



ACTUALIZACIONES /Reviews

MICRO-ARNs Y CÉLULAS ÓSEAS

Marina Soledad Bonanno, Estefanía Magali Zeni Coronel, Mariana Seijo, Susana Noemí Zeni

Laboratorio de Osteopatías Metabólicas. Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET. Hospital de Clínicas José de San Martín. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Argentina.

Resumen

Los micro-ARNs (miARNs) son pequeñas moléculas de ARN no codificante (de aproximadamente 15-25 nucleótidos), que regulan la expresión de genes involucrados en numerosas funciones biológicas, a través de la inhibición o degradación de un ARN mensajero diana. La homeostasis ósea se mantiene por el balance entre la formación osteoblástica y la resorción osteoclastica. La sobreexpresión o inhibición de miARNs específicos afecta la proliferación, diferenciación y actividad de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Estas acciones son llevadas a cabo modulando la expresión de distintos factores transcripcionales y moléculas de señalización de las vías esenciales para la osteoblastogénesis u os-

teoclastogénesis. Estos efectos modifican el balance entre la formación y la resorción, determinando cambios en la homeostasis ósea.

Esta revisión enumera una serie de miARNs que participan en la homeostasis ósea. Profundizando en el conocimiento de los mecanismos por medio de los cuales los miARNs actúan sobre el hueso, podrían revelarse nuevos usos potenciales futuros, entre los que se encuentran su utilidad como nuevos biomarcadores óseos o como agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos metabólicos óseos, pérdida de masa ósea o enfermedades óseas.

Palabras clave: microARNs, osteoblastogénesis, osteoclastogénesis, remodelamiento óseo.

Abstract

MICRORNAS AND BONE CELLS

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small noncoding RNA molecules (of approximately 15–25 nucleotides), which regulate the expression of genes controlling numerous biological functions, through the inhibition or degradation of the target messenger RNA. Bone homeostasis is maintained by a balance between osteoblastic bone formation and osteoclastic bone resorption. The overexpression or inhibition of specific miRNAs affects cell proliferation, differentiation and activity of osteoblast, osteocytes and osteoclast. This action is done by modulating

the expression of different transcription factors and signaling molecules of the most relevant pathways of osteoblastogenesis or osteoclastogenesis. This effect is able to modify the balance between bone formation and resorption, determining changes in bone homeostasis.

The present review is an overview of a series of miRNAs involved in bone homeostasis. An in depth knowledge of the mechanisms by which miRNAs act on bone may reveal potential uses in the future as new bone biomarkers or therapeutic agents for treating metabolic bone disorders, bone loss and bone diseases.

Key words: *microRNAs, osteoblastogenesis, osteoclastogenesis, bone remodeling.*

Introducción

Para el diagnóstico de osteopenia/osteoporosis se utiliza la medición de la densidad mineral ósea (DMO) mediante absorciometría de rayos X dual (DXA), mientras que para evaluar el nivel de remodelamiento se utilizan marcadores bioquímicos óseos específicos como el propéptido N-terminal del procolágeno tipo I (s-P1NP) y el telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (s-CTX).^{1,2} Con estas herramientas además se puede evaluar el riesgo de fracturas por fragilidad, predecir la progresión de la enfermedad y controlar el éxito del tratamiento farmacológico utilizado. Los marcadores s-P1NP y s-CTX son metabolitos del colágeno que reflejan la actividad coordinada de osteoblastos (OBL) y osteoclastos (OCL), es decir, formación y resorción ósea. Tanto la medición de DXA como la de los marcadores bioquímicos presentan limitaciones y, en ciertos casos, no se condicen con lo esperado; por ejemplo, los pacientes con diabetes tipo II presentan una DMO normal o aun aumentada; sin embargo, tienen un alto riesgo de fracturas por alteración en la microarquitectura ósea.³

Todo ello sugiere que sería importante la introducción de nuevos biomarcadores que, solos o en combinación con aquellos existentes, proporcionen una mejor comprensión de la resistencia ósea y, en consecuencia, del riesgo de fractura.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como biomarcador a “cualquier sustancia, sus productos, estructura o proceso que puede medirse en el organismo y que influye o predice la incidencia de resultados o enfermedades”.¹ Se ha postulado que los ARN pequeños, no codificantes, serían excelentes candidatos para ser utilizados como biomarcadores óseos.⁴ Entre los ARN pequeños, los micro-ARNs (miARNs) cumplen funciones reguladoras importantes en casi cualquier tipo de célula o tejido, incluido tejido óseo y muscular.⁵

Los micro-ARNs (miARNs)

Los ARNs pequeños (sARNs) son una familia de ARNs regulatorios que incluyen a los miARNs, a los ARN de interferencia cortos (ARNsi) y a los ARNs que interactúan con la



proteína argonauta de *Pyrococcus furiosus* (PIWI) (ARNpi).⁶ Estos tres tipos de ARNs difieren en su biogénesis.⁷

Los miARNs son cadenas cortas de ARN monocatenarias, no codificantes de 21 a 25 nucleótidos (NT), que derivan de secuencias no codificantes intergénicas (intrones) de genes que codifican proteína. Estos miARNs poseen secuencias complementarias que, durante la transcripción, se pliegan sobre sí mismos adoptando una estructura en forma de horquilla.⁶⁻⁸ La función de estos miARN es regular la expresión génica, uniéndose a un ARN mensajero (ARNm) específico por complementariedad de bases, bloqueando la traducción o degradando al mensajero, tanto en animales como plantas, algas verdes, gusanos e incluso en virus.⁷⁻⁹ El mecanismo implicado incluye la unión del miARN, a través de su extremo proximal 5' (nucleótidos del 2 al 7 o del 2 al 8) también denominada secuencia semilla, a la región 3' no traducible (3' UTR) complementaria del ARNm.^{10,11}

Como 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. Se estima que un único miARN puede regular alrededor de 200 transcritos diferentes y, a su vez, un mismo ARNm puede ser regulado por múltiples miARNs,⁸ modulando coordinadamente a un grupo de genes que codifican proteínas.

Los micro-ARNs se encuentran conservados en especies muy diversas y se los considera un mecanismo de regulación epigenética de procesos celulares complejos como crecimiento, ciclo celular, proliferación, diferenciación, apoptosis, metabolismo, homeostasis y respuesta al estrés.^{1,12}

Son expresados en forma endógena en la mayoría de las células eucariotas, pero su expresión puede ser característica de ciertos tejidos o de ciertos estadios del desarrollo celular, encontrándose una expresión diferencial de miARNs específicos que puede ser estudiada.⁸ Se ha definido como miRNoma al es-

pectro completo de miARNs expresado en un tipo particular de células.¹³

La mayoría de los miARNs permanecen dentro de las células; sin embargo, algunos pueden salir de la célula y encontrarse dentro de vesículas extracelulares (VEC) o de vesículas formadas por lipoproteínas de alta densidad (HDL); otros pueden circular unidos a proteínas específicas como la ribonúcleo-proteína nucleofosmina¹ o a cuerpos apoptóticos,⁷ permitiendo su detección en sangre, suero, plasma, orina u otros biofluidos.^{1,14} Se ha postulado que las alteraciones en los perfiles de miARN específicos circulantes reflejarían las condiciones fisiológicas y patológicas del tejido en cuestión.¹⁵ Se ha demostrado que los cambios en la expresión de los miARNs circulantes reflejan estados de enfermedad como cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurodegenerativos, diabetes, sepsis, así como también daños y lesiones tisulares.^{12,16} Debido a ello, la medición sérica/plasmática de determinados miARNs permitiría sacar conclusiones sobre la fisiopatología del tejido.

Un punto importante es que los miARNs, a través de las VEC, pueden mediar la comunicación intercelular de forma similar a las hormonas.^{1,12} Las VEC son pequeñas estructuras de membrana (ectosomas, micropartículas, microvesículas derivadas de tumores, exosomas y oncosomas) que se producen por diferentes mecanismos. Las VEC se pueden liberar al torrente sanguíneo de casi todo tipo celular⁷, y así llegar, en forma estable, a las células receptoras que se encuentren a distancias cortas o largas de la célula que las liberó¹. Estas VEC que contienen miARNs son captadas por endocitosis, fusionándose con la membrana plasmática de la célula receptora o a través de interacción con receptores de membrana específicos. Una vez en el interior celular pueden modificar el repertorio de miARNs de la célula receptora, causando cambios en la expresión de sus genes y, en consecuencia, su comportamiento celular,^{1,16} disminuyendo o sobreexpresando miARNs

individuales que alteran significativamente los fenotipos celulares. Este mecanismo les confiere un gran potencial terapéutico.

Según la base de datos miRBase versión 22¹⁷ existen en los seres humanos, al menos, 326 genes que codifican para miARNs,¹⁸ 1917 precursores y 2654 miARNs maduros conocidos, que regulan cerca de un tercio del transcriptoma celular.¹⁶

Biogénesis de miARNs

La biogénesis de los miARNs depende de una serie de pasos enzimáticos.¹⁹ Existen dos vías de generación: la vía clásica o *canónica* y la vía alternativa o *no canónica*.

La generación de los miARNs a través de la vía canónica depende de las proteínas Drosha (nuclear) y Dicer (citoplasmática) en un proceso estrictamente regulado. El proceso completo de biogénesis clásica de miARNs se resume en la Figura 1. En animales, comienza en el núcleo, donde la ARN polimerasa II transcribe el precursor pri-miARN a partir de regiones no codificantes intergénicas.¹ Esta molécula precursora es larga, poliadenilada en el extremo 3', con caperuza en el extremo 5'; presenta una estructura tipo horquilla de ARN doble cadena (ARNdc) sin complementariedad perfecta, con largas colas de ARN de simple cadena (ARNsc) en cada extremo y un bucle terminal.^{6,8,13} En el siguiente paso, las proteínas nucleares Drosha (ribonucleasa III) y la proteína de unión a ADN bicatenario (DGCR8) cortan las colas del pri-miARN generando un precursor de 55 a 70 NT^{13,20} que presenta una saliente distintiva de 2 NT de ARNsc en el extremo 3', denominado PRE-miARN.²¹

El PRE-miARN es subsecuentemente trasladado, desde el núcleo al citoplasma, mediante la unión a un complejo de transporte, formado por un receptor de exportación nuclear (Exportina 5), una proteína nuclear RAN ligada a GTP (RAN-GTP) y nucleoporinas que median su acoplamiento con los poros nucleares.⁸ En el citoplasma,

el PRE-miARN es reconocido por la proteína Dicer que presenta acción de endonucleasa III²² y posee varios dominios de unión a ARN.¹⁹ El dominio PAZ reconoce la cola saliente de 2 NT en el extremo 3', mientras que la región entre PAZ y el dominio RNasa III (que reconoce secuencias en tándem) actúa como una "regla molecular" definiendo el tamaño del miARN maduro.¹⁹

Dicer, junto a otras proteínas (TRBP2 y PRKRA) que actúan como cofactores, reconoce y escinde al pre-miARN¹⁹ generando un miARN ARNdc maduro de aproximadamente 19-25 NT con una saliente de 2 NT de ARNsc en cada extremo 3'.^{1,8,21} Posteriormente, Dicer junto a sus cofactores se unen a la proteína Argonauta 2 (AGO2).²¹ Dicer también escinde el miARN ARNdc, dando lugar a una hebra de miARN ARNsc antisentido o miARN maduro que carga en AGO2, mientras que la otra hebra es degradada por el complejo.²¹ La unión del miARN maduro al conjunto proteico da lugar al denominado complejo de silenciamiento inducido por miARN (RISC), en el cual AGO2 utiliza el miARN maduro para dirigir el silenciamiento. RISC actúa de dos formas, dependiendo de la complementariedad parcial o completa del miARN y su ARNm blanco. Cuando existe una complementariedad perfecta entre la secuencia semilla del miARN con el extremo 3' UTR del ARNm diana, se inhibe la traducción a través de la ruptura y degradación directa del mensajero.⁷ En cambio, si la complementariedad es parcial, bloquea la traducción desestabilizando al ARNm sin producir su degradación^{13,18} (véase Figura 1).

Además de la biogénesis clásica de miARN existen varias vías alternativas o *no canónicas*, que solo han sido descritas para organismos inferiores como *Drosophila megaloblaster*, *Giardia lamblia*, Zebrafish y Murine γ -herpesvirus 68.⁸ La producción de estos miARNs pueden ser independientes de Drosha o de Dicer compartiendo pasos del procesamiento.¹

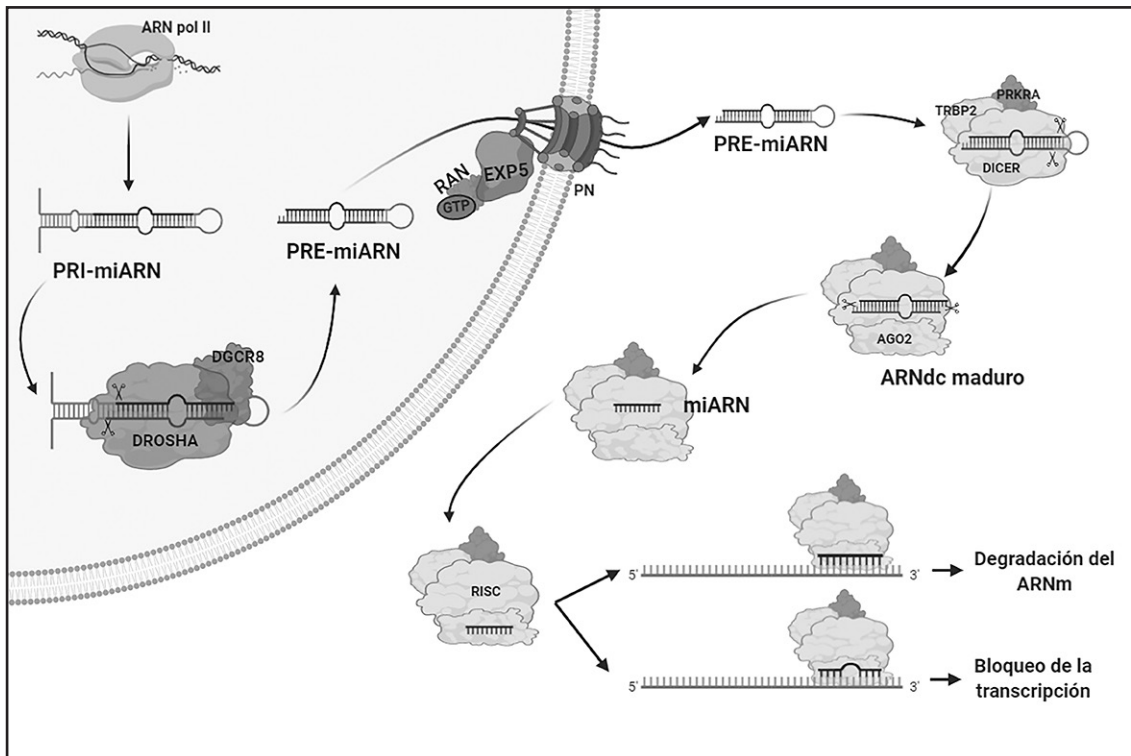


Figura 1. Biogénesis canónica de microARNs (miARNs). La ARN polimerasa II (ARN pol II) transcribe el precursor PRI-miARN. Drosha y DGCR8 lo escinden generando el PRE-miARN. Pasa a citoplasma donde Dicer junto a cofactores (TRBP2 y PRKRA) lo escinden generando un ARN doble cadena (ARNdc) maduro que se asocia a Argonauta 2 (AGO2). Dicer escinde nuevamente al miARNdc formando un ARN de simple cadena antisentido o miARN maduro; la otra hebra es degradada. La unión de miARN maduro a AGO2 forma el complejo de silenciamiento inducido por miARN (RISC) que silenciará al ARN mensajero (ARNm) diana. EXP5 = Exportina 5, NP = poros nucleares.

MicroARNs y metabolismo óseo

El esqueleto se remodela constantemente por la acción conjunta de OBL, OCL y osteocitos, en un proceso que se encuentra estrictamente regulado. Los miARNs regulan epigenéticamente distintos procesos celulares que ocurren dentro de cada una de las células óseas (proliferación, diferenciación y apoptosis celular) o modulan distintas vías metabólicas del tejido.

La primera evidencia respecto de la im-

portancia de los miARNs en el desarrollo esquelético surgió en 2008, al observar las alteraciones que se generan en ratones carentes de la proteína Dicer, específicamente en condrocitos.²³ Los cartílagos de crecimiento presentaban un menor número de condrocitos proliferativos, debido a la disminución en el proceso de proliferación y a un aumento en la diferenciación a condrocitos hipertróficos posmitóticos. Estos animales presentan graves defectos en el desarrollo

del esqueleto y muerte prematura.²³ A partir de dicho estudio se realizaron diferentes investigaciones centradas en caracterizar la variación en la expresión de miARNs en las células óseas primarias, así como también en analizar el rol regulador de los miARN tanto en la osteoblastogénesis como en la osteoclastogénesis y, en definitiva, en la homeostasis ósea.¹

Micro-ARNs y osteoblastogénesis

Los OBL derivan de pre-OBL que se diferencian de células madre mesenquimales,²⁴ las cuales a su vez pueden diferenciarse a otros linajes celulares como miocitos, condrocitos, neuronas y adipocitos dependiendo del impacto de distintos factores presentes en su microambiente celular.²⁵

La osteoblastogénesis es un proceso complejo que se encuentra regulado por diferentes factores de transcripción, vías de señalización y de genes regulatorios. Entre los factores de transcripción más importantes se encuentran el factor de transcripción 2 relacionado a RUNT (Runx2), el factor de transcripción específico de OBL u osterix (Osx) y la familia de proteínas Smads (1, 4 y 5).²⁶ A su vez, las vías de señalización que desempeñan un rol fundamental en el proceso de osteoblastogénesis incluyen las señales de Wnt/ β -catenina, del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), de las proteínas morfogenéticas óseas 2-7 (BMPs), de la proteína quinasa dual específicamente activada por mitógeno (MAPK)/ERK, la vía NOTCH y la vía JAK/STAT. En la osteoblastogénesis participan una enorme cantidad de factores regulatorios como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Distal-Less Homeobox 5 (Dlx5), la vía de señalización de Hedgehog, el factor nuclear de células T activadas citoplasmático 1 (NFATc1), la proteína activadora 1 (AP-1) y Twist 1.²⁷ El proceso también se encuentra regulado por distintas hormonas y citoquinas,^{25,26} pero además, a nivel genético y epigenético, se incluyen la regulación transcripcional por metila-

ción del ADN, modificaciones nucleosómicas y modificaciones de proteínas.²⁵ Todo cambio en los niveles de miARN que impacten sobre alguno de los pasos antes mencionados alteraría la regulación ósea, determinando el incremento o la disminución de la diferenciación del OBL y de sus funciones específicas. Las Tablas 1 y 2 resumen los miARNs que estimulan y que suprimen la osteoblastogénesis, respectivamente.

Micro-ARNs implicados en la vía Wnt/ β -catenina

La vía de señalización Wnt/ β -catenina desempeña un rol fundamental en la diferenciación, proliferación y apoptosis del OBL. Dicha vía incluye una señal canónica y una no canónica. La señal canónica se produce cuando Wnt se une al receptor Frizzled y a su correceptor la lipoproteína de baja densidad (LRP)5/6, generando el secuestro de Axina.²⁸ Este proceso evita la formación del complejo Axina/Proteína poliposis adenomatosa coli (APC)/Glucógeno Sintasa Kinasa (GSK3 β), encargado de degradar a β -catenina. En consecuencia, β -catenina queda libre y se traslada al núcleo donde activa la transcripción de genes indispensables para la osteogénesis como las proteínas TGF- β y BMP2.²⁸ Por otra parte, la señal Wnt estimula la transcripción de osteoprotegerina (OPG) y Runx2.²⁸ Esto induce una reducción en la relación del ligando del receptor activador del factor nuclear kB (RANKL)/OPG, lo que se traduce en la inhibición de la diferenciación osteoclástica y en la promoción de todo el proceso de formación ósea²⁴ (véase Figura 2).

La vía no canónica de Wnt/ β -catenina se caracteriza por no requerir la estabilización de la β -catenina para culminar su cascada de señalización. Mediante esta vía, Runx2 es activado y, al mismo tiempo, el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR γ) es inhibido dando lugar, en conjunto, a la diferenciación osteoblástica y a la inhibición de la diferenciación adipocítica.²⁹



Tabla 1. microARNs que estimulan la osteoblastogénesis.

miARN	Blanco	Vía	Modelo experimental	Tipo de estudio	Referencias
miR-15b	Smurf 1	TGF- β	hBM-MSCs	<i>In vitro</i> , <i>Clínico</i>	29 36 40
	Smurf 1	TGF- β	hPDLSCs	<i>In vitro</i>	29 36 40
miR-20a	BAMBI, CRIM y PPAR γ	Wnt/ β -catenina/ BMPs/FGF2	hBM-MSCs	<i>In vitro</i>	29 36 37
miR-21	Smad 7	BMPs	mMSCs, muestras de sangre	<i>In vitro</i> , <i>Clínico</i>	1 27 29
	Smad 7	TGF- β	mMSCs	<i>In vitro</i>	29 33 40 41 43
miR-26a	GSK3 β	Wnt/ β -catenina	mBM-MSCs	<i>In vitro</i>	25 32
miR-27a	APC	Wnt/ β -catenina	MDPC-23	<i>In vitro</i>	31 32 37 40 47
	sFRP1	Wnt/ β -catenina	MG63, HEK293T	<i>In vitro</i>	34
miR-29a	Dkk1, Kremen2, sFRP2 y SOST	Wnt/ β -catenina	hFOB	<i>In vitro</i>	25 29 33 40
	HDAC4	Runx2	mBM-MSC, ratones VB	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i>	29
Tardíamente miR-29b	TGF- β	TGF- β	MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	25 26 27 29 32 33 40
	Col1A1	Síntesis de matriz	MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	33 37
	Runx2	Runx2	MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	29
miR-92a	PI3K y Akt	IGF1	MG-63, MHM, MNNG	<i>In vitro</i>	29
miR-98	SOST	Wnt/ β -catenina	Saos-2, U-2OS	<i>In vitro</i>	29
miR-142	APC	Wnt/ β -catenina	hFOB1.19, muestras de sangre	<i>In vitro</i> , <i>Clínico</i>	40 31 32 37 47
miR-181a	TGFBI y TGFBR	TGF- β	C2C12, MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	29 37
miR-194	STAT1	Runx2	mBM-MSCs	<i>In vitro</i>	29 32
miR-210	AcvR1b	TGF- β	ST2, NRG	<i>In vitro</i>	29 37
miR-218	Dkk1, Kremen2, sFRP2 y SOST	Wnt/ β -catenina	MC3T3-E1, mBM-MSCs, ADSCs	<i>In vitro</i>	25 29 33 40
miR-216a	c-Cbl	IGF-1	hADSCs, ratones NOD/SCID	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i>	29 36
miR-322	Tob2	BMPs	BM-MSCs, C2C12, HeLa	<i>In vitro</i>	40 58
miR-335 y miR-433	Dkk1	Wnt/ β -catenina	C3H10T-1/2, MC3T3-E1, hFOB1.19, muestras de sangre	<i>In vitro</i> , <i>clínico</i>	25 29 32 37
miR-346	GSK3 β	Wnt/ β -catenina	hBM-MSCs	<i>In vitro</i>	32 40
miR-378	PI3K y Akt	IGF-1	C2C12, MC3T3-E1, muestras de sangre	<i>In vitro</i> , <i>Clínico</i>	27 36 37
miR-542	sFRP1	Wnt/ β -catenina	rBM-MSCs, ratas Sprague-Dawley	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i>	29 32
miR-764	Runx2	Runx2	MC3T3-E1, L mOB	<i>In vitro</i>	29
miR-2861	HDC5	Runx2	mOB, ST2, mBM-MSCs, ratones C57BL/6, muestras de sangre	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i> , <i>Clínico</i>	25 26 27 29 33 36 37 43

Tabla 2. microARNs que suprimen la osteoblastogénesis.

miARN	Blanco	Vía	Modelo experimental	Tipo de estudio	Referencias
miR-10b y miR-30c	Runx2	Runx2	MC3T3-E1, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	29 32 37
miR-16	AcvR2a	TGF- β	hBM-MSCs,	<i>Clínico</i>	26 29
miR-17	BMP2 y Smad 1/5	BMPs	hADSCs, ratones C57BL/6J	<i>In vitro, In vivo</i>	29 36 40
miR20a	TGFR	TGF- β	3T3-L1, ST2, C3H10T1/2	<i>In vitro</i>	25 29 35
miR-21	SPRY1	FGF	mMSCs, hBM-MSCs, ratones C57BL/6J, suero	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	29 32 40
miR-23a	LRP5	Wnt/ β -catenina	hBM-MSCs	<i>In vitro, Clínico</i>	1 29 33 37 47
	SATB-2	Runx2	MC3T3-E1, ratones C57BL/6, muestras de sangre	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	29 33 37
miR-23b	Smad 3	TGF- β	MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	29 55
	Runx2	Runx2	hBM-MSCs, ratones C57BL/6J	<i>In vivo, Clínico</i>	29
miR-24	SATB-2	Runx2	hBM-MSCs, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	29 33
miR-26a	Smad 1/5	BMPs	hADSCs	<i>In vitro</i>	25 26 27 36 37
Tempranamente miR-29b	TGF- β	TGF- β	MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	37
miR-30	Runx2	Runx2	MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	29 37
	LRP5/6	Wnt/ β -catenina	mBM-MSCs	<i>In vitro</i>	29 40
miR-30 (a, b, c y d)	Smad 1/5	BMPs	MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	29 33 35 37 40 47
miR-31	SATB-2	Runx2	hMSCs	<i>In vitro</i>	27 40
	Osx	Osx			32
miR-33	SATB-2	Runx2	mBM-MSCs	<i>In vitro</i>	29
miR-34a	Jag 1	Notch	hMSCs, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	27 29 32 33 36 40 47
miR-34b	Notch2	Notch	C2C12	<i>In vitro</i>	33
	SATB-2	Runx2	mOBs, ratones 129Sv/EV	<i>In vitro, In vivo</i>	29
miR-34c	Notch1/2 y Jag1	Notch	C2C12, ratones FVB/N	<i>In vitro, In vivo</i>	33 36
	SATB-2	Runx2	C2C12, ratones FVB/N	<i>In vitro, In vivo</i>	29 32 33 36 47 51
miR-63, miR-96 y miR-135b	Osx	Osx	mBM-MSCs, USSCs, ratones C57BL/6J, muestras de medula ósea humana	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	25 26 27 29 37 40
miR-93	BMP2	BMPs	hBM-MSCs	<i>In vitro</i>	1 29 33
	Osx	Osx	mOBs, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	29 33
miR-100 y miR-153	BMPR	BMPs	hADSCs, hBM-MSCs, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	1 25 26 29 37



(continuación de tabla 2)

miARN	Blanco	Vía	Modelo experimental	Tipo de estudio	Referencias
miR-103a, miR-137, miR-205, miR-217, miR-222, miR-338, miR-618 y miR-3077	Runx2	Runx2	hBM-MSCs, MC3T3-E1, ratones C57BL/6J y BALB/c, ratas Wistar	<i>In vitro, In vivo</i>	27 29 32 33 36 37
miR-106 y miR-370	BMP-2	BMPs	hADSCs, MC3T3-E1, ratones C57BL/6	<i>In vitro, In vivo</i>	1 29 33 36
miR-124	Dlx2, Dlx3 y Dlx5	BMPs	hBM-MSCs, ratones nude NIH-bg-nu-xid, muestras de sangre	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	1 27 37 54
miR-125b	BMPR	BMPs	hBM-MSCs, ratones BALB/c nude	<i>In vitro, In vivo</i>	1 25 26 27 29 37
	Osx	Osx	hBM-MSCs, muestras de médula ósea	<i>In vitro, Clínico</i>	26 29 36 37
miR-133, miR-204/211	Runx2	BMPs	C2C12, VSMCs, hMSCs, muestras de sangre y médula ósea	<i>In vitro, Clínico</i>	1 25 26 27 33 37 38 47 56
miR-135a	Smad 1/5	BMPs	C2C12	<i>In vitro</i>	25 26 27 29 33 37 38 47
	Runx2	Runx2	MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	25 26 29 32 33
miR-140 y miR-422a	TGF- β	TGF- β	MC3T3-E1, MG-63, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	1 29 35 40 42
miR-148	Kdm6b	TGF- β	mBM-MSCs, ST2, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	29 33 37
miR-155 y miR-222	Smad 1/5	BMPs	MC3T3-E1, hBM-MSCs	<i>In vitro</i>	27 33 49
miR-181a	Kdm6b	TGF- β	mBM-MSCs	<i>In vitro</i>	29
miR-182	FOXO1	IGF-1	C3H10T1/2, MC3T3-E1	<i>In vitro</i>	57
miR-206	Glutaminasa	Interacción celular	C2C12, ratones FVB	<i>In vitro, In vivo</i>	26 27 29 37 46
miR-210	PPAR γ	Wnt/ β -catenina/FGF2	hBM-MSCs	<i>In vitro, Clínico</i>	29
miR-214, miR-223 y miR-338	FGFR1/2	FGF	BM-MSCs, ratones, muestras de sangre C57BL/6J y BALB/c	<i>In vitro, In vivo, clínico</i>	1 25 27 29 32 33 36 37 44
miR-221	Dkk2	Wnt/ β -catenina	mOBs	<i>In vitro</i>	29
miR-223 y miR-497	IGF-1R	IGF-1	MC3T3-E1, HOS, U2OS	<i>In vitro</i>	27 29
miR-376c	Wnt3	Wnt/ β -catenina	mOBs	<i>In vitro</i>	29 30
miR-483	ERK1	FGF	hADSCs, ratones Balb/c nude, muestras de sangre	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	29 45

Los miARNs que usan como blanco a Wnt, Frizzled o LRP5/6 atenúan la señal suprimiendo la diferenciación del OBL. Entre los miARNs que bloquean la señal Wnt/ β -catenina se encuentran miR-376c que utiliza como blanco al ARNm de Wnt3³⁰, miR-20a y miR-210 que inhiben PPAR γ o miR-23a y miR-30, que se unen directamente al ARNm de LRP5/6.²⁹ En cambio, la osteoblastogénesis será promovida si los miARNs actúan como reguladores negativos sobre alguno de alguno de los integrantes del complejo de captura de la β -catenina. En células mesenquimales, miR-26a y miR-346

inhiben al ARNm de GSK3 β mientras que miR-27a y miR-142³¹ inhiben al ARNm de APC.³²

La vía Wnt/ β -catenina es inhibida por Dikkopf (Dkk), Kremen y esclerostina (SOST) que evitan la interacción entre Wnt y su receptor, mientras que la proteína secretada relacionada con Frizzled (sFRP) inhibe la señal uniéndose directamente a Wnt. Los miARNs que inhiban a estos reguladores negativos favorecerán la diferenciación osteogénica; miR-29a y miR-218 regulan negativamente a Dkk1³³, Kremen2, sFRP2 y SOST; miR-98 inhibe al ARNm de SOST; miR-98 inhibe al ARNm de SOST; miR-335 y miR-433 actúan sobre Dkk1,

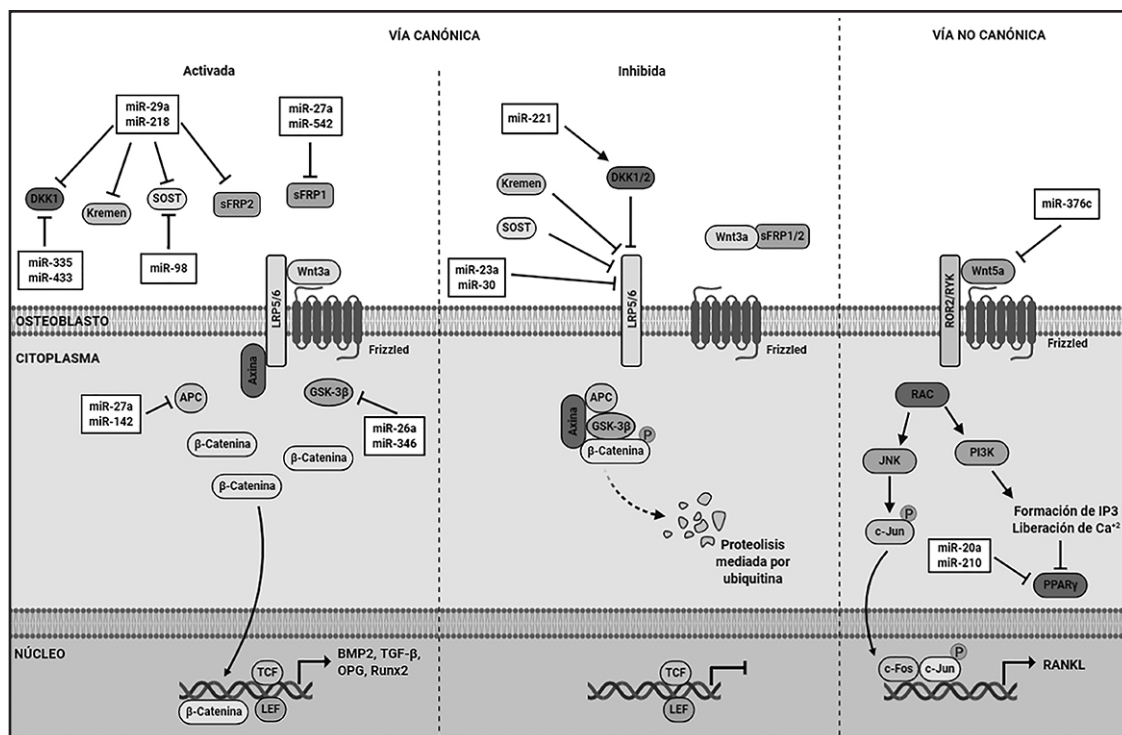


Figura 2. MicroARNs (miARNs) implicados en la vía Wnt/ β -catenina. La señal canónica de la vía Wnt/ β -Catenina se activa cuando Wnt3a se une al receptor Frizzled y a su correceptor la lipoproteína de baja densidad (LRP)5/6 secuestrando a Axina. Esto evita la degradación de β -catenina que queda libre, se traslada al núcleo y activa la transcripción de genes para la osteogénesis. Los represores son Dikkopf (DKK1), Kremen, esclerostina (SOST) y sFRP1/2. La vía no canónica utiliza a Wnt5a, no requiere la estabilización de β -catenina y culmina activando a Runx2 e inhibiendo al receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR γ). Los miARNs que bloquean la vía canónica son miR-: 23a, 30 y 221; los miARNs que promueven la osteoblastogénesis son miR-: 26a, 346, 27a, 142, 29a, 218, 335, 433, 27a y 542. Los miARNs que bloquean la vía no canónica son miR-: 376c, 20a y miR-210. Axina/APC/GSK-3 β = complejo de degradación.



mientras que miR-27a y miR-542 lo hacen sobre sFRP1.^{31,34} Contrariamente, aquellos que estimulen a estos reguladores negativos atenuarán la osteoblastogénesis, como lo hace miR-221 que activa a Dkk2.

Micro-ARNs implicados en la vía de las BMPs

Si bien BMP-2, 4, 5, 6, y 7 presentan una alta capacidad osteogénica, únicamente la BMP-2 es necesaria y suficiente para inducir la osteoblastogénesis irreversiblemente.³⁵ La unión de BMP-2 a su receptor específico (BMPR) induce la autofosforilación del receptor y el reclutamiento del complejo Smad 1/5/8. Este complejo, al unirse a Smad 4, activa una señal en cascada que se traslada al núcleo donde se inicia la transcripción de Runx2, Dlx5 y Osx. La autofosforilación de BMPR también activa la señal en cascada de las MAPKs que, a través de la p38K, induce la maduración del OBL por la fosforilación de Runx2, Dlx5 y Osx³⁵ (véase Figura 3).

Sobre la vía de las BMP actúan varios miARNs que regulan recíprocamente la osteogénesis y la adipogénesis. La diferenciación mesenquimal a OBL es promovida por miR-20a, que activa la señalización BMP/Runx2 mediante la inhibición de antagonistas de la vía tales como PPAR γ , el inhibidor ligado a membrana de BMP y activina (BAMBI) y el regulador transmembrana de BMP 1 rico en cisteína (CRIM).^{29,36,37} Contrariamente, miR-17, miR-93, miR-106 y miR-370 regulan negativamente la osteogénesis y activan la adipogénesis uniéndose al ARNm de BMP2.^{1,36}

La osteogénesis también es inhibida por la regulación negativa ejercida por miR-100, miR-125b y miR-153^{27,29} sobre el BMPR; por la inhibición o bloqueo de Runx2 donde actúan miR-133 y miR-204/211;³⁷ los dos primeros estimulan al mismo tiempo la adipogénesis,^{26,27,38} o por la inhibición de Smad 1/5 sobre las que actúan miR-17, miR-26a, la familia de miR-30a, b, c y d, miR-135a, miR-155 y miR-222.^{26,27,38,39}

Los factores Dlx y el traductor de erbB2 (Tob2) se encuentran implicados en la cascada osteoinductiva de las BMPs. Los miARNs

que eviten la expresión de cualquier Dlx, tal como lo hace miR-124,³⁷ suprimirá la diferenciación osteogénica y la mineralización de la matriz.³¹ Tob2 es un regulador negativo de la osteoblastogénesis al unirse al ARNm de Osx e inducir su degradación. miR-322 evita este efecto uniéndose al ARNm de Tob2, favoreciendo la respuesta inductiva.^{40,58}

Existen varios represores de la vía de las BMP, entre ellos, Noggin y Smad 6 y 7. Noggin inhibe la unión BMP/BMPR; Smad 6 induce la degradación de Smad 1/5/8 y Smad 7 inhibe la autofosforilación de BMPR y la formación del complejo Smad 1/5/8³⁵ (véase Figura 3). La regulación negativa ejercida por los miARNs sobre alguno de estos represores inducirá la osteogénesis, como lo hace miR-21 al inhibir a Smad 7.⁴¹

Micro-ARNs implicados en la vía del TGF- β

El factor proteico TGF- β ejerce un rol dual en el proceso de osteoblastogénesis ya que, por un lado, activa la proliferación de pre-OBL en las etapas tempranas y, por el otro, inhibe la diferenciación de OBL y mineralización, en las etapas finales de la osteogénesis. La unión de TGF- β a su receptor específico (TGFR) activa a Smad 2/3 el cual, al unirse a Smad 4, forma un complejo que se traslada al núcleo donde inicia la transcripción del factor Wnt que favorecerá la osteoblastogénesis³⁵ (véase Figura 3).

La diferenciación del OBL se inhibe al bloquear la traducción del ARNm de TGF- β , ya que se ve disminuida la fosforilación de Smad 2/3. Es a través de este proceso que se inhibe, en etapas tempranas, la osteogénesis por medio de miR-29b, miR-140 y miR-422a.^{1,42} El bloqueo del receptor TGFR también inhibe la osteoblastogénesis como lo hace miR-20a.²⁵ La señal de TGF- β posee inductores de la diferenciación osteoblástica. La diferenciación de OBLs es favorecida por miR-181a al unirse al inductor de TGF- β (TGFB1) y al receptor 1 (TGFB1).³⁷ Contrariamente, la inhibición de tales inductores modulará negativamente el proceso de diferenciación. La demetilasa lisina-específica 6b (Kdm6b) es una enzima



que participa en la vía del TGF- β como un inductor positivo de la osteoblastogénesis;³⁵ miR-181a y 148 inhiben a dicha enzima.²⁹ La señal de TGF- β en las etapas tempranas de la osteogénesis también es interferida por miR-23b mediante la unión a Smad 3.^{29,55} Los lipopolisacáridos estimulan a miR-23b y con ello inhiben la osteoblastogénesis.²⁹ Smad 7 y Smurf son represores de la vía de TGF- β .³⁵ En este sentido, Smad 7 inhibe el traslado del complejo Smad 2/3-Smad 4 al núcleo, mientras que tanto Smad 7 como Smurf favorecen la degradación de Smad 2/3.³⁵ La osteoblastogénesis es promovida por miR-21, que regula negativamente la expresión de Smad 7,³³ y por miR-15b y miR-17, que disminuyen la expresión de Smurf1, incrementando así los niveles de Runx2.^{29,36}

Durante la diferenciación tardía de los OBLs, algunos TGF- β actúan como inhibidores del proceso. La interacción de estos TGF- β con su TGFBR o con los receptores de activina (AcvR), pertenecientes a la superfamilia de receptores de TGF- β , activan a Smad 2/3. La unión de Smad 2/3 con la histona diacetilasa (HDAC) forma un complejo que se traslada al núcleo y reprime a Runx2, inhibiendo la osteogénesis.³⁵ La osteoblastogénesis también es inducida por miR-29b silenciando al ARNm de TGF- β 3 en etapas tardías del proceso,³⁷ mientras que miR-2861 lo hace inhibiendo a HDAC5, lo que aumenta indirectamente la expresión de Runx2.⁴³ La diferenciación osteoblástica es promovida por miR-210; este miARN actúa inhibiendo al ARNm del receptor de activina 1 (AcvR1b); contrariamente, miR-16 inhibe la osteogénesis modulando el ARNm del AcvR2a.²⁹

Micro-ARNs implicados en otros procesos osteogénicos

La señal FGF/FGFR desempeña un rol importante en la osteoblastogénesis; sin embargo, el efecto de esta señal es complejo ya que puede aumentarla o atenuarla según el tipo de FGF y de FGFR que se exprese, el estado de maduración celular y el microambiente en el cual ocurre.²⁸ Varios estudios genéticos han demos-

trado que el FGF2 es un importante regulador de la proliferación y diferenciación celular durante la osteogénesis. En este sentido, la unión de FGF2 a su receptor tirosina kinasa específico (FGFR) induce la dimerización y yuxtaposición de los dominios de tirosina kinasa para iniciar una transfosforilación secuencial de al menos 6 residuos de tirosina. Este proceso activa a la fosfolipasa C (PLC) la cual cataliza la formación de diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP3). DAG activa a la proteína kinasa C (PKC) que, a través de vía de las MAPK, incrementa la fosforilación de Runx2 y con ello la osteoblastogénesis. Además, MAPK activa a la proteína de señal extracelular regulada por kinasas 1/2 (ERK), que se traslada al núcleo, se une a la proteína inhibidora de Runx2 (ERF) y la exporta al citoplasma, aumentando la osteogénesis²⁸ (véase Figura 4).

La osteogénesis es suprimida por la unión de miR-214, miR-223 y miR-338 al receptor FGFR1/2,^{1,44} por miR-21 que se une al ARNm del homólogo Sprouty 1 (SPRY1) e inhibe la activación en cascada de las MAPKs y con ello la activación de Runx2,²⁷ y por la unión de miR-483 al ARNm de ERK1; en este último caso se promueve al mismo tiempo la adipogénesis.⁴⁵

La señal de Notch mantiene un balance entre la proliferación y diferenciación celular. La activación de la señal de Notch induce la rotura proteolítica de su receptor, liberando su dominio intracelular (NICD) que puede trasladarse al núcleo donde, junto al factor de unión a Core α 1 (CBFA1), induce la transcripción de dos factores, HES y HEY, que regulan negativamente a Runx 2;²⁹ miR-34b y miR-34c modulan la señal de Notch2 generando la disminución en la producción osteoblástica de OPG y al mismo tiempo aumentan la de RANKL, mientras que miR-34a disminuye la osteoblastogénesis al bloquear a Jagged1 (Jag 1).^{33,40}

La unión del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) con su receptor específico de tirosina kinasa (IGF-1R) genera la dimerización y autofosforilación en forma secuencial de sus 6 dominios tirosina kinasa. La fosforilación de los residuos tirosina 677 y 766 des-

encadenan una fosforilación en cascada que incluye la activación de la fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) que, a su vez, cataliza la fosforilación del fosfatidil inositol difosfato (PIP2) a trifosfato (PIP3). Este último, activa a la proteína kinasa B (Akt) y esta, a su vez, a mTOR, favoreciendo la supervivencia del OBL. Por su parte, PIP3 inhibe a FOXO1 que no puede trasladarse al núcleo, por lo cual se ve inhibida la síntesis de osteocalcina, FGF y Runx2²⁹ (véase Figura 4).

Asimismo, miR-223 y miR-497 se unen al IGF-1R y promueven la apoptosis del OBL.⁴⁴ En particular, la expresión de miR-223 inducida por productos de glicosilación avanzada (AGE) es el que determina la apoptosis del OBL en diabetes mellitus.⁴⁴ La diferenciación osteoblástica es estimulada por miR-216a que desregula negativamente al inhibidor de PI3K denominado linfoma de linaje B-Casitas (c-Cbl); por miR-92a que se expresa tempranamente en células osteoprogenitoras activando la señal PI3K/Akt y por miR-378 que activa a esta última vía, bajo condiciones de altos niveles de glucosa.^{10,36} Contrariamente, la diferenciación osteoblástica es suprimida por miR-182 a través de la inhibición de FOXO1.³⁸

En paralelo con la diferenciación osteoblástica disminuye la expresión de miR-206^{38,46}, que inhibe la expresión de la enzima glutaminasa, mediante la unión directa a su ARNm. Este hecho altera el metabolismo de la glutamina y suprime la osteoblastogénesis.⁴⁶ El proceso de secreción de osteoide y mineralización también se encuentra regulado. En este sentido, el aumento en la expresión de miR-29b inhibe la síntesis de colágeno y promueve la mineralización.²⁷

Micro-ARNs implicados en la regulación del factor de transcripción Runx2

Todos los pasos de osteoblastogénesis convergen en el factor de transcripción clave de la diferenciación osteoblástica Runx2 y en su cofactor, la proteína de unión a la secuen-

cia especial rica en ATS 2 (SATB2). Runx2 suprime la proliferación del pre-OBL y promueve la expresión de otros genes que favorecen la diferenciación a OBLs maduros.^{24,28}

Todos los miARNs que desregulen negativamente estos factores llevarán a la inhibición de la osteogénesis. Una serie de miARNs, entre los cuales se encuentran miR-23b, miR-30c, miR-103a, miR-133, miR-135a, miR-137, miR-204/211, miR-205, miR-217, miR-222, miR-338, miR-628 y miR-3077 se unen al ARNm de Runx2 determinando la inhibición de la osteoblastogénesis *in vitro* y dando lugar a la pérdida de masa ósea *in vivo*.⁴⁷ En particular, miR-137 es mecanosensible, por lo que favorece la diferenciación del OBL en condiciones de falta de carga mecánica. En pacientes con fracturas que no consolidan se observa un aumento en la expresión de miR-628. La deficiencia estrogénica estimula la expresión de miR-3077 en ratones ovariectomizados (OVX) debido a la activación del factor nuclear kB (NF-kB).²⁹

Otros miARNs que afectan la actividad de Runx2 son: miR-10b, miR-29a, miR-29b, miR-194, miR-764 y miR-2861. En particular, la disminución en la expresión de Runx2 es ejercida por la sobreexpresión de miR-10b que activa a STAT1 o por el silenciamiento de miR-2861.²⁹ Contrariamente, la regulación positiva de Runx2 y, por lo tanto, la osteoblastogénesis es activada por miR-194, que disminuye los niveles de STAT1, o por miR-29a, miR-29b, miR-764 y miR-2861 los cuales, a través de diferentes vías, previenen la degradación de Runx2.³⁷

SATB-2 es una proteína de unión al ADN que regula específicamente, a nivel transcripcional, la diferenciación de genes osteoblásticos, induciendo la regeneración ósea. miR-33 y miR-34b se unen al ARNm de SATB-2 y bloquean la señal de diferenciación osteogénica. Asimismo, la expresión de miR-23a, miR-24, miR-31 y miR-34c bloquean la señal de diferenciación de OBL y osteocitos, uniéndose directamente a los ARNm de Runx2 y SATB-2.

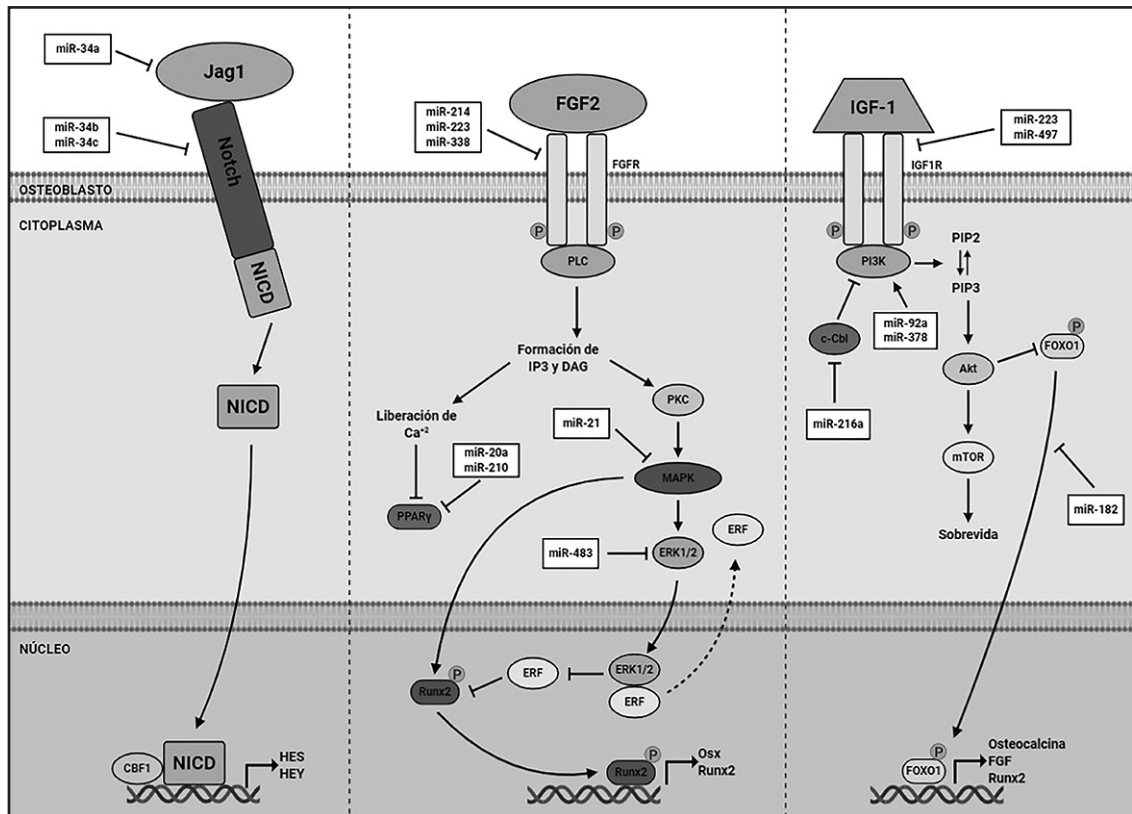


Figura 4. MicroARNs (miARNs) implicados en las vías Notch, FGF e IGF-1. Jagger 1 (Jag1) activa la señal de Notch liberando su dominio intracelular (NICD). Este dominio, en el núcleo, induce la expresión de los factores HES y HEY. Los miARNs que bloquean esta vía son miR-: 34a y 34b/c. La unión FGF2/FGFR activa a la fosfolipasa c (PLC), generando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). DAG activa la kinasa C (PKC) e incrementa la osteogénesis; además activa a ERK que exporta el citoplasma a la proteína inhibidora de Runx2 (ERF), aumentando la osteogénesis. La vía de FGF2 se encuentra bloqueada por miR-: 214, 223, 3385, 21 y 483. La interacción entre el factor de crecimiento insulínico símil (IGF-1)/receptor (IGF-1R) inicia una cascada de fosforilación que activa a fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) que transforma al fosfatidilinositol difosfato (PIP2) en trifosfato (PIP3), activando la proteína kinasa B (Akt) y esta a mTOR favoreciendo la sobrevivida de los osteoblastos e inhibiendo a FOXO1. El factor linfoma de linaje de Casitas B (c-Cbl) actúa como represor de la vía. Esta vía está bloqueada por miR-: 223, 497 y 182. Esta vía es estimulada por miR-: 216a, 92a y 378.

Por otro lado, la señal Runx2/SATB-2 activa la expresión Osx y con ello la diferenciación de OBL y osteocitos, pero también el proceso de mineralización y formación ósea. La expresión de miR-31 reduce la estabilidad del ARNm para Osx inhibiendo la mineralización.

Otros miARN como miR-63, miR-93, miR-96, miR-125b y miR-135b inhiben la expresión de Osx, uniéndose directamente y degradando su ARNm.²⁹

Micro-ARNs y osteoclastogénesis

Los OCLs derivan de un precursor monoci-

to/macrófago que se diferencia a pre-OCLs.²⁴ La información acerca de la participación de los miARNs en la osteoclastogénesis es más limitada.²⁷ Sin embargo, la inactivación de Dicer genera una disminución en la formación de OCL y conduce a una disminución en la actividad resortiva y el desarrollo de osteopetrosis, sugiriendo un control del proceso por parte de los miARNs.⁴³

Los dos pasos principales del proceso de osteoclastogénesis involucran al sistema RANK/RANKL y al sistema del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)/receptor 1 del factor estimulante de colonias de macrófagos (C-FMS). Aunque menos estudiados, se ha demostrado que una serie de miARN también actúan sobre las distintas vías de la osteoclastogénesis. Las Tablas 3 y 4 resumen los miARN que estimulan y que suprimen la osteoclastogénesis, respectivamente. *Micro-ARNs implicados en la vía de señalización RANK/RANKL*

El sistema RANK/RANKL/OPG es el principal regulador de la diferenciación y activación de OCL, luego de que la parathormona o el calcitriol estimulen la producción de RANKL por los OBLs.²⁴ La OPG actúa como un receptor trampa que limita esta señal²⁴ (véase Figura 5). Los miARN que den lugar a variaciones en la expresión de RANKL u OPG por parte de OBL y de RANK por parte de OCL, modularán la diferenciación osteoclástica.

La expresión de miR-26a se incrementa en respuesta a la señal de RANKL favoreciendo la osteoclastogénesis.³⁹ En pre-OCL, la diferenciación osteoclástica es suprimida mediante la expresión de miR-335 y miR-338 que regulan negativamente a RANKL;⁴⁸ contrariamente, miR-145 incrementa la relación RANKL/OPG favoreciendo la osteoclastogénesis.²⁹ Los estrógenos suprimen a miR-145 disminuyendo la diferenciación osteoclástica.²⁹ Por otra parte, la expresión de RANK en OCL es regulada negativamente por miR-503 y con ello su diferenciación.^{31,39}

Tabla 3. MicroARNs que estimulan la osteoclastogénesis.

miARN	Blanco	Vía	Modelo experimental	Tipo de estudio	Referencias
miR26a	RANKL	RANK	mBM-MMs	<i>In vitro</i>	27 29 36 39
miR-29c	NFIA, calcitonina	M-CSF	RAW264.7, mBMMs	<i>In vitro</i>	29
miR-34c	GSK3-β	LGR4	RAW264.7, 293T	<i>In vitro</i>	51
miR-99b	IGF-1R	IGF	hPBMCs	<i>In vitro</i>	29
miR-133	IFN-γ	RANK	hPBMCs, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	1 29 39
miR-145	OPG	RANK	MG-63	<i>In vitro</i>	29
miR-148a	NFATC1, c-Fos y MITF	RANK	hPBMCs, ratones C57BL/6, muestras de sangre	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	27 29 33 36 39
miR-214	TRAF3	RANK y M-CSF	RAW264.7, ratones C57BL/6J y miR-214-3p flox/-C57BL/6J	<i>In vitro, In vivo</i>	27 29 36 52
	Pten	RANK y M-CSF	mBMMs, OC-TG214, ratones C57BL/6J y OC-TG214	<i>In vitro, In vivo</i>	29 52
miR-223	NF1A e IKKα	RANK	RAW264.7, ratones DBA/1, muestras de tejido sinovial	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	11 25 27 29 33 37 38 43
	NFIA	M-CSF	mM-CSF	<i>In vitro</i>	43



Tabla 4. MicroARNs que inhiben la osteoclastogénesis.

miARN	Blanco	Vía	Modelo experimental	Tipo de estudio	Referencias
miR-7b	DC-STAMP	Interacción celular	RAW264.7,	<i>In vitro, Clínico</i>	27 29
miR-9b, miR-181a y miR-422a	c-CBL	Apoptosis	mOCs, muestras de sangre RAW264.7, mBMMs, mOCs, ratones C57BL/6, muestras de sangre	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	1 29 39
miR-21	c-Fos	RANK	hBM-MMs, ratones C57BL/6 y miR-21 ^{-/-}	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	11 1 25 27 29 33 37 38 43 39
miR-29b	RANKL y M-CSF	RANK y M-CSF	hPBMCs	<i>In vitro</i>	29
	MMP2	RANK, degradación de matriz	hPBMCs	<i>In vitro</i>	29 33 39
miR-124	NFAT-c1	RANK	mBMMs, muestras de sangre	<i>In vitro, Clínico</i>	27 29 39 54
	Rab27a	MAPKs	mBMMs, ratones C57BL/6J	<i>In vitro, In vivo</i>	54
	IL-11	Inflamación	RAW264.7, MC3T3-E1, ratones nude	<i>In vitro, In vivo</i>	29
miR-125a y miR-146a	TRAF6	RANK	hPBMCs	<i>In vitro</i>	27 29 33 39
miR-126 y miR-532	MMP13	Degradación de matriz	mBMMs, GCTSC, UMR 106-01	<i>In vitro</i>	29 53
miR-142	IL-6	Inflamación	mPBMCs	<i>In vitro</i>	29 31
miR-155	MIF	RANK, M-CSF	RAW264.7, mBMMs	<i>In vitro</i>	1 25 27 29 33 37 39
miR-186	CATK	Degradación de matriz	RAW264.7, mBMMs, ratones C57BL/6J, muestras de sangre	<i>In vitro, In vivo, clínico</i>	29
miR-204/211	IL-11	Inflamación	MSCs	<i>In vitro</i>	29
miR-218 y miR-618	NF-κB	RANK	RAW264.7	<i>In vitro</i>	29
miR-222	c-Src	RANK	RAW264.7	<i>In vitro</i>	29 49
miR-335 y miR-338	RANKL	RANK	mPBMCs, ratones NOD/SCID	<i>In vitro, In vivo</i>	29 48
miR-365	MMP9	Degradación de matriz	mOBs, MC3T3-E1, ratones C57BL/6J	<i>In vitro, In vivo</i>	29
miR-503	RANK	RANK	hPBMCs, ratones C57BL/6, muestras de sangre	<i>In vitro, In vivo, Clínico</i>	27 29 36 39

La unión de RANKL a RANK desencadena una señal de transducción en cascada, principalmente de la proteína adaptadora asociada al receptor de TNF 6 (TRAF6), el que a su vez activa a la kinasa Kappa B (IKK), a las MAPKs: MAP2K1/MEK1, MAP2K6/MKK6 y MAP2K7/MKK7, al protooncogén tirosina-proteína ki-

nasa (c-Src) y a PLC²⁴ (véase Figura 5). Por su parte, miR-125a y miR-146a se unen directamente al ARNm de TRAF6 suprimiendo, tanto la diferenciación de pre-OCL como la formación de OCL multinucleados.^{33,39}

IKK fosforila al inhibidor de NF-κB (IKB) y lo degrada, activando consecuentemente a

NF- κ B.²⁴ Al producirse la activación de NF- κ B se suprime la función del promotor de miR-29b, con lo cual su expresión disminuye progresivamente durante la diferenciación osteoclástica inducida por RANKL y M-CSF.²⁹ En osteoporosis posmenopáusica se observa que la expresión de miR-218 y miR-618 está inhibida, con lo cual se activan NF- κ B y la osteoclastogénesis,²⁹ y miR-223 suprime también el proceso uniéndose a IKK α .³⁹

La MAPK MKK6 activa a una kinasa p38 (p38K), la cual aumenta la expresión del factor de transcripción asociado a microftalmia (MIFT), fundamental para activar la expresión de genes osteoclásticos como los de catepsina K (CATK) y fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). El miR-155 se une al ARNm de MIFT favoreciendo la diferenciación hacia macrófagos e inhibiendo la resorción ósea^{27,43} (véase Figura 5).

La interacción de c-Src y TRAF6 estimula la vía PI3K/Akt/blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) inhibiendo proteínas proapoptóticas, lo cual conduce a la supervivencia de los OCLs.²⁴ El miR-222 disminuye el ARNm de c-Src en pre-OCLs, generando un efecto inhibitorio de la osteoclastogénesis activada por RANKL⁴⁹ (véase Figura 5).

Todos los pasos antes mencionados convergen en la activación de NFAT-c1, a través de la formación de un complejo entre NF- κ B y el dímero activador de proteínas 1 (AP1) (compuesto por c-Fos y c-Jun)²⁴ (véase Figura 5). Esta es la principal vía reguladora de la transcripción de genes específicos de OCLs como TRAP, CATK y metaloproteasas (MMP) como la MMP9, MMP13, etc.²⁴ La diferenciación osteoclástica es inhibida por miR-124 que suprime la expresión de NFAT-c1 uniéndose a su ARNm; por miR-21 que desregula el ARNm de c-Fos, inhibiendo la formación de AP1 y la transcripción de NFAT-c1.^{29,39} Contrariamente, miR-148a favorece la diferenciación de OCL al bloquear los represores de la transcripción de NFAT-c1, c-Fos y MITF.^{27,36}

Varias investigaciones recientes han demostrado que el sistema RANK/RANKL/OPG

cuenta con un nuevo integrante denominado receptor 4 acoplado a proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR4).⁵⁰ Durante años se creyó que RANK era el único receptor de RANKL; sin embargo, se ha demostrado que LGR4 actúa como receptor de dicho ligando, compitiendo con RANK e inhibiendo su señal, lo cual conduce a una inhibición de la osteoclastogénesis y la resorción ósea.⁵⁰ La interacción RANKL/LGR4 desencadena una serie de señales en cadena que comienza con la activación de la proteína G α subunidad α (G α_q) que, a su vez, inhibe la fosforilación de GSK3- β . Este hecho impide la translocación nuclear de NFAT-c1 evitando la formación del complejo nuclear con NF- κ B y AP1 y, consecuentemente, la transcripción de genes específicos de los OCL.^{50,51} La expresión de LGR4 se encuentra regulada negativamente por miR-34c que promueve la fosforilación de GSK3- β , estimulando la osteoclastogénesis.⁵¹

Micro-ARNs implicados en la vía de señalización osteoclastogénica M-CSF/C-FMS

La interacción de M-CSF y su receptor c-FMS asegura la supervivencia del OCL mediante la activación de la proteína kinasa MEK1 que aumenta la señal de RANKL, activando por un lado la cascada de señalización de ERK 1/2 y, por el otro, la vía de PI3K/Akt/mTOR (véase Figura 5). Este último paso es estimulado por miR-214, que se sobreexpresa en macrófagos de la médula ósea cuando la osteoclastogénesis es inducida por M-CSF y RANKL, al disminuir la expresión de Pten, inhibidor de la vía.⁵² La inhibición *in vitro* de miR-214 disminuye la producción de TRAP, MMP9, canal de cloro 7 (CLC7) y CATK, mientras que la sobreexpresión *in vivo* de este miARN reduce la DMO en ratones.⁵² Asimismo, miR-214 induce la diferenciación osteoclástica al unirse al ARNm de TRAF3, activando la vía canónica y no canónica de la señal de NF- κ B.⁵² La diferenciación de OCL también es promovida por miR-29c y miR-223,⁴³ que inhiben al factor nuclear I A (NFIA), regulador negativo

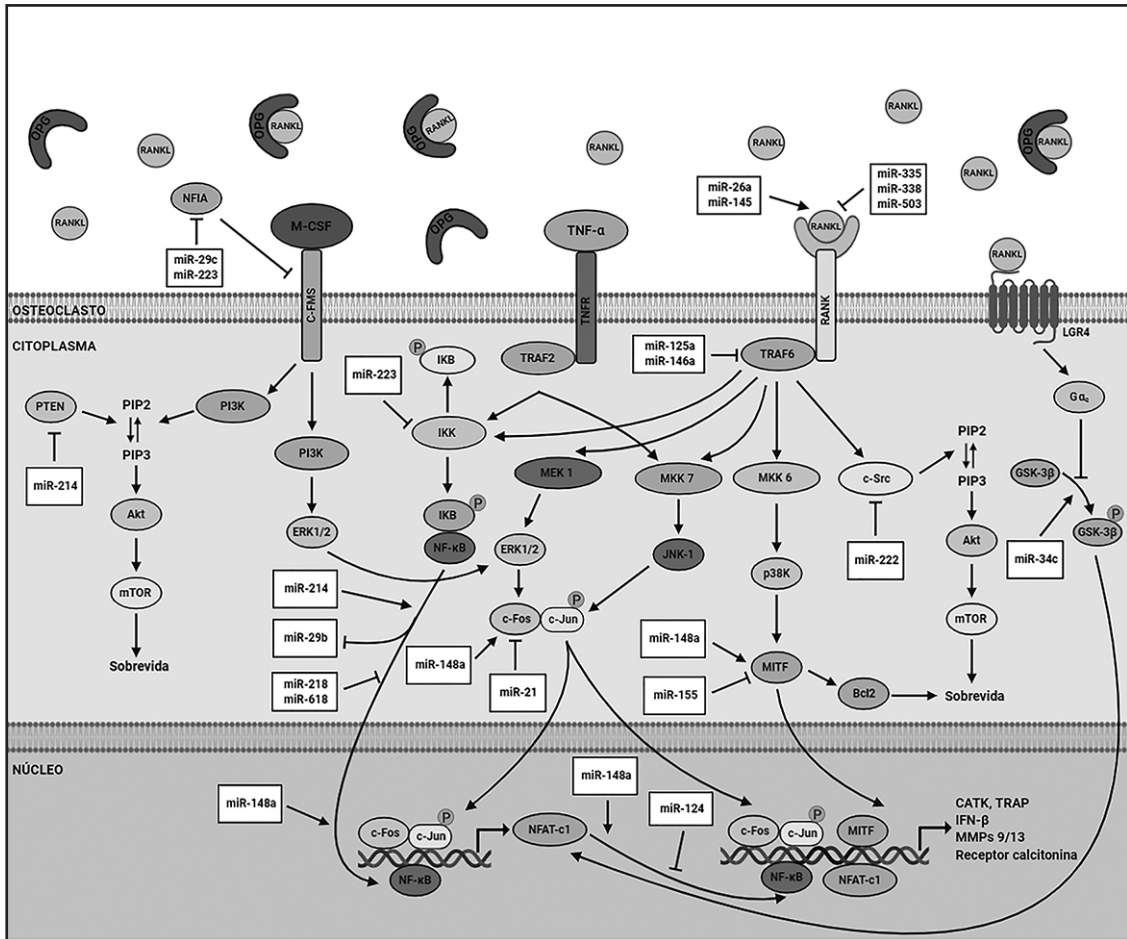


Figura 5. MicroARNs (miARNs) implicados en la osteoclastogénesis. La unión del receptor activador del factor nuclear κ B (RANK) y su ligando (RANKL) desencadena la señal de la proteína adaptadora asociada al receptor de TNF 6 (TRAF6), activando a la kinasa Kappa B (IKK), las MAPK (MAP2K1/MEK1, MAP2K6/MKK6 y MAP2K7/MKK7), al protooncogén tirosina proteína kinasa (c-Src) y a PLC. IKK degrada al inhibidor de NF- κ B (I κ B). MAPK MKK6 activa la kinasa p38 (p38K), que estimula al factor de transcripción asociado a microftalmia (MIF). Todos estos pasos activan a NFAT-c1, que junto a NF- κ B, c-Fos, c-Jun y MIF regula la expresión de genes específicos de osteoclastos. LGR4 actúa como un nuevo receptor de RANKL, compite por RANK e inhibe su señal y la osteoclastogénesis.

Los miARN que bloquean la señal RANK/RANKL son miR-: 335, 338, 503, 125a, 146a, 222, 155, 223, 218, 618, 21 y 124. Los miARNs que estimulan la osteoclastogénesis son miR-: 26a, 145, 214, 148a y 34c. La activación de NF- κ B suprime la función del promotor y disminuye progresivamente a miR-29b durante la osteoclastogénesis.

La unión de M-CSF a su receptor c-FMS asegura la supervivencia de los osteoclastos, activando la señal de la kinasa MEK1 que transforma al fosfatidilinositol difosfato (PIP2) en trifosfato (PIP3) que favorece la supervivencia del osteoclasto. El factor nuclear I A (NFIA) y PTEN son reguladores negativos de la vía. Los miARN que inducen esta vía son miR-: 29c, 223 y 214.

de la osteoclastogénesis.²⁹ Este factor se encuentra implicado en la represión de C-FMS, por lo cual su inhibición amplifica la señal de M-CSF.²⁹

Otros micro-ARNs que influyen en la osteoclastogénesis

Las MMPs son enzimas que degradan la matriz ósea, liberando distintos factores solubles que favorecen la diferenciación osteoclástica. Varios miARNs inhiben la osteoclastogénesis al bloquear los ARNm de distintas MMPs. miR-29b inhibe la expresión de MMP2;²⁹ los miR-126 y miR-532 inhiben la de MMP13⁵³ y el miR-365 inhibe la de MMP9.²⁹

Otros miARNs modifican únicamente la expresión de genes específicos de la actividad del OCL. Por ejemplo, el miR-186 disminuye la expresión de CATK, sugiriendo su utilidad como posible agente terapéutico para controlar las osteopatías metabólicas relacionadas con una elevada resorción ósea.²⁹ La expresión del miR-124 reduce la actividad osteoclástica al inhibir la expresión de la proteína relacionada con RAS 27a (Rab27a), uno de los factores implicados en la activación de MAPKs.⁵⁴ La expresión de miR-7b inhibe la fusión de OCL para formar OCLs maduros.^{27,29}

Todo miARN que modifique señales de la regulación del ciclo celular, sobrevida o apoptosis celular influenciará la diferenciación del OCLs. miR-9b, miR-181a y miR-422a son reguladores negativos de la osteoclastogénesis, por lo cual su baja expresión favorece la sobrevida y actividad de OCLs.^{29,39} Las citoquinas y otros factores que actúen sobre estos pasos también influenciarán la diferenciación del OCLs. Por ejemplo, miR-29c favorece la diferenciación osteoclástica uniéndose al ARNm del receptor de calcitonina, lo cual favorece la liberación de Ca²⁺, desencadenante de la actividad del OCL.^{29,39} Las citoquinas proinflamatorias IL-1β, TNF-α, IL-17, IL-11 acti-

van la diferenciación del OCL favoreciendo la expresión tanto local como sistémica de RANKL en OBLs y células del sistema inmunitario. La unión de la IL-1β a su receptor activa a TRAF6 y con ello la señal osteoclastogénica. miR-124 y miR-204/211 se unen al ARNm de IL-11, disminuyen sus niveles y con ello la maduración y actividad del OCL.²⁹ El miR-99b aumenta la expresión de ARNm de IGF-1R y promueve la diferenciación osteoclástica.²⁹ El interferón gamma (IFNγ) es una citoquina antiinflamatoria que inhibe la actividad de c-Fos y a los OCLs. miR-133 inhibe esta vía y con ello activa la osteoclastogénesis. La expresión de miR-142 bloquea la diferenciación de OCLs al unirse al ARNm del gp130, que codifica para el receptor de IL6, importante citoquina para la diferenciación osteoclástica.³¹

Conclusiones

En esta revisión nos hemos centrado en la definición y el mecanismo general de los miARNs, así como en la influencia de alguno de ellos en la diferenciación, activación y apoptosis de los OBLs y OCLs a través de las principales vías de activación. La integridad del esqueleto depende de la actividad balanceada de ambas células, a través de los procesos de modelamiento durante el crecimiento y remodelamiento en edades más avanzadas. Con la edad disminuyen la diferenciación y actividad de los OBLs a partir de células mesenquimales con un desequilibrio hacia la formación de adipocitos. La disminución de estrógenos en la menopausia induce a una mayor resorción osteoclástica e incremento en el riesgo de fracturas. Los cambios en la expresión de los miARN son los que llevan a la modificación de todos estos procesos. Evidentemente, para los investigadores interesados en el impacto de los miARN en la actividad de las células óseas, el reto más importante, a largo plazo, sería identificar el número real de miARN actuantes, así como encontrar



los ARNm a los cuales regulan, con el fin de detallar su influencia sobre la homeostasis ósea y detallar cómo sus cambios participan en el desarrollo de osteopatías metabólicas. Este último conocimiento respecto de los cambios en la expresión de los miARNs hará posible su uso futuro como biomarcadores y como blancos terapéuticos.

Conflicto de intereses: las autoras declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: septiembre 2020

Aceptado: diciembre 2020

Referencias

1. 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.
2. Bauer D, Krege J, Lane N, 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.
3. Martínez SB, Cenarruzabeitia NV, San Martín JE, Canelas AC. La paradoja diabética: densidad mineral ósea y fractura en la diabetes tipo 2. *Endocrinol Nutr* 2016; 63:495-501.
4. De Guire V, Robitaille R, Tétreault N, et al. Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges. *Clin Biochem* 2013; 46:846-60.
5. Guo Z, Maki M, Ding R, Yang Y, Xiong, L. Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. *Sci Rep* 2014; 4:5150.
6. Moran Y, Agron M, Praher D, Technau U. The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. *Nat Ecol Evol* 2017; 1:1-8.
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136:215-33.
8. Pabón-Martínez YV. MicroARNs: una visión molecular. *Rev Univ Ind Santander Salud* 2011; 43:289-97.
9. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19:92-105.
10. Feng J, Xing W, Xie L. Regulatory roles of microRNAs in diabetes. *Int. J Mol Sci* 2016; 17:1729.
11. Xia Z, Chen C, Chen P, Xie H, Luo X. MicroRNAs and their roles in osteoclast differentiation. *Front Med* 2011; 5:414-9.
12. Huang W. MicroRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics. *Methods Mol Biol* 2017; 1617:57-67.
13. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. *Cancer J* 2008; 14:1-6.
14. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105:10513-8.
15. Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR. Circulating microRNAs as biomarkers in health and disease. *J Clin Diagn Res* 2012; 6:1791.
16. Blondal T, Nielsen SJ, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 2013; 59:S1-S6.
17. miRBase. <http://www.mirbase.org/summary.shtml?org=hsa>. Sep-2020.
18. Carthew RW. Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16:203-8.
19. Fareh M, Yeom K, Haagsma AC, et al. TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor

- microRNA in RNA-crowded environments. *Nat Commun* 2016; 7:1-11.
20. Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 2011; 93:1897-904.
 21. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123:631-40.
 22. Datta A, Ganguli S. The Interactomics of the RNA-Induced Silencing Complex. *Current trends in Bioinformatics: An Insight* 2018; 193-206.
 23. Kobayashi T, Lu J, Cobb BS, et al. Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105:1949-54.
 24. Bellido T, Plotkin LI, Bruzzaniti A. Bone cells. *Basic and applied bone biology* 2019; 37-55.
 25. Carpio-Cano D, Fabiola E, DeLa Cadena RA, Sawaya BE. HIV and bone disease: a perspective of the role of microRNAs in bone biology upon HIV infection. *J Osteoporos* 2013; 2013:571418.
 26. Hu R, Li H, Yang L, et al. Targeting miRNAs in osteoblast differentiation and bone formation. *Expert Opin Ther Targets* 2010; 14:1109-20.
 27. Chen J, Qiu M, Dou C, Cao Z, Dong S. MicroRNAs in bone balance and osteoporosis. *Drug Dev Res* 2015; 76:235-45.
 28. Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem* 2011; 112:750-55.
 29. Bellavia D, De Luca A, Carina V, et al. Deregulated miRNAs in bone health: Epigenetic roles in osteoporosis. *Bone* 2019; 122:52-75.
 30. Kureel J, John AA, Prakash R, Singh D. MiR 376c inhibits osteoblastogenesis by targeting Wnt3 and ARF-GEF-1-facilitated augmentation of beta-catenin transactivation. *J Cell Biochem* 2018; 119:3293-3303.
 31. Sonda N, Simonato F, Peranzoni E, et al. miR-142-3p prevents macrophage differentiation during cancer-induced myelopoiesis. *Immunity* 2013; 38:1236-49.
 32. Li B. MicroRNA regulation in osteogenic and adipogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells and its application in bone regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 2018; 13:26-30.
 33. van Wijnen AJ, Van de Peppel J, Van Leeuwen JP, et al. MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2013; 11:72-82.
 34. Guo D, Li Q, Lv Q, et al. MiR-27a targets sFRP1 in hFOB cells to regulate proliferation, apoptosis and differentiation. *PLoS One* 2014; 9:e91354.
 35. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016; 4:16009.
 36. Sun M, Zhou X, Chen L, et al. The regulatory roles of microRNAs in bone remodeling and perspectives as biomarkers in osteoporosis. *BioMed Res Int* 2016; 2016:1652417.
 37. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8:212-27.
 38. An JH, Ohn JH, Song JA, et al. Changes of microRNA profile and microRNA-mRNA regulatory network in bones of ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 2014; 29:644-56.
 39. Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L. The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. *RNA Biol* 2014; 11:1355-63.
 40. Peng S, Gao D, Gao C, et al. MicroRNAs regulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep* 2016; 14:623-9.
 41. Arumugam B, Balagangadharan K, Selvamurugan N. Syringic acid, a phenolic acid, promotes osteoblast differentiation by stimulation of Runx2 expression and targeting of Smad7 by miR-21 in mouse mesenchymal stem cells. *J Cell Commun Signal* 2018; 12:561-73.
 42. Liu M, Xiusheng H, Xiao X, Wang Y. Overexpression of miR-422a inhibits cell proliferation and invasion, and enhances chemosensitivity in osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2016; 36:3371-8.
 43. Sugatani T, Vacher J, Hruska KA. A microRNA



- expression signature of osteoclastogenesis. *Blood J Am Soc Hematol* 2011; 117:3648-57.
44. Qin Y, Ye J, Wang P, Gao L, Wang S, Shen H. miR-223 contributes to the AGE-promoted apoptosis via down-regulating insulin-like growth factor 1 receptor in osteoblasts. *Biosci Rep* 2016; 36:e00314.
 45. Chen K, He H, Xie Y, et al. miR-125a-3p and miR-483-5p promote adipogenesis via suppressing the RhoA/ROCK1/ERK1/2 pathway in multiple symmetric lipomatosis. *Sci Rep* 2015; 5:1-15.
 46. Chen Y, Yang Y, Fan X, et al. miR-206 inhibits osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by targeting glutaminase. *Biosci Rep* 2019; 39:BSR20181108.
 47. Zhang Y, Xie R, Gordon J, et al. Control of mesenchymal lineage progression by microRNAs targeting skeletal gene regulators Trps1 and Runx2. *J Biol Chem* 2012; 287:21926-35.
 48. Zhang XH, Geng GL, Su B, et al. MicroRNA-338-3p inhibits glucocorticoid-induced osteoclast formation through RANKL targeting. *Genet Mol Res* 2016; 15.
 49. Takigawa S, Chen A, Wan Q, et al. Role of miR-222-3p in c-Src-mediated regulation of osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci* 2016; 17:240.
 50. Luo J, Yang Z, Ma Y, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat Med* 2016; 22:539-46.
 51. Cong F, Wu N, Tian X, et al. MicroRNA-34c promotes osteoclast differentiation through targeting LGR4. *Gene* 2017; 610:1-8.
 52. Zhao C, Sun W, Zang P, et al. miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway. *RNA Biol* 2015; 12:343-53.
 53. Mohanakrishnan V, Balasubramanian A, Mahalingam G, et al. Parathyroid hormone-induced down-regulation of miR-532-5p for matrix metalloproteinase-13 expression in rat osteoblasts. *J Cell Biochem* 2018; 119:6181-93.
 54. 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.
 55. Guo Q, Chen Y, Guo L, Jiang T, Lin Z. miR-23a/b regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Bone Res* 2016; 4:16022.
 56. Wang Y, Li L, Moore BT, et al. MiR-133a in human circulating monocytes: a potential biomarker associated with postmenopausal osteoporosis. *PloS One* 2012; 7:e34641.
 57. Kim KM, Park SJ, Jung S, et al. miR-182 is a negative regulator of osteoblast proliferation, differentiation, and skeletogenesis through targeting FoxO1. *J Bone Miner Res* 2012; 27:1669-79.
 58. Gámez B, Rodríguez-Carballo E, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. MicroRNA-322 (miR-322) and its target protein Tob2 modulate Osterix (Osx) mRNA stability. *J Biol Chem* 2013; 288:14264-75.