscha (nuclear) y dicer (citoplasmática). Este proceso de biogénesis de los miARN se resume en la Figura 1.

La función de los miARN es la de regular negativamente la expresión de genes, bloqueando la iniciación o elongación de la traducción, mediante la inhibición o desestabilización del ARN mensajero (ARNm) específico por complementariedad de bases (6) (7) (8). Debido a que la secuencia complementaria entre el ARNm y el miARN es de tan solo 7-8 NT, cada miARN podría, potencialmente, aparearse con cientos de ARNm diferentes. En este sentido, se estima que un único miARN

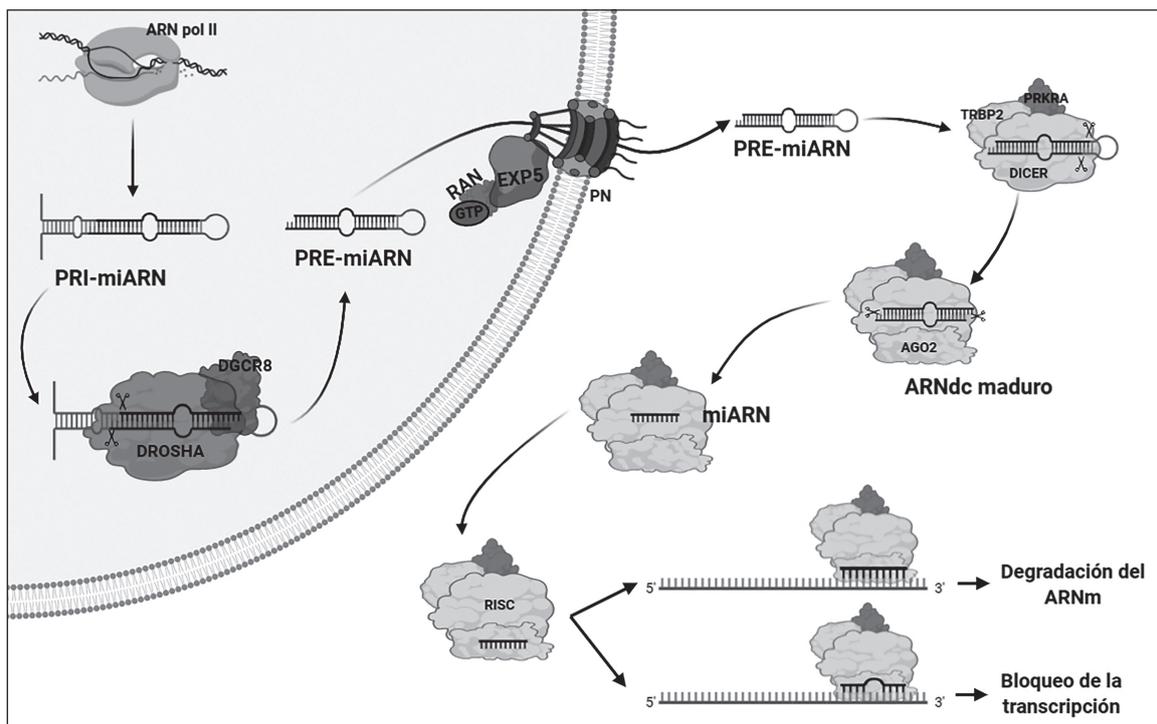


Figura 1. Biogénesis clásica y función de los microARN en animales superiores

EXP5= exportina 5, PN= poros nucleares, AGO2= argonauta 2, ARN pol II= ARN polimerasa II, miARN= microARN, RISC= complejo de silenciamiento inducido por microARN.

podría regular alrededor de 200 transcritos distintos y, a su vez, un mismo ARNm puede ser regulado por múltiples miARN (6).

El resultado de la acción del miARN sobre su ARNm blanco dependerá de la complementariedad de bases entre ellos. Cuando es perfecta, se inhibe la traducción a través de la escisión y degradación directa del mensajero, mientras que si la complementariedad es parcial se desestabiliza al ARNm sin degradarlo, lo cual bloqueará la traducción (12) (13).

Metabolismo óseo: miARN circulantes como biomarcadores óseos potenciales

La primera evidencia de la participación de los miARN en el desarrollo esquelético surgió luego de observar que ratones carentes de la proteína *Dicer*, específicamente en condrocitos, presentaban alteraciones graves en el desarrollo del esqueleto que llevaba a la muerte prematura de los animales (14). A partir de ello, se realizaron diferentes estudios experimentales destinados a caracterizar la variación en la expresión de miARN específicos de ambos tipos de células óseas y analizar su rol regulador en la homeostasis esquelética (9).

Los miARN se expresan en ambos tipos de células esqueléticas donde cumplen roles reguladores importantes en los procesos de osteoblastogénesis y osteoclastogénesis. Los miARN regulan factores de transcripción claves o vías de señalización relacionadas a los diferentes estadios de diferenciación, actividad, supervivencia y apoptosis celular, así como a la comunicación OBL-OCL indispensable para el remodelamiento del tejido (6). Este hecho determina que los miARN cooperan en el mantenimiento de la homeostasis ósea, pero que también pueden perturbar dicha homeostasis (15). En este sentido, se debe tener en cuenta que cambios en la expresión de un determinado miARN alteran señales intracelulares que podrían dar inicio y/o progresión a desórdenes esqueléticos como osteoporosis u otras patologías óseas.

Existe un gran número de estudios *in vitro* e *in vivo* relacionados a los mecanismos mediante los cuales los miARN regulan la interacción entre las diferentes células que se encuentran presentes en las unidades de remodelamiento óseo. Estos estudios evalúan la expresión de los miARN en el medio intracelular, lo cual dificulta su utilidad como biomarcadores del estatus óseo. Si bien la mayoría de ellos permanecen dentro de las células, algunos son liberados al exterior y pueden encontrarse en fluidos como la sangre, la orina y saliva, lo que permite su detección y así evaluar su posible utilidad clínica como nuevos biomarcadores óseos (6) (9) (10) (16).

Los miARN circulantes son muy estables ya que están protegidos de la degradación enzimática debido a que se encuentran unidos a proteínas específicas como la nucleofosmina, fragmentos de células dañadas, cuerpos apoptóticos incorporados dentro de vesículas extracelulares

(VEC) u otras vesículas formadas por lipoproteínas de alta densidad (HDL) o asociadas a proteínas de unión a ARN, como argonauta 2 (Ago2) o nucleoplasmina 1 (NMP1) (8) (9) (17). La posibilidad de utilizar a los miARN extracelulares como biomarcadores del metabolismo óseo surgió en base a que los OBL se comunican mediante exosomas y que, además, el contenido de miARN exosómico cambia durante la osteoblastogénesis (18).

El pequeño tamaño de la molécula de miARN, su estructura específica y el encapsulamiento o unión a proteínas los hace inmunes a la acción de las RNAsas circulantes y a la vez muy resistentes a la degradación por congelamientos y descongelamientos, por cambios de pH o por almacenamiento durante largos períodos de tiempo a temperaturas de -70 °C o menores (19). La excelente estabilidad, fácil obtención y amplio rango de efectos de los miARN hace que sean considerados como una clase muy prometedora de nuevos biomarcadores óseos (20). Como la disminución o sobreexpresión de un determinado miARN altera significativamente el fenotipo celular, presentan un enorme potencial como blanco terapéutico (21).

El perfil de miARN circulantes relacionados al metabolismo óseo reflejaría las condiciones fisiológicas y patológicas del tejido (22). Por lo cual, la medición sérica/plasmática de miARN circulantes específicos de hueso podría utilizarse para identificar cambios en el estado fisiopatológico del tejido, identificando diferentes estadios de osteoporosis u otra enfermedad ósea. De ser así, se contaría con una herramienta clínica adicional para el diagnóstico, pronóstico y posible tratamiento de enfermedades que afectan a un tejido de difícil acceso como lo es el hueso (10) (23).

Niveles de miARN circulantes de origen óseo en distintas situaciones que afectan el metabolismo del hueso

Basados en estudios mecanísticos y en la potencialidad de los miARN circulantes como nuevos biomarcadores óseos es que se han realizado numerosos estudios para identificar y definir las relaciones entre cambios en su expresión sérica y el desarrollo de enfermedades óseas (Tabla I). En este sentido, la mayoría de los estudios bioquímico-clínicos estuvieron principalmente enfocados a determinar la asociación entre la modificación en la expresión de miARN circulantes de origen óseo con los cambios en la DMO, riesgo de fracturas y el desarrollo de osteoporosis. Para ello se evaluó la expresión de distintos miARN en el suero de sujetos osteoporóticos y se comparó con la de sujetos controles, incluyendo otras variables como menopausia, fractura y edad avanzada.

La caída estrogénica que se produce en la mujer menopáusica es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de osteoporosis primaria. La disminución de los niveles estrogénicos acelera la actividad

Tabla 1. *microARN* mencionados en el presente artículo que actúan sobre los diferentes pasos de la osteogénesis y su vía de acción

miARN	Vía	Acción	Referencias
miR-21	BMPs, TGF- β	Activa la osteoblastogénesis e inhibe la osteoclastogénesis	31, 32, 33, 38, 39, 48
miR-26a	Wnt/ β -catenina RANK	Activa la osteoblastogénesis Estimula la osteoclastogénesis	38, 43
miR-27a	Wnt/ β -catenina	Activa la osteoblastogénesis	38
miR-194	Runx2	Activa la osteoblastogénesis	28
miR-210	TGF- β , Wnt/ β -catenina/FGF2	Activa la osteoblastogénesis	43
miR-335-5p	Wnt/ β -catenina	Activa la osteoblastogénesis	38
miR-2861	Runx2	Activa la diferenciación de osteoblastos	39, 40
miR-4516	Runx2	Activa la autofagia	41
miR-10b	Runx2, TGF β	Activa la osteoblastogénesis e inhibe la adipogénesis	30
miR-23a	Wnt/ β -catenina Runx2	Activa la diferenciación osteocitaria Activa la osteoblastogénesis e inhibe la osteoclastogénesis	18, 27, 30, 32, 38, 50
miR-24	Runx2	Inhibe la osteoblastogénesis	31, 38
miR-30	Wnt/ β -catenina, BMPs, Notch	Inhibe la osteoblastogénesis y activa la osteoclastogénesis	43
miR-34c	Notch, Runx2	Inhibe la osteoblastogénesis y activa la osteoclastogénesis	43
miR-96	Osx	Regula la osteoblastogénesis	37
miR-93	BMPs, Osx	Estimula la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis	27, 32
miR-100	BMPs	Estimula la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis	27, 32
miR-222	Runx2	Estimula la osteoblastogénesis	38, 49
miR-124a	BMPs RANKL, IL-11	Inhibe la osteoblastogénesis Estimula osteoclastogénesis y proceso inflamatorio	27, 32, 53
miR-125a miR-125b	BMPs, Osx RANKL	Estimula la osteoblastogénesis Estimula la osteoclastogénesis	27, 31
miR-133a	BMPs	Inhibe la osteoblastogénesis y promueve la diferenciación osteoclástica	26, 43
miR-422a	TGF- β	Regula la apoptosis celular	26
miR-155 y miR-222	BMPs, RANK, M-CS	Estimula el proceso inflamatorio y la osteoclastogénesis	38, 42, 49
miR-338	FGF RANKL	Estimula la osteoblastogénesis e inhibe la osteoclastogénesis	39
miR-130	TGF- β /BMP	Inhibe la osteoblastogénesis y estimula la osteoclastogénesis	28
miR-590-5p	BMPs TGF- β	Estimula la osteoblastogénesis	28, 51
miR-145	RANK	Estimula la osteoclastogénesis	43
miR-208a-3p	TGF- β .	Inhibe la osteoblastogénesis	42, 52

osteoclástica, disminuye la actividad osteoblástica o ambas. Este hecho conduce a una acelerada pérdida de masa ósea, lo cual incrementa el riesgo de fracturas por fragilidad (24). Como los miARN regulan la diferenciación, proliferación, actividad y apoptosis de las células osteogénicas, es que recientemente se ha generado un enorme interés respecto de la potencialidad del dosaje de miARN circulantes de origen óseo como nuevos biomarcadores de los cambios estrogénicos producidos durante la transición hacia la menopausia. En un estudio reciente se estudiaron 11 mujeres antes de realizarse

una ooforectomía y luego de aproximadamente 4 meses de la misma se observó que el miR-17 se encontraba asociado con los niveles estrogénicos (25).

Al comparar los niveles de miARN circulantes en el suero de mujeres osteoporóticas postmenopáusicas respecto de mujeres controles no-osteoporóticas, se observó una disminución en la expresión de miR-503 y una sobreexpresión de miR-422a y miR-133a (26). Un segundo estudio registró un aumento significativo de 9 miARN, incluidos miR-93, miR-23a, miR-124a, miR-21, miR-125b, miR-100 y miR-148a (27). Por otra parte, se comparó la ex-

presión de miARN circulantes en mujeres osteoporóticas respecto de pacientes osteopénicas y se observó, en las primeras, la sobreexpresión de varios miARN (miR-130b-3p, miR-590-5p). El que más se incrementó fue el miR-194-5p (28). Asimismo, se estudió el perfil de miARN en 36 sujetos con osteoporosis idiopática (10 mujeres premenopáusicas, 10 postmenopáusicas y 16 hombres), todos ellos con su control respectivo. Se observó que de los 187 miARN circulantes, 19 se encontraban alterados en los pacientes respecto de sus controles. Asimismo, se encontró que los niveles de miR-29b-3 correlacionaban con el nivel de PINP (29). Otras investigaciones confirmaron que ciertos miARN circulantes correlacionaban con el desarrollo de osteoporosis (29).

También se evaluaron cambios en los miARN y riesgo de fracturas. Los resultados de dos estudios evidenciaron que los miR-133b y miR-10b-5p en suero, se relacionaron significativamente con fracturas osteoporóticas recientes (30). Por otra parte, al comparar el patrón de ciertos miARN de pacientes con fracturas osteoporóticas *versus* sujetos con fracturas no osteoporóticas se observó que los miR-21, miR-23a, miR-24, miR-100 y miR-125b se encontraban elevados en el suero de los pacientes con fracturas osteoporóticas (31) (32). De todos ellos, los niveles del miR-21 se correlacionaron con los niveles de CTX (33). Otros trabajos respecto de los miARN y su rol en fracturas por fragilidad han sido recientemente publicados (34) (35) (36).

La edad es uno de los riesgos más importantes para el desarrollo de osteoporosis, por eso se evaluaron los cambios en miARN circulantes de sujetos añosos. Al comparar los niveles circulantes de miARN en sujetos osteoporóticos añosos respecto de controles sanos de la misma edad se observó que los niveles séricos del miR-96 se encontraban significativamente aumentados en los osteoporóticos añosos (37).

Los posibles cambios en los niveles de miARN circulantes por tratamientos antiosteoporóticos también han sido evaluados. Un estudio comparó en mujeres postmenopáusicas con baja masa ósea los cambios en los niveles circulantes de varios miARN luego de 3 y 12 meses de tratamientos con dos drogas como teriparatide y denosumab, que presentan efectos opuestos sobre el hueso (anabólicos y anticatabólicos, respectivamente). Los resultados mostraron que los miR-24-3p y miR-27a correlacionaron con los cambios en el nivel de remodelamiento evaluado por CTX y PINP luego del tratamiento con teriparatide y que los miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-26a-5p, miR-27a, miR-222-5p y miR-335-5p lo hacían por el tratamiento con denosumab (38). Un estudio similar en mujeres osteoporóticas postmenopáusicas tratadas con denosumab, observó una disminución en la expresión de los miR-21a-5p, miR-29a-3p, miR-338-3p, y miR-2861, a los 3 y 6 meses de tratamiento (39). Estudios recientes han confirmado que los tratamientos para osteoporosis afectan la expresión de ciertos miARN (40).

Cuando se realizaron análisis de curvas ROC para determinar el valor diagnóstico de miARN con gran potencialidad para ser utilizados como biomarcadores en osteoporosis se encontró que el miR-4516 en sujetos osteoporóticos respecto de controles presentaba una sensibilidad del 71% y una especificidad del 62% (41). En pacientes osteoporóticas premenopáusicas respecto de controles los miR-155-5p y miR-208a-3p presentaron sensibilidades del 94,29% y 77,14%, respectivamente y especificidades del 77,14% y 82,86%, respectivamente (42). Recientemente se ha publicado un estudio sobre la utilidad de los miARN como posibles biomarcadores en osteoporosis (43) (44).

Si bien a través de estudios experimentales existe una serie de evidencias respecto del rol de los cambios de miARN en muchos desórdenes del metabolismo óseo, los estudios clínicos respecto de la utilidad de los miARN circulantes como biomarcadores óseos en otras patologías óseas diferentes de la osteoporosis primaria o secundaria son muy escasos (45) (46) (47).

Existen estudios preliminares en 22 pacientes con osteogénesis imperfecta donde se demostró que los miR-26a, miR-30 y miR-21 estaban aumentados mientras que los miR-34c, miR-29a, miR-29b, miR-133a, miR-145 y miR-210 se encontraban disminuidos (43).

Futura aplicación clínica de los miARN circulantes de origen óseo

A pesar de los resultados promisorios obtenidos hasta el momento, la aplicabilidad clínica de los miARN circulantes aún no ha sido fehacientemente establecida debido a que es necesario cumplimentar una serie de requisitos indispensables para ser considerados marcadores bioquímicos y así ser utilizados como nuevos biomarcadores óseos. En este sentido, la fácil disponibilidad de la muestra a utilizar hace que los miARN circulantes cumplan con uno de los requisitos claves para su uso como biomarcadores bioquímicos óseos. Sin embargo, además de la posible determinación en suero, se necesita cumplir con otros criterios como el de mensurabilidad. Este criterio requiere contar con métodos analíticos precisos y reproducibles que permitan su evaluación a bajo costo, cumpliendo además con el conocimiento de las cuestiones preanalíticas de la molécula. Otro de los criterios a tener en cuenta es el de validación que requiere una estrecha asociación entre la patología ósea en cuestión y un miARN circulante determinado. Asimismo, es importante que un determinado miARN posea el criterio diagnóstico suficiente para determinar la presencia de normalidad o, en su defecto, permita diferenciar los distintos cuadros patológicos asociados al metabolismo óseo de un determinado paciente. En este último caso, se requiere extender la caracterización de los miARN circulantes a otros desórdenes esqueléticos diferentes al de osteoporosis, lo cual ayudaría a revelar en un futuro cercano la utilidad

clínica de los miARN circulantes como nuevos biomarcadores óseos. Finalmente, y no menos importante, es la posibilidad de ser modificado por una terapia específica. Por todo ello, si bien no deja de ser promisorio, se deberán realizar esfuerzos adicionales para estandarizar las condiciones preanalíticas, analíticas y posanalíticas que permitan determinar cuál o cuáles de los miARN circulantes podrán ser utilizados como nuevos biomarcadores óseos de gran valor en la práctica clínica.

Conclusiones

La integridad del esqueleto depende de la actividad balanceada del OBL y el OCL. Estas células se interconectan en las unidades de remodelamiento para determinar el nivel de recambio óseo. Distintos factores modifican la actividad de las células esqueléticas. La edad disminuye la diferenciación y actividad de los OBL con un desbalance hacia la formación de adipocitos. La disminución de estrógenos en la menopausia induce una mayor resorción osteoclástica y un incremento en el riesgo de fracturas. Los cambios en la expresión de distintos miARN específicos de las células óseas son los que modifican la diferenciación, proliferación, actividad y apoptosis de osteoblastos y osteoclastos. Su dosaje en suero presenta un enorme potencial para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades óseas. Los miARN de origen óseo que circulan en sangre, reflejan las modificaciones que se producen en el microambiente del hueso, por lo cual han surgido como posibles nuevos biomarcadores óseos. Los estudios realizados hasta el momento han estado enfocados al desarrollo de osteoporosis, por lo cual deberán ampliarse a otras osteopatías. Sin embargo, las evidencias existentes son prometedoras respecto de la posibilidad de utilizar clínicamente la medición de miARN circulantes como nuevos biomarcadores para evaluar el inicio o la progresión de alteraciones del metabolismo óseo y respuesta al tratamiento específico.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Fuentes de financiación

CONICET y Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral (AAOMM).

Correspondencia

Prof. Dra. SUSANA NOEMÍ ZENI
Av. Córdoba 2351, 8° piso (1120), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Tel-Fax: 541159508972.
Correo electrónico: snzeni@hotmail.com

Referencias bibliográficas

- Hackl M, Heilmeier U, Weilner S, Grillari J. Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases—complex signatures for multifactorial diseases? *Mol Cell Endocrinol* 2016; 432: 83-95.
- Bauer D, Krege J, Lane N, Leary E, Libanati C, Milleret P, *et al.* National Bone Health Alliance Bone Turnover Marker Project: current practices and the need for US harmonization, standardization, and common reference ranges. *Osteoporos Int* 2012; 23: 2425-33.
- Perksanusak T, Panyakhamlerd K, Hirankarn N, Suwan A, Vasuratna A, Taechakraichana N. Correlation of plasma microRNA-21 expression and bone turnover markers in postmenopausal women. *Climacteric* 2018; 21: 581-5.
- De Guire V, Robitaille R, Tetreault N, Guérin R, Ménard C, Bambaceet N, *et al.* Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin Biochem* 2013; 46: 46-60.
- Martínez SB, Cenarruzabeitia NV, San Martín JE, Escalada San Martín J, Calleja Canelas A. La paradoja diabética: densidad mineral ósea y fractura en la diabetes tipo 2. *Endocrinol Nutr* 2016; 63: 495-501.
- Pabón-Martínez YV. MicroARNs: una visión molecular. *Rev Univ Ind Santander Salud* 2011; 43: 289-97.
- Moran Y, Agron M, Praher D, Technau U. The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. *Nat Ecol Evol* 2017; 1: 1-8.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33.
- Fabbi M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. *Cancer J Sudbury Mass* 2008; 14: 1-6.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 10513-8.
- Datta A, Ganguli S. The interactomics of the RNA-induced silencing complex. En: *Current trends in Bioinformatics: an insight*. Springer; 2018. p. 193-206.
- Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 2011; 93: 1897-4.
- Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR. Circulating microRNAs as biomarkers in health and disease. *J Clin Diagn Res JCDR* 2012; 6: 1791-5.
- Del Carpio Cano FE, De La Cadena RA. HIV and bone disease: a perspective of the role of microRNAs in bone biology upon HIV infection. *J Osteoporos* 2013; 2013: 571418.
- Yang Y, Yujiao W, Fang W, Linhui Y, Ziqi G, Zhichen W, *et al.* The roles of miRNA, lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis. *Biol Res* 2020; 53 (1): 40.
- Blondal T, Nielsen SJ, Baker A, Andreasen D, Mourutzen P, Teilum MW, *et al.* Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 2013; 59: S1-S6.
- Garnero P. The utility of biomarkers in osteoporosis management. *Mol Diagn Ther* 2017 Aug; 21 (4): 401-18.

18. Guo Q, Chen Y, Guo L, Lin Z. miR-23a/b regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Bone Res* 2016; 4: 1-9.
19. Feng J, Xing W, Xie L. Regulatory roles of microRNAs in diabetes. *Int J Mol Sci* 2016; 17 (10): 1729.
20. Xia Z, Chen C, Chen P, Xie H, Luo X. MicroRNAs and their roles in osteoclast differentiation. *Front Med* 2011; 5: 414-9.
21. Carthew RW. Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16: 203-8.
22. Jones TL, Esa MS, Li KHC, Krishnan SRG, Elgallab GM, Pearce MS, *et al.* Osteoporosis, fracture, osteoarthritis & sarcopenia: a systematic review of circulating microRNA association. *Bone* 2021; 152: 116068.
23. miRBase. Disponible en: <https://www.mirbase.org/search.shtml> (Fecha de acceso: 14 de mayo de 2022).
24. Anam AK, Insogna K. Update on osteoporosis screening and management. *Med Clin North Am* 2021; 105 (6): 1117-34.
25. Baloun J, Pekacova A, Wenchich L, Hruskova H, Senolt L, Svec X, *et al.* Menopausal transition: prospective study of estrogen status, circulating microRNAs, and biomarkers of bone metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022; 13: 864299.
26. Van Wijnen AJ, Van De Peppel J, Van Leeuwen JP, Lian JB, Stein GS, Westendorf JJ, *et al.* MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2013; 11: 72-82.
27. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, *et al.* Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2014; 29 (8): 1718-28.
28. Meng J, Zhang D, Pan N, Sun N, Wang Q, Fan J, *et al.* Identification of miR-194-5p as a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PeerJ* 2015; 3: e971.
29. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R, *et al.* Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101: 4125-34.
30. Chen R, Liao X, Chen F, Wang B, Huang J, Jian G, *et al.* Circulating microRNAs, miR-10b-5p, miR-328-3p, miR-100 and let-7, are associated with osteoblast differentiation in osteoporosis. *Int J Clin Exp Pathol* 2018; 11 (3): 1383-90.
31. Li Y, Shi Z, Feng S. Systematic analysis of miRNAs in patients with postmenopausal osteoporosis. *Gynecol Endocrinol* 2020; 36 (11): 997-1001.
32. Donati S, Ciuffi S, Palmi G, Brandi ML. Circulating miRNAs: a new opportunity in bone fragility. *Biomolecules* 2020; 10 (6): 927.
33. Hu CH, Sui BD, Du FY, Shuai Y, Zheng CX, Zhao P, *et al.* miR-21 deficiency inhibits osteoclast function and prevents bone loss in mice. *Sci Rep* 2017; 7: 43191.
34. Wu YZ, Huang HT, Cheng TL, Lu YM, Lin SY, Ho CJ, *et al.* Application of microRNA in human osteoporosis and fragility fracture: a systematic review of literature. *Int J Mol Sc* 2021; 22 (10): 5232.
35. Zhao F, Xu Y, Ouyang Y, Wen Z, Zheng G, Wan T, *et al.* Silencing of miR-483-5p alleviates postmenopausal osteoporosis by targeting SATB2 and PI3K/AKT pathway. *Aging (Albany NY)* 2021; 13 (5): 6945-56.
36. Xu J, Li M, Pei W, Ding J, Pan Y, Peng H, *et al.* Reduced circulating levels of miR-491-5p and miR-485-3p are associated with the occurrence of vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *Genet Res (Camb)* 2022; 2022: 3838126.
37. Liu H, Liu Q, Wu XP, He HB, Fu L. Mir-96 regulates bone metabolism by targeting osterix. *Clin Exp Pharm Physiol* 2018; 45: 602-13.
38. Anastasilakis AD, Makras P, Pikilidou M, Tournis S, Makris K, Bisbinas I, *et al.* Changes of circulating MicroRNAs in response to treatment with teriparatide or denosumab in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103 (3): 1206-13.
39. Yavropoulou MP, Anastasilakis AD, Makras P, Papatheodorou A, Rauner M, Hofbauer LC, *et al.* Serum profile of microRNAs linked to bone metabolism during sequential treatment for postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105 (8): e2885-94.
40. Nakashima H, Ando K, Kobayashi K, Seki T, Ishizuka S, Fujii R, *et al.* Associations of serum MicroRNA with bone mineral density in community-dwelling subjects: The Yakumo Study. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 5047243.
41. Mandourah AY, Ranganath L, Barraclough R, Vinjamuri S, Hof RV, Hamill S, *et al.* Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for osteoporosis. *Sci Rep* 2018; 8: 8421.
42. Ismail SM, El Boghdady NA, Hamoud HS, Shabayek MI. Evaluation of circulating miRNA-208a-3p, miRNA-155-5p and miRNA-637 as potential non-invasive biomarkers and the possible mechanistic insights into pre- and postmenopausal osteoporotic females. *Arch Biochem Biophys* 2020; 684: 108331.
43. Gennari L, Bianciardi S, Merlotti D. MicroRNAs in bone diseases. *Osteoporos Int* 2017; 28: 1191-213.
44. Hasanzad M, Hassani Doabsari M, Rahbaran M, Banihashemi P, Fazeli F, Ganji M, *et al.* A systematic review of miRNAs as biomarkers in osteoporosis disease. *J Diabetes Metab Disord* 2021; 20 (2): 1391-406.
45. Ko NY, Chen LR, Chen KH. The role of microRNA and long-non-coding RNA in osteoporosis. *Int J Mol Sci* 2020; 21 (14): 4886.
46. De Martinis M, Ginaldi L, Allegra A, Sirufo MM, Pioggia G, Tonacci A, *et al.* The osteoporosis/microbiota linkage: the role of miRNA. *Int J Mol Sci* 2020; 21 (23): 8887.
47. Anam AK, Insogna K. Update on osteoporosis screening and management. *Med Clin North Am* 2021; 105 (6): 1117-34.
48. Rendina D, Elia L, Abate V, Rebellato A, Buondonno I, Succio M, *et al.* Vitamin D status, cardiovascular risk profile, and miRNA-21 levels in hypertensive patients: results of the HYPODD Study. *Nutrients* 2022; 14 (13): 2683.

49. Takigawa S, Chen A, Wan Q, Na S, Sudo A, Yokota H, *et al.* Role of miR-222-3p in c-Src-mediated regulation of osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 240.
50. Zhang XY, Li HN, Chen F, Chen YP, Chai Y, Liao JZ, *et al.* Icariin regulates miR-23a-3p-mediated osteogenic differentiation of BMSCs via BMP-2/Smad5/Runx2 and WNT/ β -catenin pathways in osteonecrosis of the femoral head. *Saudi Pharm J* 2021 Dec; 29 (12): 1405-15.
51. Vishal M, Vimalraj SR, Ajeetha M, Gokulnath R, Keertana Z, He N, *et al.* MicroRNA-590-5p stabilizes Runx2 by targeting Smad7 during osteoblast differentiation. *J Cell Biol* 2017; 232 (2): 371-80.
52. Arfat Y, Basra MAR, Shahzad M, Majeed K, Mahmood N, Munir H. miR-208a-3p suppresses osteoblast differentiation and inhibits bone formation by targeting ACVR1. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 11: 323-36.
53. Tang L, Yin Y, Liu J, Li Z, Lu X. MiR-124 attenuates osteoclastogenic differentiation of bone marrow monocytes via targeting Rab27a. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43: 1663-72.

Recibido: 7 de junio de 2022

Aceptado: 18 de noviembre de 2022