

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA  
FACULTAD DE MEDICINA



# **PAPEL DE LOS MICRO-ARNs EN ENFERMEDADES DEL METABOLISMO ÓSEO**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

Pablo Garmilla Ezquerro

Bajo la dirección del doctor

José Antonio Riancho Moral

**Tesis doctoral**  
Santander, 2014



JOSÉ ANTONIO RIANCHO MORAL, Catedrático de Medicina del Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Universidad de Cantabria, CERTIFICO:

Que Pablo Garmilla Ezquerro ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado: PAPEL DE LOS MICRO-ARNs EN ENFERMEDADES DEL METABOLISMO OSEO. Este es un estudio original y en mi opinión reúne méritos para ser presentado como tesis para obtener el grado de doctor.

Santander, 4 de Marzo de 2014.

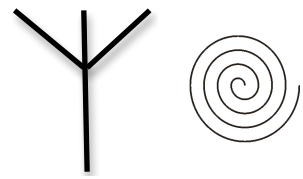


“Corto y hábil es el sendero de la especulación, pero no conduce  
a ninguna parte; largo y penoso es el camino del experimento,  
pero nos lleva a conocer la verdad”

*Galeno (Siglo II d.C)*



A mi familia







## AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar este trabajo esta dedicado a mi director de tesis Jose Antonio Riancho Moral. Sin ti esto no hubiera sido posible. Gracias por hacerme crecer como medico, por apoyarme y motivarme en todo lo que hice a tu lado. Gracias a Carolina, Jana y Jesús, por toda vuestra ayuda y comprensión, por sacarme una sonrisa entre pipeta y pipeta o cuando no salían los resultados. Espero no haberos vuelto muy locos. Gracias al resto del equipo de Medicina Interna y adjuntos de otras especialidades con los que he tenido grandes momentos y aprendizajes. Gracias al servicio de Traumatología y Ortopedia por su colaboración en este estudio. Gracias a Fernando, Marta y Samuel. Gracias a mis amigos por hacer que lo bueno sea lo mejor y lo malo sea bueno. Gracias a mi familia por formarme como persona, por empujarme hacia delante cuando lo he necesitado y por haberme hecho llegar hasta donde he llegado, sin vosotros no sería yo. Gracias a todas esas personas que me ayudaron y que me ayudan día a día con su apoyo y cariño.



# Índice



## ÍNDICE

Pág.

ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1. TEJIDO ÓSEO.....	29
1.1.1. Matriz extracelular.....	29
1.1.2. Células especializadas.....	30
1.1.2.1. Células osteoprogenitoras .....	30
1.1.2.2. Osteoblastos.....	34
1.1.2.3. Osteocitos.....	36
1.1.2.4. Osteoclastos .....	37
1.2. REMODELADO Y MODELADO ÓSEO .....	38
1.3. ENFERMEDADES ÓSEAS.....	40
1.3.1. OSTEOPOROSIS.....	40
1.3.2. ARTROSIS.....	42
1.4. GENÉTICA Y EPIGENÉTICA.....	42
1.4.1. MicroARN.....	45
1.4.1.1. Aspectos generales .....	45
1.4.1.2. Síntesis de microARN.....	47
1.4.2. MicroARNs y enfermedades óseas.....	50
1.4.2.1. MicroARNs y diferenciación osteoblástica.....	50
1.4.2.2. MicroARNs inhibidores de la osteogénesis.....	50
1.4.2.3. MicroARNs estimuladores de la osteogénesis.....	54
1.4.2.4. MicroARNs y diferenciación osteoclástica.....	57

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	61
2.1. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	63
2.2. HIPÓTESIS.....	65
2.3. OBJETIVOS.....	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
3.1. Fases del estudio.....	69
3.2. Pacientes, muestras de hueso y de suero.....	69
3.3. Variables del estudio.....	70
3.4. Técnicas.....	71
3.4.1. Análisis de las diferencias de los niveles de microARNs en hueso.....	71
3.4.1.1. Procesamiento de las muestras.....	71
3.4.1.2. Fases.....	72
3.4.2. Análisis de las diferencias de los niveles de microARNs en suero.....	75
3.4.2.1. Procesamiento de las muestras.....	75
3.4.3. Análisis de la producción in vitro de los microARNs y su influencia sobre otros genes.....	76
3.4.3.1. Cultivos celulares.....	76
3.4.3.2. Aislamiento de microARNs.....	77
3.4.3.3. Análisis de las diferencias en la expresión de genes osteoblásticos en relación con los microARNs seleccionados.....	77
3.5. Análisis estadístico.....	78

4. RESULTADOS.....	81
4.1. ANÁLISIS DE MINIARRAYS EN HUESO.....	83
4.1.1. Características de la muestra.....	83
4.1.2. Análisis de los microARNs.....	83
4.2. ANÁLISIS DE LOS MICROARNs EN HUESO.....	97
4.2.1. Características de la muestra.....	97
4.2.2. Análisis de los microARNs.....	99
4.3. ANÁLISIS DE LOS MICROARNs EN SUERO.....	120
4.3.1. Características de la muestra.....	120
4.3.2. Análisis de los microARNs.....	120
4.4. ANÁLISIS DE MICROARNs EN CULTIVOS PRIMARIOS DE OSTEOLASTOS.....	124
4.4.1. Características de la muestra.....	124
4.4.2. microARNs analizados.....	124
4.4.3. Análisis de resultados.....	124
4.5. EFECTO DE LOS MICROARNs SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES PROPIOS DE LOS OSTEOLASTOS.....	126
4.5.1. Características de la muestra.....	126
4.5.2. Análisis de resultados.....	126
5. DISCUSIÓN.....	131
5.1. Expresión diferencial de microARNs: barrido inicial.....	133
5.2. Asociación de microARNs con enfermedades esqueléticas.....	143

5.3. Expresión diferencial de microARNs en enfermedades óseas: situación actual .....	150
5.4. Fortaleza y limitaciones del estudio.....	154
5.5. Perspectivas.....	155
6. CONCLUSIONES.....	157
7. BIBLIOGRAFÍA.....	161
8. ANEXOS.....	177



# Abreviaturas



## ABREVIATURAS

AcvR1b	Receptor tipo 1B de la activina A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALPL	Fosfatasa alcalina
APC	Poliposis adenomatosa del colon
Arg-	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Asp-	Ácido aspártico
ATF4	Factor activador de la transcripción 4
$\beta$ -cat	Beta catenina
BMP2	Proteína morfogenética ósea 2
$\beta$ TrCP	Proteína que contiene la repetición $\beta$ -transducina
cADN	ADN complementario
CBFB	Factor aglutinante central B
CDH6	Cadherina 6
CEIC	Comité de Ética e Investigación Clínica
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CFU-F	Células formadoras de colonias de fibroblastos
CFU-M	Células formadoras de colonias de macrófagos
CHIP	C terminal de la proteína de interacción Hsc70
Ck	Caseína-cinasa
CpG	Dinucleotido citosina-guanina
CPM	Células precursoras mesenquimales
CTGF	Factores de crecimiento de tejido conectivo

CTNNBI	Gen codificante de Beta catenina
D	Ácido aspártico
DGCR8	Region critica de DiGeorge 8
Dkk	Dickkopf
Dlx5	Distal-Less Homebox-5
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco
DMO	Densidad mineral ósea
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
Dsh	Dishevelled
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
EEUU	Estados Unidos
EFNA4	Efrina A4
ERK1/2	Quinasas reguladas por señales extracelulares
Exp5	Exportina 5
FAK	Quinasa de adhesion focal
FCS	Suero de ternera fetal
FGF1	Factor de crecimiento de fibroblastos 1
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FGF3	Factor de crecimiento de fibroblastos 3
FoxO1	Forkhead cuadro O1 de proteína
Frat1	Frecuentemente reorganizado en linfomas avanzados de células T
G	Glicina
Gly-	Glicina
GSK3	Glucógeno sintetasa cinasa 3

HAT	Histona-acetil-transferasa
HDAC5	Histona-deacetilasa 5
HDACT	Histona-deacetil-transferasa
Hoxc8	Homebox C8
IGF1R	Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
Lifr	Receptor del factor inhibidor de la leucemia
LRP	Peptido relacionado con el receptor de lipoproteína
MAFB	Homólogo del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico
MAPK	Kinasas de proteínas activadas por mitógenos
MiARN	MicroARN
MyoD	Proteína de determinación de mioblastos
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
OPG	Osteoprotegerina
OSX	Osterix
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE	Prostaglandina E
PPAR $\gamma$ 2	Receptor activado por proliferador de peroxisoma $\gamma$ 2
PTH	Paratohormona
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
R	Arginina
RAN-GTP	Proteína nuclear relacionada con guanosina trifosfato

RANK	Receptor activador del factor nuclear $\kappa \beta$
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear $\kappa \beta$
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	PCR tras transcriptasa inversa
Runx2	Factor de transcripción 2 relacionado con Runt
SATB2	Proteína especial de unión 2 de secuencia rica AT
sFRP	Proteína soluble similar a frizzled
Smad	Homólogo del gen madres contra la decapentapleja
SOST	Gen codificante de esclerostina
Sox9	Sry tipo HMG box 9
TCF3	Factor transcriptor 3
TCF/LEF	Factor de transcripción/Factor de unión a enhancer de linfocitos
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral
TOB1	Transductor de ErbB 1
TOB2	Transductor de ErbB 2
TRAF6	Factor asociado al receptor del TNF
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
UTR3	Región 3 no traducida
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WISP1	Proteína secretada inducida por Wnt1
Wnt	Wnt ("Wingless")

# Resumen





## RESUMEN

### PAPEL DE LOS MICRO-ARNs EN ENFERMEDADES DEL METABOLISMO ÓSEO

La osteoporosis y la artrosis son enfermedades cada vez más prevalentes en nuestro medio debido al aumento de la esperanza de vida, estando muy influenciadas por factores ambientales y genéticos.

El objetivo de este estudio fue determinar la implicación de algunos mecanismos epigenéticos en estas enfermedades, mediante el análisis de expresión de microRNAs.

Hemos analizado los microARNs en muestras de hueso de sujetos con osteoporosis (n=8) y artrosis (n=8), determinando las diferencias de expresión en los microRNAs mediante arrays. Encontramos diferencias significativas entre los grupos en 9 de los microARNs analizados. Estos resultados fueron validados en un segundo análisis en el que incluimos muestras de hueso de sujetos con osteoporosis (n=19), artrosis (n=19) y controles (n=6). Analizamos la expresión de aquellos microARNs más destacados en los arrays, que fueron miR-187, miR-193a-3p, miR-210, miR-214 y miR-518f. Había una mayor expresión de miR-518f en pacientes con osteoporosis frente a controles y artrosis, mientras que miR-187 mostraba una mayor expresión en artrosis que en controles y pacientes con osteoporosis.

Aunque no hemos podido confirmar en cultivos celulares la funcionalidad de estos microARNs, estos resultados sugieren que miR-518f y miR-187 pueden estar implicados en la patogenia de algunas alteraciones esqueléticas como la osteoporosis y la artrosis.

*Palabras clave:* artrosis, epigenética, fracturas, hueso, microARN, miARN, osteoporosis, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, suero.

SUMMARY:

#### ROLE OF MICRO-RNAs IN METABOLISM BONE DISORDERS

The prevalence of osteoporosis and osteoarthritis is increasing in parallel with the increased life expectancy. They are determined by the interplay of environmental and genetic factors.

The aim of this study was to determine how epigenetic mechanisms are involved in these diseases, and specifically the analysis of expression of microRNAs.

We measured microRNAs in bone samples of patients with osteoporosis (n=8) and osteoarthritis (n=8), using mini-arrays. Significant between group differences were found in 9 of the microRNAs analyzed. These findings were replicated in a second analysis that included bone samples from subjects with osteoporosis (n=19), osteoarthritis (n=19) and controls (n=6). In the replication stage we analyzed the expression of the microRNAs showing the most significant differences in arrays: miR-187, miR-193a-3p, miR-210, miR-214 and miR-518f. We found that miR-518f displayed a significantly higher expression in patients with osteoporosis. On the other hand, miR-187 displayed a significantly higher expression in patients with osteoarthritis.

Although we could not confirm the functional effects of these microRNAs in vitro, our data suggest that miR-518f and miR-187 may participate in the pathogenesis of skeletal disorders, such as osteoporosis and osteoarthritis.

*Keywords:* osteoarthritis, epigenetic, fractures, bone, microRNA, miRNA, osteoporosis, osteoblasts, osteocytes, osteoclasts, serum

# Introducción



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es el principal sistema de sostén y protección de los organismos animales. Está en constante renovación a través de procesos de formación y resorción. Este es un tejido conectivo que consiste esencialmente en una matriz extracelular mineralizada y una fracción celular muy activa: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Sus funciones incluyen el sustento y protección de las partes blandas; el anclaje muscular que permite los movimientos; el ser reservorio de calcio, fósforo y otros elementos; y el alojamiento de las células precursoras de la hematopoyesis. En los últimos años están emergiendo otras funciones, como la regulación del metabolismo energético, cuya importancia real está por determinar.

#### 1.1.1. Matriz extracelular

El principal componente orgánico de la matriz es el colágeno tipo I, que supone alrededor del 90%; el 10% restante lo componen una serie de proteínas no estructurales de menor tamaño, entre las que se encuentran la osteocalcina, la osteonectina, algunas fosfoproteínas, sialoproteínas, factores de crecimiento y proteínas séricas. La fase inorgánica está compuesta por minúsculos cristales de un mineral de carácter alcalino, la hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ . Estos cristales se incrustan entre las fibras de colágeno para formar un material que reúne las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia.

## 1.1.2. Células especializadas

### 1.1.2.1. Células osteoprogenitoras

Son células pluripotenciales (células precursoras mesenquimales (CPM) o células formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F)). Pueden diferenciarse a osteoblastos, condroblastos, mioblastos, adipocitos y fibroblastos. En el esquema siguiente se señalan las posibles vías de diferenciación de las células precursoras mesenquimales y algunos de los genes clave en ese proceso (Fig. 1).

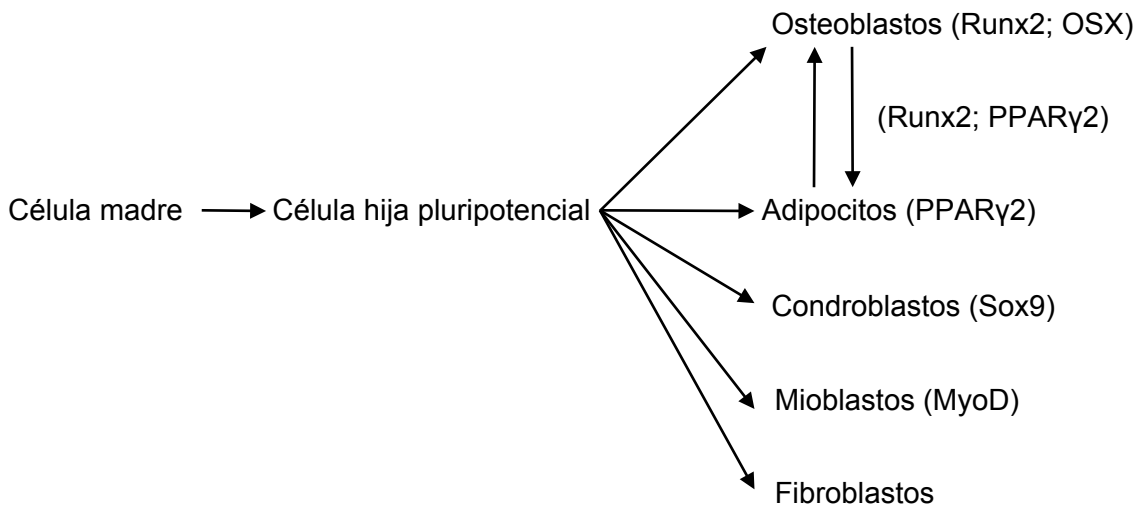


Fig. 1: Vías de diferenciación de las células precursoras mesenquimales. Runx2: Factor de transcripción 2 relacionado con Runt; OSX: Osterix; PPARγ2: Receptor activado por proliferador de peroxisoma γ2; Sox9: Sry tipo HMG box 9; MyoD: Proteína de determinación de mioblastos 1.

La diferenciación de las células madre pluripotenciales a los diferentes tipos de células depende de vías de señalización y reguladores de transcripción que funcionan como “interruptores” moleculares.

Una de estas vías de señalización es la vía Wnt (“wingless”). Esta vía no es exclusiva del hueso, ya que interviene en otros procesos de embriogénesis,

organogénesis y tumorigénesis (1). La activación de esta vía induce diversas señales intracelulares, principalmente en la vía canónica o clásica (la mejor conocida) y la vía no canónica. La Wnt/ $\beta$ -catenina (canónica) constituye un mecanismo esencial en la regulación del remodelado óseo, controlando la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de los osteoblastos. En condiciones normales, la  $\beta$ -catenina está interaccionando con un complejo proteico formado por la proteína de la poliposis adenomatosa del colon (APC), la glucógeno sintetasa cinasa (GSK3) y la axina. De esta forma se produce la fosforilación de la  $\beta$ -catenina, lo cual favorece su identificación por la  $\beta$ TrCP (Proteína que contiene la repetición  $\beta$ -transducina) ubiquitina y la degradación en los proteosomas, con lo que se mantienen bajos los niveles intracitoplasmáticos de  $\beta$ -catenina.

La activación de esta vía se produce cuando los ligandos Wnt se unen con el complejo de receptores *frizzled* (familia de receptores de membrana serpentinados con siete dominios) y co-receptores de la familia LRP (Peptido relacionado con el receptor de lipoproteína), que incluye al menos LRP4, LRP5 y LRP6. Esto produce una señal a través de la axina, Frat-1 (Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas) y proteínas Dsh (Dishevelled), que conduce a la ruptura del complejo proteico formado por la APC, GSK3, axina y  $\beta$ -catenina y evita la degradación proteosomal de la  $\beta$ -catenina, lo que favorece que se acumule en el citoplasma. Tras ello, la  $\beta$ -catenina penetra en el núcleo, donde se une a TCF/LEF (Factor de transcripción/Factor de unión a enhancer de linfocitos).

Otra vía importante en el hueso es la vía RANK-RANKL-OPG (Receptor activador del factor nuclear  $\kappa$   $\beta$  - Ligando del receptor activador del factor

nuclear  $\kappa\beta$  - Osteoprotegerin). RANKL es sintetizado por diversas células de la línea osteoblástica. Varios trabajos recientes apuntan que la fuente principal son los osteocitos. Sin embargo, hay otras células que también expresan RANKL, como es el caso de los osteoblastos y quizás otros elementos presentes en el estroma de la médula ósea. Los precursores de los osteoclastos expresan el receptor RANK. La unión del ligando RANKL a su receptor RANK es un potente estímulo para inducir la diferenciación de esos precursores hacia osteoclastos maduros. La unión de RANKL a RANK induce la expresión de TRAF-6 (factor asociado al receptor del TNF) y la activación de NF- $\kappa\beta$  (Factor nuclear kappa B), lo que induce la diferenciación de los precursores osteoclasticos y posiblemente un aumento de la actividad de los osteoclastos maduros.

Las células de estirpe osteoblástica producen otro modulador, la osteoprotegerina (OPG), que tiende a inhibir la actividad de esta vía. La OPG es una especie de “receptor señuelo”. Se une al RANKL y de esta manera evita que este se una al RANK y en consecuencia que induzca la diferenciación de los precursores osteoclasticos.

En general, la activación de la vía Wnt inhibe la formación de osteoclastos, puesto que tiende a disminuir la unión de RANKL a RANK por aumentar la producción de OPG. Por otro lado, el papel de la vía Wnt mejor conocido es la regulación de la actividad osteoblástica. In vitro se ha demostrado que la activación de esta vía induce un aumento de la supervivencia de los osteoblastos. Por el contrario, las proteínas inhibidoras de esta vía (como veremos a continuación), tienen un efecto negativo sobre la supervivencia y actividad de los osteoblastos.



Existen diversos inhibidores de la vía Wnt. En algunos casos se trata de moléculas que actúan como señuelos que se fijan a los ligandos Wnt y compiten así por su fijación al receptor. Es el caso de algunas proteínas solubles tipo *frizzled* que son segregadas al medio extracelular. Otra molécula inhibidora es la esclerostina, codificada por el gen SOST, que se expresa esencialmente en los osteocitos y en los condrocitos. La esclerostina parece fijarse a LRP5/6, impidiendo la formación del complejo LRP5/6-*frizzled*-Wnt. Otras moléculas capaces de antagonizar las señales Wnt por unirse a los co-receptores LRP5/6 y kremen son las de la familia Dkk (*Dickkopf*). Hay al menos cuatro miembros de esta familia, de los cuales el tipo 1 (Dkk-1) es especialmente importante en el hueso (Fig. 2) (2)(3)(4).

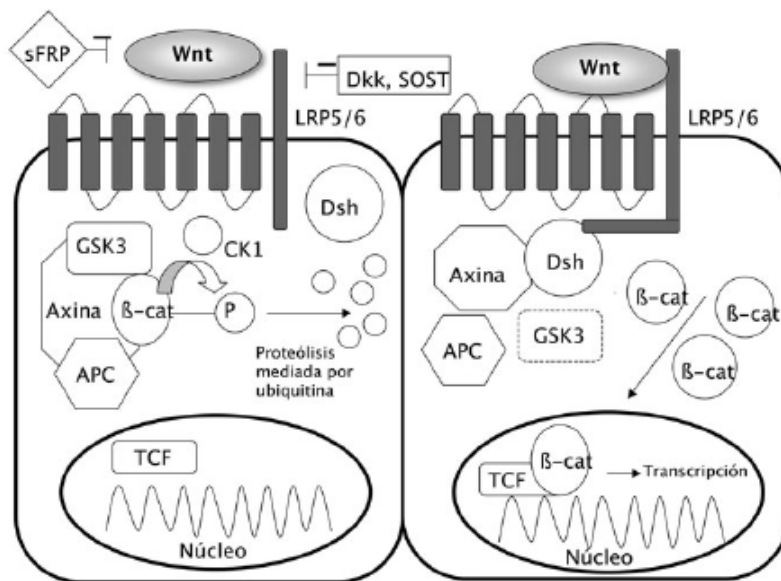


Fig. 2. Vía Wnt: Vía canónica: en ausencia de unión de los ligandos Wnt a su receptor (izquierda), la β-catenina se degrada y los genes no se transcriben. Sin embargo, cuando se activa la vía (derecha) disminuye la degradación de la β-catenina, con lo que se acumula en el citoplasma, desde donde puede entrar en el núcleo y activar los factores de transcripción. APC: proteína de la poliposis adenomatosa del colon; β-cat: β-catenina; cK: caseína-cinasa; Dsh: dishevelled; GSK3: glucógeno sintetasa cinasa 3β; sFRP: proteína soluble similar a frizzled; SOST: esclerostina. (Velasco J, Riancho JA. La vía Wnt y el hueso. REEMO.2008;17(1):5-9).

Otro de estos “interruptores” es BMP2 (proteína morfogenética ósea 2) una citoquina miembro de la superfamilia de TGF (Factor de crecimiento transformante), capaz de promover la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos in vitro e inducir la formación de hueso in vivo. El efecto de BMP2 está mediado por la activación de proteínas de la familia Smad (Homólogo del gen madres contra la decapentapleja), que controlan la transcripción de genes osteogénicos tales como la fosfatasa alcalina, el colágeno de tipo I, la osteocalcina y la sialoproteína. Además, BMP2 controla la expresión de Runx2 (Runt-related transcription factor 2) a través de Smad. Esto establece la importancia del eje BMP2-Smad-Runx2 en la osteoblastogénesis (5)(6). Por otro lado, algunos miembros de esta familia podrían tener efecto quimiotácticos sobre los monocitos, promover la diferenciación de los osteoclastos y prolongar su supervivencia.

#### 1.1.2.2. Osteoblastos

Derivan de las células mesenquimales pluripotenciales (7). Estos son ricos en fosfatasa alcalina y segregan colágeno tipo I y otras proteínas de la matriz ósea. Presentan receptores para muchas hormonas, incluyendo la paratohormona (PTH), la 1,25-dihidroxitamina D, las hormonas sexuales y los glucocorticoides. Las superficies óseas quiescentes están recubiertas por una capa de osteoblastos aplanados inactivos (células de revestimiento), formando así el endostio que separa la matriz ósea de la médula ósea y del periostio. Entre los osteoblastos y las células de revestimiento hay un estrecho contacto por medio de las cadherinas (moléculas de adhesión celular dependiente de calcio, que intervienen en el reconocimiento celular y la morfogénesis del tejido) (8).

La proliferación y diferenciación osteoblástica depende de un gran número de factores de transcripción, factores de crecimiento y hormonas. El conocimiento de estos factores de regulación proporcionan la base para comprender las bases moleculares de los trastornos del esqueleto.

Por ejemplo, la PTH estimula el crecimiento de las poblaciones de osteoprogenitores y al mismo tiempo inhibe la apoptosis de los osteoblastos y los osteocitos. Los glucocorticoides potencian la diferenciación osteoblástica de las células mesenquimales in vitro. Sin embargo, cuando se usan a dosis elevadas con fines terapéuticos ejercen efectos negativos sobre la formación ósea al inducir la apoptosis de los osteoblastos y los osteocitos. La vitamina D es un potente regulador de la expresión de muchos genes, incluyendo algunos que favorecen la diferenciación de osteoblastos (9)(10).

La vía de señalización MAPK (Kinasas de proteínas activadas por mitógenos) tiene especial importancia en la traducción de una amplia variedad de señales extracelulares que modulan la actividad osteoblástica, tales como las BMP, los ligandos Wnt no canónicos, PTH, TNF (Factor de necrosis tumoral), y FGFs (Factor de crecimiento de fibroblastos) (11). Como hemos explicado antes, el factor de transcripción Runx2/Cbfa1 es específico de osteoblastos y es imprescindible para la diferenciación (12)(13). Otro factor de transcripción específico de osteoblastos implicado en etapas más tardías de la diferenciación es Osterix, estando ambos regulados por BMP2 (5). El proceso de crecimiento y diferenciación de los osteoblastos se divide en varias fases: proliferación (con expresión de osteopontina, colágeno, TGF- $\beta$ ); maduración (se expresan fosfatasa alcalina, sialoproteína y colágeno) y mineralización (con expresión de osteocalcina, osteopontina, colagenasa)(Fig. 3).

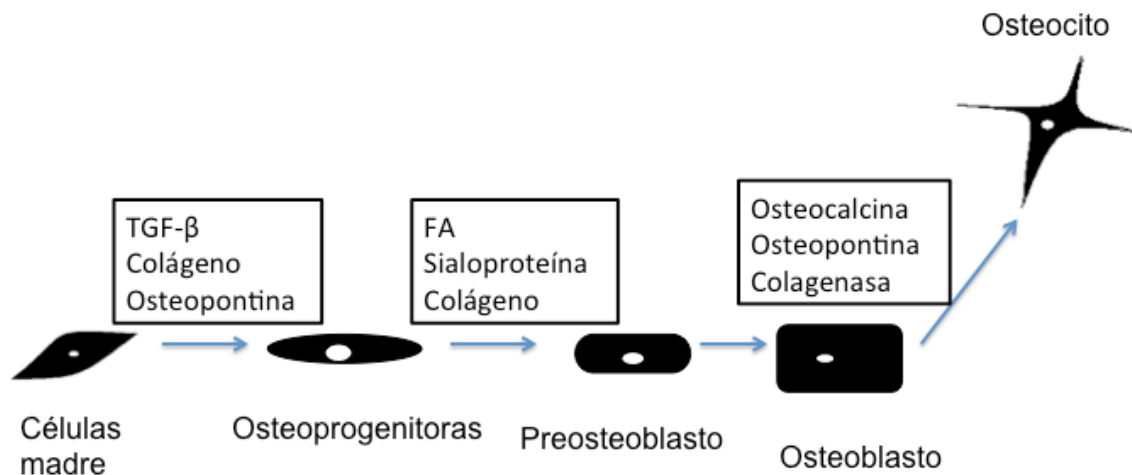


Fig. 3 Diferenciación osteoblástica.

### 1.1.2.3. Osteocitos

La mayor parte de los osteoblastos desaparecen al finalizar la síntesis de osteoide, posiblemente por un fenómeno de apoptosis o muerte celular programada. Algunos, sin embargo, quedan atrapados dentro de la matriz ósea (se estima que el 10-20% de los osteoblastos), transformándose en células de aspecto estrellado, conocidas como osteocitos (14). Su localización en el tejido óseo es ideal para detectar el estrés mecánico sobre el hueso y las microlesiones de la matriz. Los osteocitos se sitúan en lagunas y emiten prolongaciones celulares a través de canaliculos que les permiten la comunicación intercelular por medio de uniones tipo gap. Estas uniones están formados por dos hemicanales, cada uno de ellos integrado por seis moléculas de conexina (conexon). La conexina más abundante en el tejido óseo es la conexina 43, que tiene un papel importante para asegurar la viabilidad de los osteocitos y la capacidad de éstos para intervenir en la formación y la resorción óseas (15). Los osteocitos modulan la remodelación ósea por medio de la secreción de diversos factores, entre los que se encuentra la esclerostina

(proteína codificada por el gen SOST), que como se ha comentado anteriormente es un potente inhibidor de la formación ósea. Por otro lado, también expresan proteínas que modulan la formación y la actividad de los osteoclastos, tales como, RANKL y OPG, en respuesta a estímulos hormonales o mecánicos (16).

#### 1.1.2.4 Osteoclastos

Son células grandes, multinucleadas, ricas en anhidrasa carbónica y fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). Se originan a partir de la fusión de precursores mononucleares, de origen hematopoyético, relacionados con la línea monocito-macrófago (17). Los osteoclastos son los encargados de la resorción del hueso. Para ello se unen a la superficie ósea por uno de sus polos, donde se encuentra el llamado borde en cepillo. En este proceso son fundamentales los receptores de la vitronectina (integrinas  $\alpha\beta3$ ), que reconocen la secuencia de aminoácidos Arg- Gly- Asp (RGD) del colágeno y otras proteínas de la matriz. Se forma así un compartimento estanco bajo el osteoclasto donde se liberan grandes cantidades de hidrogeniones, que disuelven los cristales de hidroxapatita, y enzimas lisosomales que degradan las proteínas de la matriz. Además producen una serie de proteasas, como la catepsina K, que tiene un papel fundamental en la resorción ósea. Los osteoclastos internalizan los productos de degradación de la matriz, tanto orgánicos como inorgánicos, en vesículas endocitósicas que atraviesan la célula y son evacuadas al exterior por el polo opuesto. Esto les permite continuar con la resorción sin despegarse de la superficie ósea (Fig. 4).

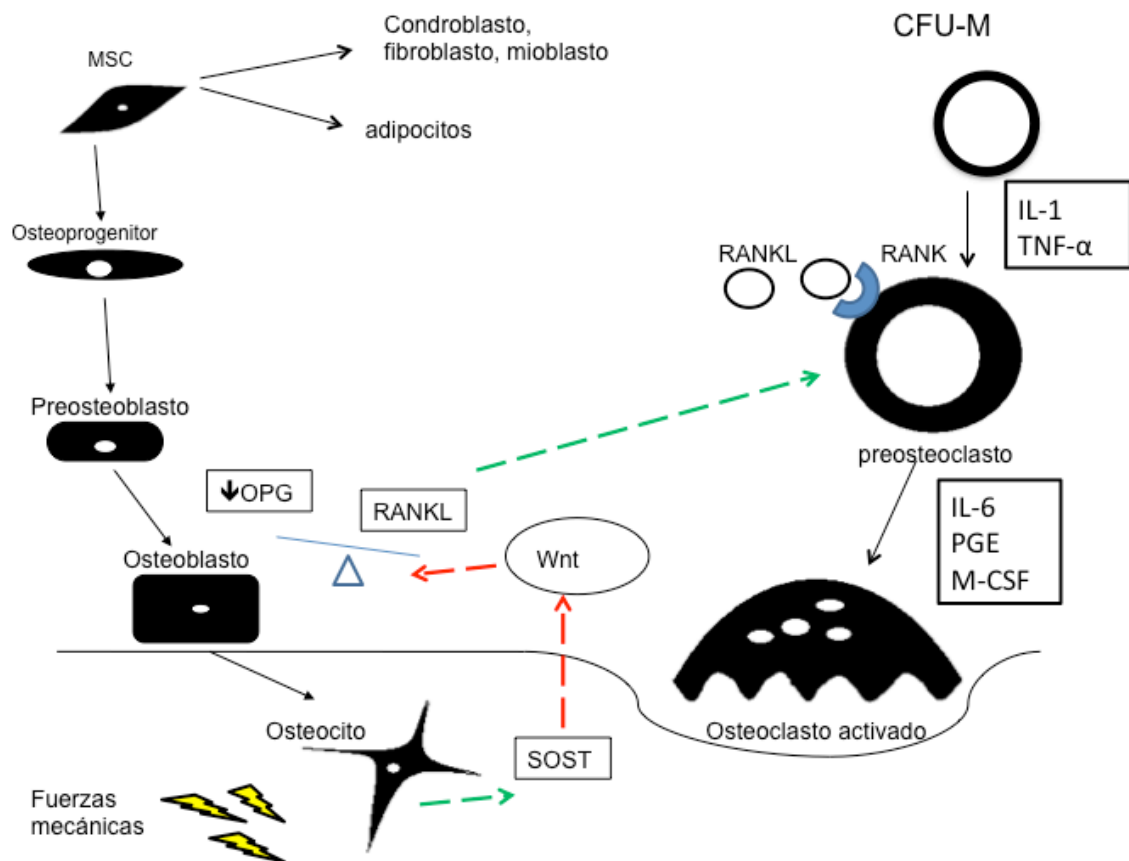


Fig. 4. Osteoclastogénesis. CPM: Célula precursora de origen mesenquimal; OPG: Osteoprotegerina; SOST: Esclerostina; Wnt: ligandos Wnt; RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa \beta$ ; RANK: Receptor activador del factor nuclear  $\kappa \beta$ ; CFU-M: Célula formadoras de colonias de macrófagos; IL1: Interleucina 1; TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; IL6: Interleucina 6; PGE: Prostaglandinas.

## 1.2. REMODELADO Y MODELADO ÓSEOS

El remodelado es un proceso equilibrado que consiste en la resorción de una cantidad determinada de hueso, llevada a cabo por los osteoclastos, seguida de la formación de nueva matriz osteoide por los osteoblastos y su posterior mineralización (18). Este proceso permite en condiciones normales la renovación de un 5-15% del esqueleto al año. Si estos dos procesos de

formación y resorción se mantienen balanceados, la masa ósea se mantendrá estable. Por el contrario, el desequilibrio entre ellos favorece el desarrollo de enfermedades óseas. Así, la disminución de la masa ósea, característica de la osteoporosis, puede deberse a un aumento en el número de osteoclastos o su actividad, a un descenso en el número de osteoblastos o su actividad, o a una combinación de ambos fenómenos. El remodelado óseo está regulado por diversos factores sistémicos y locales, aún no del todo conocidos.

Se puede dividir en cuatro fases:

-Fase inicial o de activación: Se produce la diferenciación de los precursores de los osteoclastos hacia células maduras. Los osteoclastos maduros se unen al lugar donde se llevará a cabo la resorción. Las células de revestimiento se contraen y liberan colagenasas para que los osteoclastos puedan realizar el anclaje.

-Fase de resorción: Los osteoclastos inician la resorción (ver arriba) y se producen de esta forma cavidades en el hueso cortical y lagunas en el trabecular (llamadas lagunas de Howship).

-Fase de inversión: Cuando los osteoclastos terminan la resorción desaparecen por apoptosis. A continuación tiene lugar una fase de inversión que es mal conocida. Según algunos investigadores, la laguna es colonizada por macrófagos que liberan factores de crecimiento para favorecer la formación y acaban de degradar el colágeno.

-Fase de formación: La llevan a cabo los osteoblastos, que sintetizan el componente orgánico de la matriz y controlan el depósito de minerales.

El tiempo necesario para que se produzca un ciclo entero del remodelado óseo es de aproximadamente seis meses.

El modelado óseo, en contraposición al remodelado, es un proceso que produce cambios en el tamaño y la forma del hueso. Es esencial durante el periodo de crecimiento y en la vida adulta también tiene lugar, bajo ciertas condiciones. Así, durante la curación de las fracturas. Además, parece ser importante para la adaptación del esqueleto a los cambios en los estímulos mecánicos que recibe. De hecho, es un proceso que está principalmente regulado por fuerzas mecánicas y que contribuye al mantenimiento de la resistencia (19)(20).

### 1.3. ENFERMEDADES ÓSEAS

La osteoporosis y la artrosis son, debido al aumento en la esperanza de vida, cada vez más prevalentes en nuestra sociedad y constituyen una importante causa de morbilidad en la edad adulta. De hecho, entre las enfermedades óseas son las más importantes en función del número de personas afectadas.

#### 1.3.1. OSTEOPOROSIS

La osteoporosis es una enfermedad caracterizada por una disminución de la masa ósea y un deterioro de la microarquitectura del tejido óseo, que condicionan un aumento de la fragilidad del hueso y el consecuente aumento del riesgo de fractura (21). En 1994, la Organización Mundial de la Salud estableció un punto de referencia en los valores de la densidad mineral ósea (DMO) como diagnóstico de osteoporosis, basándose en la relación que existe entre el descenso de la DMO y el aumento del riesgo de fractura (22). Hoy sabemos que la DMO no es el único factor que condiciona la resistencia del hueso, ni el único que predice el riesgo de fractura. Hay que tener en cuenta



que no sólo la masa de tejido óseo es importante como determinante de la resistencia del esqueleto; lo son también otros factores, especialmente la geometría y la microestructura. Entre los factores clínicos determinantes del riesgo de fractura se encuentran la edad, el sexo, factores demográficos, antecedentes personales o familiares de fractura previa, la probabilidad de caída, el índice de masa corporal, la inmovilización, el consumo de alcohol y tabaco, los hábitos nutricionales, el consumo de algunos fármacos y ciertas enfermedades. Además, cabe destacar que la DMO y la propensión a las fracturas tienen un fuerte componente hereditario (23)(24)(3)(25).

En nuestro país la prevalencia de osteoporosis en mujeres mayores de 50 años está en torno al 35-40%. Es de destacar que se estima que en España se producen unos 30.000 casos de fractura de cadera al año, calculándose una tasa de mortalidad en el primer año tras la fractura entre el 10 y el 30%. Por otro lado, sólo entre un 20 y un 35% de los pacientes recupera la independencia funcional previa. La prevalencia de osteoporosis y fracturas asociadas es similarmente elevada en otros países como Estados Unidos, Gran Bretaña, Alemania, China y Latinoamérica (26)(27). En el año 2005 se estimó que 200 millones de mujeres padecían osteoporosis y se produjeron unos 9 millones de fracturas osteoporóticas en el mundo, de las cuales 1,6 millones eran de cadera; 1,7 millones de hombro y 1,4 millones eran fracturas vertebrales sintomáticas. Se estima que ello supuso un coste anual de 13.000 millones de euros en EEUU y 30.000 millones de euros en la Unión Europea. Debido al aumento en la esperanza de vida, se estima que para el año 2050 se produzcan cada año unos 6,3 millones de fracturas de cadera en el mundo (28)(29)(30).

### 1.3.2. ARTROSIS

La artrosis se caracteriza por una alteración progresiva del cartílago articular y del hueso subcondral. La enfermedad puede ser definida por los síntomas que produce (dolor, tumefacción, rigidez articular), por alteraciones radiográficas (disminución del espacio articular, esclerosis subcondral, osteofitos, formación de quistes subcondrales) o por ambas. Como consecuencia de las limitaciones funcionales que ocasiona, genera una importante limitación de la calidad de vida y un elevado coste sanitario. Se piensa que alrededor de un 12% de la población mayor de 60 años sufre una artrosis sintomática a nivel de la rodilla y el 7% a nivel de la cadera (31). Los factores de riesgo que favorecen esta enfermedad son la edad, el sexo, la raza, el sobrepeso y los traumatismos. Se considera que la dirección, la intensidad y la repetición de las fuerzas de carga son importantes y, como la osteoporosis, la artrosis tiene un fuerte componente genético (32)(33)(34)(35)(36)(37).

Los estudios epidemiológicos sugieren que los pacientes con artrosis no sólo presentan una formación ósea aumentada a nivel de las regiones afectas, sino que tienen una densidad mineral ósea aumentada de manera global. Por tanto, la osteoporosis y la artrosis podrían considerarse como trastornos opuestos en cuanto a los cambios de la masa ósea que tienen lugar en ellos (38).

### 1.4 GENÉTICA Y EPIGENÉTICA

Se considera que la historia de la genética comienza con el trabajo de Gregor Mendel (1866), quien estableció las conocidas como Leyes de Mendel. En 1910 se demuestra que los genes residen en los cromosomas y se realiza

el primer mapa genético de los cromosomas. En la década de los 30 se establece que el ADN se encuentra en los cromosomas y que los genes codifican proteínas. Con la publicación de la primera secuencia del Proyecto del Genoma Humano en el año 2003 se creía que tendríamos la respuesta a la incógnita de la diversidad y el control de los genes, pero hoy día sabemos que la expresión de los genes no guarda relación únicamente con la secuencia de ADN. Depende de mecanismos de corte y empalme de los exones, de la traducción de los ARN resultantes y de otros mecanismos de regulación. Entre estos últimos se encuentran los mecanismos epigenéticos. Estos se definen como los mecanismos que determinan cambios heredables (al menos a través de la mitosis) en la expresión de los genes que no pueden ser atribuidos a cambios en la secuencia del ADN (39). No obstante, los cambios en la expresión génica dependientes de mecanismos epigenéticos son reversibles, presentan una enorme plasticidad y se consideran esenciales para la diferenciación de las células y su capacidad de adaptación, y en consecuencia la de los organismos, a las modificaciones de las condiciones ambientales. Los mecanismos epigenéticos mejor conocidos son (40):

- Modificación post-traducciona l de las histonas: incluyen modificaciones químicas post-traduccionales como acetilación, metilación, fosforilación, glucosilación, etc. Estas modificaciones representan señales que actúan como un código que marca si la cromatina está activa (cromosoma relajado y gen con capacidad de expresarse) o inactiva (nucleosoma condensado y gen silenciado). Esto es lo que se denomina el código de histonas. Son varias las enzimas involucradas en este proceso, pero las más estudiadas son las acetiltransferasas (HAT, acetilan las histonas, relajan al nucleosoma y activan

la expresión del gen) y las desacetilasas de histonas (HDACT, desacetilan las lisinas de las histonas, condensan el nucleosoma y silencian la expresión del gen).

- Metilación de las citosinas del ADN: su consecuencia es a menudo el silenciamiento de la expresión. Consiste en la adición enzimática de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) al carbono en posición 5' de la citosina que forma parte del dinucleótido CpG, es decir, ocurre en citosinas seguidas por guaninas. En el genoma humano, el 70% de estos dinucleótidos se encuentran metilados. Sin embargo, algunas regiones pequeñas del ADN, llamadas islas CpG, presentes en los promotores de muchos genes, están protegidas de la metilación, lo que puede permitir la transcripción activa de los mismos.

- Complejos proteicos Polycomb y Trithorax: Los complejos multiproteicos del Polycomb (represor) actúan modulando la cromatina hacia unas formas menos accesibles, que no sean reconocidas por los factores inductores de la transcripción. Por su parte el grupo proteico Trithorax (activador) regula positivamente la expresión génica, haciendo que la cromatina sea más accesible a la maquinaria transcripcional.

- Silenciamiento génico mediado por ARN no codificante: por su relación directa con este estudio, nos referiremos más adelante a este mecanismo epigenético.

De esta forma, la epigenética constituye la respuesta a cómo un mismo genotipo puede dar lugar a distintos fenotipos. Es decir, esto explica porqué en un individuo todos los tejidos tienen el mismo genoma, pero la estructura y la actividad celular de cada uno de ellos varían enormemente. El epigenoma de un individuo en un tipo celular determinado depende de variaciones

estocásticas, de factores genéticos y de factores ambientales. A menudo va cambiando a lo largo de la vida. Por otro lado, las alteraciones epigenéticas pueden influir en la regulación de los genes y contribuir al desarrollo de diversas enfermedades, en particular, las de tipo “complejo”, dependientes de la influencia de numerosos genes y factores ambientales. Entre ellas, se encuentran la osteoporosis y la artrosis. Los mecanismos epigenéticos representan una de las formas de interacción entre los factores genéticos y los ambientales. A menudo, los factores de riesgo de tipo genético serán transmitidos de generación en generación, pero su expresión fenotípica dependerá de la interacción con otros genes y con factores ambientales. Esto puede hacer que algunas susceptibilidades genéticas se expresen sólo en etapas avanzadas de la vida (41).

#### 1.4.1. MicroARN

##### 1.4.1.1. Aspectos generales

En 1993 Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum describieron como *lin-4*, un gen que interviene en el control del desarrollo de *C. elegans*, no codificaba ninguna proteína, pero en cambio daba lugar a dos ARNs pequeños, uno de 22 y otro de 61 nucleótidos de longitud. Se vio que el más largo podía adoptar una conformación en *stem loop* y que era el precursor del más corto. Estos hallazgos representaron la identificación del primer miembro de una nueva clase de ARNs: los microARN(42). Hoy día se han identificado más de 1800 microARNs en células humanas (ver [www.mirBase.com](http://www.mirBase.com)).

Los microARNs son moléculas de 18 a 25 nucleótidos que no codifican proteínas, sino que impiden la expresión de un determinado gen a nivel post-

transcripcional. Esto lo logran bloqueando la traducción o induciendo la degradación de ARN mensajeros específicos (que tienen una secuencia complementaria al microARN). Fisiológicamente, los microARNs ejercen varias funciones, ya que, además de regular la expresión génica por los mecanismos anteriormente citados, pueden remodelar la cromatina al modificar el patrón de metilación de una secuencia específica y pueden realizar la corrección de errores en la metilación.

Al regular negativamente la expresión de muchos genes, los microARN participan en diversas fases del desarrollo normal y patológico. El efecto final dependerá de la función del gen que bloquee. Por ejemplo, si se trata de un gen que favorece el desarrollo de ciertas líneas celulares, dará lugar a una menor diferenciación, división o inhibición de ciertas funciones; si es un gen que inhibe, tendrá una acción estimulante. De esta forma, se ha sugerido su implicación en múltiples enfermedades y funciones del organismo humano. Aunque nuestros conocimientos sobre microARNs son aún limitados, se supone que comprenden alrededor de un 1% de los genes en animales (43).

Recientemente varios autores han publicado que los microARNs se encuentran de manera muy estable en diferentes fluidos del organismo, como puede ser la sangre, el líquido cefalorraquídeo, el humor vítreo, etc. Esto hace pensar que podrían servir en el futuro como biomarcadores con fines diagnósticos y pronósticos, además de su potencial uso terapéutico (44)(45)(46).

Cada microARN puede tener muchas dianas y cada ARN mensajero puede estar regulado por más de un microARN. Debido a esto, la identificación experimental de dianas de los microARNs es difícil. Por ello, en los últimos

años, ha habido un gran interés en el desarrollo de bases de datos bioinformáticas que predican estas uniones. Una de las contribuciones más importantes para el reconocimiento de nuevas dianas fue el establecimiento de secuencias cortas de unos 6-8 pares de bases consecutivas en el microARN que se unían al ARNm diana con una complementariedad perfecta. Estas zonas de unión suelen encontrarse en la región 5' del microARN, y se las conoce con el nombre de semilla (*seed sequence*). A pesar de que todos estos métodos tienen unas bases en común, pequeñas diferencias en los algoritmos de predicción y la dificultad para identificar la región UTR 3' exacta de un gen provocan que a menudo se observe una gran diversidad entre los resultados ofrecidos por los diferentes programas de cara a la predicción de los genes diana de los microARN.

#### 1.4.1.2. Síntesis de microARN

Los genes de los microARN se transcriben inicialmente por la polimerasa II, dando lugar a una molécula parecida a un ARNm de transcripción, que contiene una región 5' con un grupo fosfato y una cola poli-A. Este primer transcrito, llamado pri-microARN (constituido por unos 70 nucleótidos), es un ARN bicatenario en forma de horquilla, que es después procesado por una enzima ARNasa III, llamada Drosha y su cofactor Pasha (*C.elegans*) o DGCR8 (Region crítica de DiGeorge 8, en mamíferos). Estas, localizadas principalmente en el núcleo, se encargan de cortar las bases de la horquilla, dando lugar así a lo que se conoce como pre-microARN.

El pre-microARN es exportado después del núcleo al citoplasma, por medio de la Exportina 5 (Exp5), RAN-GTP dependiente, a través de poros nucleares. En el citoplasma el pre-microARN es procesado por la

endonucleasa Dicer en microARN dúplex, el cual se separa en dos hebras de 20-25 nucleótidos, una de las cuales se une con el complejo RISC (Complejo de silenciamiento inducido por ARN). Esta hebra, que se conoce como el complejo guía, es seleccionada por la proteína Argonauta (ARNasa catalíticamente activada en el complejo RISC). La otra hebra se conoce como anti-guía y es degradada por RISC. Finalmente el complejo guía con RISC se puede unir con ARNm complementario en el citoplasma y regular negativamente la expresión de genes (47) (Fig. 5).

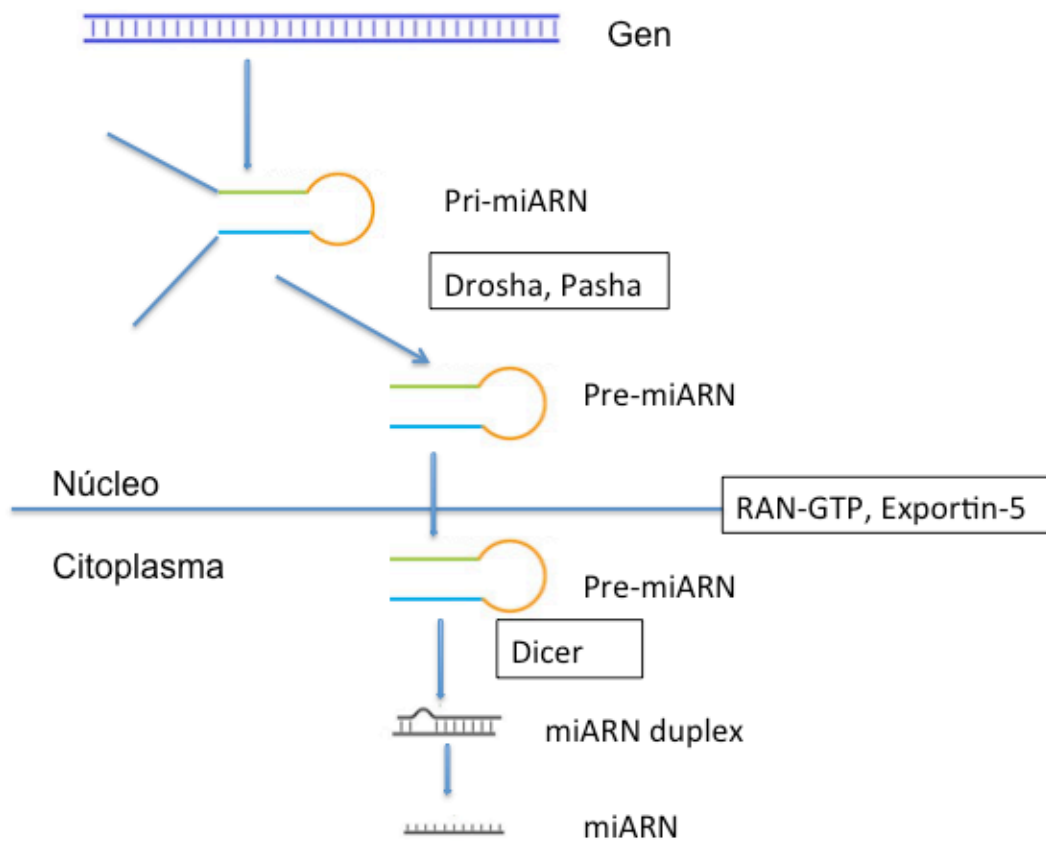


Fig. 5. Biogénesis de microARNs .

Como hemos avanzado antes, la regulación negativa de la expresión génica puede producirse por dos tipos de mecanismos:



- Si el microARN es exactamente complementario a la región 3'-UTR del ARNm, inhibirá la expresión de ese gen, por degradación del ARNm.
- Si el microARN no es exactamente complementario al ARNm, inhibirá la expresión por bloqueo de la síntesis proteica. A su vez, esta inhibición puede consistir en: bloqueo del inicio de la traducción, inhibición de la elongación o degradación de la proteína.

Uno de los principales puntos de discusión en este campo gira en torno a qué grado de complementariedad es necesario para inhibir la expresión de un gen o para el bloqueo de la traducción. Inicialmente se creía que era necesaria una complementariedad de al menos 11 pares de bases para que hubiera una elevada afinidad en el reconocimiento del ARNm diana por parte del complejo guía, de manera que por debajo de este número la afinidad del complejo guía con su diana se encontraría comprometida. Sin embargo, Doench y Sharp establecieron que la habilidad de los microARNs para suprimir la traducción depende de la energía libre de unión entre los primeros 8 nucleótidos del extremo 5' del microARN y del ARNm diana. Por otro lado, también se ha descrito cómo múltiples copias del complejo guía con una homología de 7 nucleótidos pueden unirse a su diana al mismo tiempo para compensar la baja afinidad de la unión individual (43)(48).

De esta forma, cada microARN puede regular negativamente la expresión de múltiples genes; y múltiples microARNs pueden actuar sobre un mismo gen, haciéndolo generalmente sobre distintas posiciones de la región 3'-UTR del ARNm.

## 1.4.2. MicroARNs y enfermedades óseas

### 1.4.2.1. MicroARNs y diferenciación osteoblástica

Varios estudios recientes han encontrado numerosos microARNs reguladores de genes formadores de hueso, incluyendo factores de transcripción, señales moleculares y receptores. Por ejemplo, Scheideler et al (49) analizaron la expresión de genes durante la diferenciación de las células mesenquimales hacia osteoblasto o adipocito y encontraron 65 genes con expresión diferencial. Tras ello, mediante análisis bioinformático, estimaron que el 80% de estos genes son susceptibles de regulación por parte de unos 30 microARNs, pero hay que tener presente que un mismo miARN puede regular varios genes, y varios microARNs pueden influir en la expresión de un gen determinado.

### 1.4.2.2. MicroARNs inhibidores de la osteogénesis

Inose et al (50) describieron en cultivos celulares y en ratones que la sobreexpresión mir-206 (inicialmente descrito en músculo esquelético y cardiaco) inhibe in vivo e in vitro la diferenciación osteoblástica, independientemente de la diferenciación mioblástica, a través de una disminución de conexina 43 y probablemente otras moléculas no identificadas.

Huang et al (51) determinaron mediante un análisis bioinformático (potenciales uniones a su región 3'-UTR) los microARNs que pueden inhibir Runx2, un factor crítico para diferenciación de los osteoblastos. En un primer análisis identificaron como candidatos mir-135, mir-466, mir-23, mir-467 y mir-204 y su homólogo mir-211. Tras valorar su efecto en cultivos celulares

concluyeron que sólo mir-204/211 tiene efecto inhibitorio sobre Runx2, fomentando de esta forma la adipogénesis e inhibiendo la osteogénesis. Posteriormente, Chen et al (52) determinaron también en cultivos celulares cómo mir-133a y mir-204/211 actúan sobre la osteogénesis mediante la modulación de los niveles de Osterix y Runx2.

Kapinas et al (53)(54) demostraron en cultivos celulares de osteoblastos que mir-29a y mir-29c están regulados por la vía canónica Wnt e inducen un descenso en los niveles de osteonectina, con la consiguiente inhibición de la diferenciación osteoblástica.

Li et al (55) observaron en cultivos celulares que la sobreexpresión de mir-133 y mir-135a inhibía Runx2 y Smad5, respectivamente. Por ello consideraron que estos microARNs inhiben la osteogenesis y favorecen la miogénesis (especialmente mir-133).

Hassan et al (56) describen cómo el complejo de microARNs mir-23a, mir-27a y mir-24-2, que comparten un mismo promotor, es regulado negativamente por Runx2. Además, cada uno de estos microARNs inhibe la osteoblastogénesis mediante la regulación negativa de SATB2 (Proteína especial de union 2 de secuencia rica AT). Por otro lado, el mir-23a disminuye la expresión de Runx2.

Luzi et al (57) observaron cómo al inhibir mir-26a se producía un incremento en los niveles de Smad1. Esto favorece la diferenciación osteoblástica e induce un incremento en los niveles de fosfatasa alcalina, osteocalcina, colágeno tipo 1 y osteopontina.

Itoh et al (58) identificaron cómo la transfección de células preosteoblásticas de ratón con mir-141 y mir-200a suprimía su diferenciación.

Estos autores determinaron que el principal sitio de unión de estos miARNs era Dlx5 (Distal-Less Homebox-5). Su acción se traducía en una disminución de la expresión de Osterix (Osx), BMP2 y fosfatasa alcalina.

Mizuno et al (59) determinaron que mir-125b regula la diferenciación osteoblástica en etapas iniciales. El estudio se realizó con células madre de ratón. Estos autores observaron que mir-125b inhibe la diferenciación osteoblástica, con un descenso de fosfatasa alcalina y osteocalcina en células transfectadas con este microARN. Posteriormente, mediante análisis bioinformático identificaron como posible diana osterix, pero los resultados no fueron concluyentes.

Schaap-Oziemlak et al (60) identificaron en células madre de cordón umbilical tres microARNs que tenían una menor expresión durante la diferenciación osteogénica (hsa-mir-135b, hsa-mir-224 y hsa-mir-31). Las diferencias de expresión fueron mucho más marcadas en hsa-mir-135b. Además mediante transfección de este microARN demostraron su efecto inhibitorio sobre la expresión de sialoproteína, osterix, osteocalcina y Runx2.

Eskildsen et al (61) identificaron cómo mir-138 regula negativamente la diferenciación osteogénica a partir de los precursores mesenquimales. Mediante análisis bioinformático establecieron la posible relación de este microARN con FAK (Kinasa de adhesión focal), quinasa que se ha sugerido como enlace entre la activación de Runx2 y ERK1/2 (Quinasas reguladas por señales extracelulares) en la osteogénesis.

Yu et al (62) determinaron el efecto positivo de los osteoclastos sobre la diferenciación osteogénica de los fibroblastos in vitro. Está bien establecido que los osteoclastos promueven la diferenciación de osteoblastos. El

mecanismo por el que los osteoclastos inducen la diferenciación osteogénica de los fibroblastos no está aclarado, pero si sabemos que los fibroblastos y los osteoblastos derivan de la misma estirpe celular. Además, se ha visto en otros estudios que los osteoclastos pueden influir sobre la osificación heterotópica mediada por fibroblastos. Mediante análisis de microarrays en cultivos de fibroblastos en un medio enriquecido con osteoclastos identificaron un grupo de microARNs cuya expresión disminuía (hsa-mir-20a, hsa-mir-300, hsa-mir-185, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-130b, hsa-mir-33a, hsa-mir-155, hsa-mir-222). Mediante análisis bioinformáticos establecieron una probable relación de estos miARNs con los genes BMP2, osteocalcina y Runx2.

Yang et al (63) demostraron en cultivos de osteoblastos de ratón cómo miR-93 inhibe la mineralización osteoblástica a través de una disminución en la expresión del factor de transcripción Sp7. A su vez, demostraron una regulación negativa de Sp7 sobre los niveles de miR-93, estableciendo así un mecanismo de retroalimentación negativa.

Kim et al (64) determinaron en cultivos celulares como FoxO1 es bloqueado por miR-182. FoxO1 (Forkhead cuadro O1 de proteína, principal regulador del estrés oxidativo óseo e implicado también en la masa ósea) favorece la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos y disminuye su apoptosis. Por tanto, miR-182 tiende a inhibir la osteogénesis.

Zhang et al (65) identificaron mediante análisis bioinformático (programas TargetScan, PicTar, RNA22) 11 microARNs cuya diana era Runx2 (mir-23a, mir-30c, mir-34c, mir-133a, mir-135a, mir-137, mir-204, mir-205, mir-217, mir-218, mir-338). Posteriormente en cultivos celulares de osteoblastos y

condrocitos demostraron que todos estos microARNs (excepto mir-218) inhibían selectiva y directamente Runx2.

Posteriormente Itoh et al (66) también observaron en preosteoblastos de ratón cómo mir-208 producía un descenso de BMP mediante regulación de Ets1, con su consiguiente efecto inhibitor sobre la diferenciación osteoblástica.

Wang et al (67) establecieron, tras estudiar muestras de fémur de 40 pacientes, cómo mir-214 presenta una relación directa con la edad e inversa con la masa ósea. Esto último puede deberse a que mir-214 tiene como gen diana ATF4 (Factor activador de la transcripción 4), por lo que podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la diferenciación osteoblástica.

Liu et al (68) determinaron en cultivos celulares cómo mir-17 actúa inhibiendo la diferenciación osteoblástica por acción sobre TCF3, pieza clave en la vía Wnt.

#### 1.4.2.3. MicroARNs estimuladores de la osteogénesis

Li et al (69) describieron cómo miR-2861 inhibe la histona deacetilasa 5 (HDAC5), que potencia la degradación de Runx2. En cultivos celulares murinos en los que inhibieron miR-2861 se produjo un aumento de la expresión de HDAC5 y un descenso de Runx2, inhibiendo así la formación ósea. Por el contrario en presencia de miR-2861 hubo menor expresión de HDAC5 y mayor de Runx2. A su vez, identificaron en hueso fracturado de una familia de sujetos con osteoporosis precoz algunas mutaciones de pre-miR-2861 que reducen su expresión. Estas no se observaron en sujetos sanos, ni en otros sujetos con osteoporosis, lo que establece una relación con el desarrollo de una variante de osteoporosis precoz primaria en humanos.

Mizuno et al (70) demostraron que miR-210 se une al receptor tipo 1B de la activina A (AcvR1b), inhibiendo la vía TGF $\beta$ /activina, lo cual estimula la diferenciación osteoblástica. AcvR1b es un miembro de la familia de receptores de BMP que transmite señales a Smad 2 y 3, las cuales a su vez inducen la transcripción de genes que inhiben la diferenciación osteoblástica.

Gao et al (71) compararon la expresión de microARNs en células progenitoras y en células diferenciadas a osteoblastos y observaron en estas últimas una menor expresión de hsa-mir-31, hsa-mir-106a, hsa-mir-148a y hsa-mir-424, junto a un aumento de la expresión de hsa-mir-30c, hsa-mir15b y hsa-mir-130b. Posteriormente, mediante programas bioinformáticos (Target Scan), encontraron que los microARNs cuya expresión era menor se relacionaban con genes de formación ósea (Runx2, CFBF, BMP), mientras que los que se expresaban de manera más abundante se relacionaban con dianas de diferenciación ósea. Además, mediante transfección de anti-hsa-mir31 demostraron que aumentaba la diferenciación osteoblástica.

Jafferji et al (72), utilizando células madre, observaron cómo mir-218 disminuía la expresión de SOST y TOB1 (Transductor de ErbB 1, proteína inhibitoria de BMP), con el consiguiente aumento de marcadores óseos en las etapas finales de la formación ósea (fosfatasa alcalina y osteocalina).

Kim et al (73) han señalado que mir-196a regula la diferenciación de células mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo, favoreciendo la formación de osteoblastos e inhibiendo la diferenciación hacia adipocitos. Este efecto tiene lugar mediante la inhibición de Hoxc8 (Homebox C8, regulador negativo de Smad1).

Zhang et al (74) demostraron en osteoblastos de ratón, cómo mir-335-5p regula negativamente DKK1, lo cual favorece un aumento en la actividad de la vía Wnt y en consecuencia la potenciación de la diferenciación osteoblástica y condrocítica.

Guo et al (75) demostraron en cultivos celulares que miR-764-5p está sobreexpresado durante la diferenciación osteoblástica, ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la proteína CHIP (C terminal de la proteína de interacción Hsc70, promueve la degradación de Runx2).

Li et al (76) observaron que la diferenciación osteoblástica se asociaba a un aumento de mir-29b, de la familia mir-let-7 y mir-26. Además demostraron que mir-29b inducía un aumento de fosfatasa alcalina ósea y Runx2 (siendo de esta forma un regulador positivo en la diferenciación osteoblástica). Mediante el análisis de bases de datos bioinformáticas (TargetScan, MiRanda, PicTar) encontraron como posibles genes diana BMP, TGF- $\beta$ , HDAC4 y CTNNA1 (relacionado con la vía Wnt). Por otro lado, mir-29b regula negativamente la síntesis de colágeno tipo I en etapas tardías de la diferenciación, de esta forma favorece el depósito de mineral óseo y evita la fibrosis.

Guo et al (77) vieron en cultivos celulares cómo mir-17-92a tiene como gen diana Bim, por lo que produce un efecto antiapoptótico en los osteoblastos al potenciar el efecto protector estrogénico.

Yang et al (78) demostraron como mir-21 tiene como gen diana Spry1. De esta forma produce un efecto inhibitorio de los niveles de TNF alfa y estimula la formación ósea.

Lisse et al (79) mediante análisis de microarrays en cultivos primarios de osteoblastos establecieron que mir-1228 y mir-637 tienen efecto sobre los



eventos postranscripcionales mediados por la 1,25 dihidroxivitamina D. De esta forma, vieron cómo al inhibir estos microARNs se producía una depresión de la diferenciación celular.

Eguchi et al (80), trabajando con cultivos de células madre de ratón y humanas, encontraron algunos patrones característicos en los niveles de expresión de mir-30, let-7, miR-21, miR-16, miR-155 y miR-322 durante la diferenciación osteoblástica y osteocítica. Posteriormente mediante análisis bioinformático establecieron como posibles genes diana de mir-30 los genes: osteopontin/SPP1, Lifr (Receptor del factor inhibidor de la leucemia), ccn2/ctgf, ccn1/cyr61, Runx2 y Sox9.

Wang et al (81) determinaron en ratas sometidas a tratamiento con glucocorticoides cómo mir-29a tiene un efecto protector sobre la disminución de la densidad mineral ósea. Esto es debido a que mir-29a inhibe Dkk1 y actúa de esta forma sobre mecanismos de señalización de la vía wnt.

Recientemente, Gamez et al (82) observaron en cultivos celulares que miR-322 inhibe Tob 2 (efecto negativo sobre Osterix) y así favorece la diferenciación osteoblástica.

#### 1.4.2.4. MicroARNs y diferenciación osteoclastica

Sugatani et al (83) demostraron en osteoclastos de ratón que mir-223 juega un papel importante en la diferenciación de estas células, pero no encontraron ningún gen específico como diana de mir-223 que justifique esta acción.

Cheng et al (84) establecieron como mir-148a tiene como diana MAFB (Homólogo del oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico), cuya acción

consiste en regular negativamente RANKL. De esta forma en ratones ovariectomizados vieron cómo al inhibir mir-148a se producía un incremento en la masa ósea, asociado a una disminución de la resorción.

Lei et al (85) observaron cómo ciertos polimorfismos de FGF2 (que favorece el reclutamiento y la diferenciación osteoclástica) se asociaban con una mayor resorción ósea. Tras ello, mediante análisis bioinformático (TargetScan) determinaron posibles microARNs con secuencias homologas para este gen, entre ellos mir-146a y mir-146b. Concluyeron que estos polimorfismos podían influir en la fijación de microARNs y por tanto modular el potencial osteoclastogénico.

Zhou et al (86) identificaron como el ibandronato modula la expresión de miR-18a, miR-133a, miR-141 y miR-19a. Estos autores concluyeron que este fenómeno puede deberse a una acción directa de los bisfosfonatos sobre los microARNs o a un epifenómeno asociado a su efecto inhibitorio de la osteoclastogénesis.

En la figura (Fig. 6) y tabla (Tabla 1) siguiente se resumen estos datos experimentales.

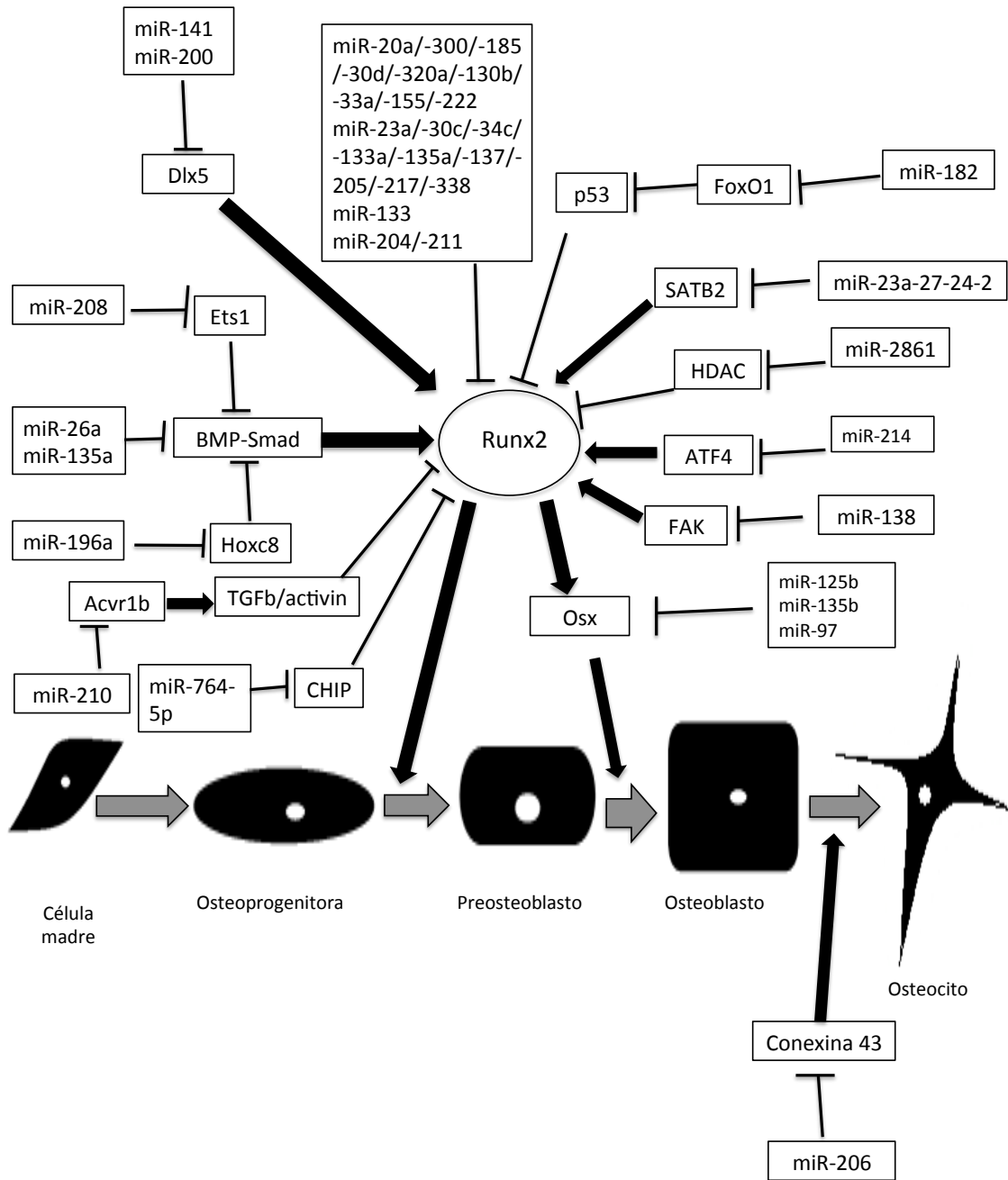


Fig. 6. Efecto de los microARNs sobre la diferenciación osteoblástica.

MicroARN	Acción	Ref.
miR-206	Unión connexina 43, bloquea diferenciación osteoblásticas	(50)
miR-204/211	Unión Runx2, bloquea diferenciación osteoblástica	(51)
miR-29/29c	Modula la vía Wnt; Unión osteonectina.	(53) (54)
mir-2861	Unión HDAC5, induce diferenciación osteogénica	(69)
miR-133/135-al	Unión Runx2 y Smad 5, bloquea diferenciación osteoblástica	(55)
miR-23a/27a/24-2	Regulado por Runx2; unión SATB2 y Runx2.	(56)
miR-29b	Promueve diferenciación osteogénica	(76)
miR-26a	Unión Smad1, bloquea diferenciación osteoblástica	(57)
miR-31/106a/148a/424/30c/15b	Bloquean diferenciación osteoblástica	(71)
miR-30c/34c/133a/135a/137/204/205/217/338	Unión Runx2 y bloquea diferenciación osteoblástica	(65)
miR-218	Disminuyen la expresión de SOST y TOB1	(72)
miR-141/200a	Unión Dlx5, bloquea diferenciación osteoblástica	(58)
miR-208	Inhiben BMP indirectamente BMPs	(66)
miR-196a	Unión Hoxc8, mejoran diferenciación osteogénica	(73)
miR-125b	Inhiben la proliferación y bloquean la diferenciación osteoblástica.	(59)
miR-135b	Unión a sialoproteínas, osterix, osteocalcina y Runx2	(60)
miR-210	Unión AcvR1b, induciendo osteogenesis.	(70)
miR-764-5p	Unión a CHIP/STUB1, promueve osteogénesis.	(75)
miR-93/Sp7	Feedback negativo miR-93/Sp7, bloquea la diferenciación osteoblástica.	(63)
miR-182	Unión FoxO1, bloquea osteogénesis	(64)
miR-148	Unión a MAFB, bloquea RANKL	(84)
miR-214	Inhibe ATF4, bloquea diferenciación osteoblástica	(67)
miR-17-93a	Unión a Bim, efecto anti-apoptótico en osteoblastos	(77)
miR-21	Unión a Spry1, favorece osteogénesis	(78)
miR-1228/miR-637	Favorece la diferenciación osteoblástica mediada por 1,25OH vitamin D	(79)
miR-30	Posible unión con osteopontin/SPP1, lifr, ccn2/ctgf, ccn1/cyr61, runx2, sox9	(80)
miR-133/mir-204/211	Bloquean Osterix y Runx2	(52)
miR-322	Inhibe Tob2	(82)

Tabla 1. Resumen de los microARNs descritos en la literatura involucrados en el metabolismo óseo.

**Justificación**

**Hipótesis**

**Objetivos**



## 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La osteoporosis y la artrosis son enfermedades con alta prevalencia en la población general. Ocasionan grandes incapacidades y suponen altos costes sanitarios. Como ya hemos comentado, son enfermedades con patrones de herencia complejos. Hasta la fecha, los numerosos estudios realizados sobre la herencia de estas enfermedades han ofrecido resultados dispares. Ello ha llevado a sugerir que los mecanismos epigenéticos pueden desempeñar un papel importante en la patogenia de estos trastornos.

En los últimos años ha ido en aumento el interés por analizar la implicación de los microARNs en la regulación del metabolismo óseo, lo que se ha visto reflejado en numerosas publicaciones (entre 2001 y 2012 se publicaron 18426 artículos sobre microARNs, de los cuales alrededor de 400 guardan relación con el metabolismo óseo, todos ellos a partir del año 2007).

El estudio de los microARNs en estas enfermedades puede ser interesante por varios motivos:

- Si conociéramos los microARNs que condicionan una mayor susceptibilidad para el desarrollo y progresión de estas enfermedades, podríamos comprender mejor su patogenia y fisiopatología, lo que podría ayudar a desarrollar nuevos fármacos.
- Los microARNs pueden servir como biomarcadores. Analizando los niveles diferenciales de microARNs en ellas, podríamos identificar a las personas con riesgo de padecerlas, pudiéndose

beneficiar de medidas encaminadas a una prevención primaria, además de ayudar a establecer su pronóstico.

Es importante destacar que hasta la fecha solo en tres estudios se ha analizado en hueso de humanos la posible relación entre los cambios en la expresión de los microARNs y algunas enfermedades óseas y solo en uno de ellos se ha analizado esta cuestión a partir de los microARNs circulantes en el suero (67)(69)(87), lo que evidentemente resulta mucho más práctico en la clínica.



## 2.2. HIPÓTESIS

La hipótesis general de nuestro trabajo es que algunos microARNs están implicados en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades esqueléticas como la osteoporosis y la artrosis.

## 2.3. OBJETIVOS

El objetivo general fue identificar los microARNs que se expresan de manera diferente en la osteoporosis y la artrosis y determinar sus consecuencias funcionales.

Como objetivos específicos nos planteamos:

- 1- Analizar las diferencias en los niveles de microARNs en tejido óseo de sujetos con osteoporosis, artrosis y controles.
- 2- Analizar en suero los niveles de microARNs que, por mostrar diferencias en la expresión en hueso, se seleccionen como candidatos a ser utilizados como biomarcadores.
- 3- Estudiar el efecto de esos microARNs sobre la expresión de genes diana en osteoblastos.



# Material y métodos



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se trata de un estudio de casos y controles realizado con sujetos sometidos a artroplastia de cadera.

#### 3.1. Fases del estudio

Se ha dividido en cuatro fases:

- En una primera fase, se analizaron las diferencias en los niveles de microARNs mediante arrays (760 microARNs) en hueso de sujetos con osteoporosis y artrosis.
- Los microARNs que mostraron diferencias significativas fueron analizados en hueso en una muestra de mayor tamaño, incluyendo pacientes osteoporóticos, artrósicos y controles.
- En una tercera fase, se exploró si estas diferencias se mantenían en el suero de estos pacientes.
- Finalmente, se analizó el efecto de estos microARNs sobre la expresión génica en cultivos de osteoblastos.

#### 3.2. Pacientes, muestras de hueso y de suero

**Fractura de cadera.** Se seleccionaron casos de pacientes con fractura de cadera osteoporótica que iban a ser tratados mediante colocación de una prótesis. Se excluyeron aquellos sujetos que presentaban osteoporosis secundaria (tumores malignos, insuficiencia renal, hepatopatía crónica, conectivopatía, malabsorción, hipogonadismo, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, inmovilización, tratamientos (corticoides, antiepilépticos,

inmunosupresores, citostáticos, etc.) y las fracturas relacionadas con traumatismos de alta energía.

**Coxartrosis.** Se seleccionaron pacientes con diagnóstico de artrosis grave de cadera que iban a ser tratados mediante artroplastia. Se excluyeron los pacientes con artrosis secundaria (conectivopatías, traumatismos de gran energía, artropatía neuropática de Charcot, artrosis posttraumática, deformidades de las extremidades, etc).

### **Controles**

**Hueso.** Se seleccionaron caderas de cadáver sin evidencia de trastornos esqueléticos, de edad similar a la de los pacientes.

**Suero.** Las muestras de suero se obtuvieron de sujetos sin evidencia de trastornos esqueléticos, de edad similar a la de los pacientes.

El estudio fue aprobado por el CEIC de Cantabria. Los pacientes otorgaron su consentimiento informado. Se verificó la información de cada sujeto, manteniendo la privacidad y ética enmarcada por la Ley de Protección de Datos.

### **3.3. Variables del estudio**

Las variables analizadas en las diferentes fases del estudio fueron: edad, sexo, enfermedades asociadas (diabetes mellitus, HTA, hiperuricemia), Índice de Charlson, tiempo de espera entre la fractura y la cirugía, éxitus, niveles de microARNs en hueso, en suero y en cultivos celulares, expresión diferencial de fosfatasa alcalina, RANKL, IGF1R (Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1) y OPG.

### 3.4. Técnicas

#### 3.4.1. Análisis de las diferencias de los niveles de microARNs en hueso

Inicialmente se realizó un análisis de 760 microARNs mediante arrays (pool A y pool B) en 8 muestras de hueso de sujetos con fracturas de cadera osteoporóticas y en 8 con coxartrosis.

A partir de ese estudio se seleccionaron los que mostraron diferencias significativas en estas enfermedades para una segunda fase de replicación en la cual se incluyeron un número mayor de pacientes (n=38: 19 artrosis y 19 osteoporosis), así como huesos de sujetos control (n=6). Como se expondrá en la sección de Resultados, los microARNs seleccionados fueron: miR-187; miR-518f; miR-636; miR-210; miR-193a-3p.

Posteriormente, tras la publicación de un trabajo de Wang de similares características (67), en el que analizaban el miR-214 en pacientes con osteoporosis y, dado que en los arrays este miARN mostró diferencias significativas (ver sección de resultados), decidimos analizarlo de forma individual para comparar resultados. La población estudiada fue 24 muestras de pacientes con fracturas, 27 muestras de pacientes con artrosis y 6 controles.

##### 3.4.1.1. Procesamiento de las muestras

Se utilizarón cabezas femorales de sujetos sometidos a intervenciones de reemplazo de cadera por parte del servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Una vez recibida la cabeza femoral en el laboratorio, mediante un trócar de 6 mm se obtuvieron muestras de hueso trabecular de la zona central de la

cabeza. Los fragmentos se lavaron extensamente con PBS y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido, con posterior conservación a -70° hasta su análisis.

#### 3.4.1.2. Fases

##### Aislamiento de ARN

-Homogenización: Se pulverizaron las muestras sin descongelar y se pasaron a un tubo con 2 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU). Se homogeneizaron con el politron durante 20-30 segundos. Posteriormente se mantuvieron en hielo hasta su centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante en dos tubos eppendorf.

-Separación: Se añadieron 200 µl de cloroformo por muestra y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Tras esto la muestra quedó dividida en tres fases y se recogió la fase acuosa con el ARN.

-Precipitación del ARN: En un tubo limpio se precipitó la fase acuosa al mezclarlo con 500 µl de isopropanol y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

- Lavado del ARN: Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol 75% frío. Tras ello, se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C.



- Resuspensión del ARN: Se resuspendió en agua libre de nucleasas, incubándolo 10 minutos a 55°C.

#### Retrotranscripción (RT Megaplex microARN)

Para la retrotranscripción se mezclaron los siguientes componentes de la RT: Megaplex RT primers (x10): 0,8 µl; dNTPs con dTTP (100mM): 0,2 µl; MultiScribe RT(50 U/µl): 1,5 µl; 10x RT Buffer: 0,8 µl; MgCl<sub>2</sub> 25 mM: 0,9 µl; Inhibidor de Rnase (20U/µl):0,1 µl; agua libre de nucleasas: 0,2 µl (todos ellos de Applied Biosystems, Foster, CA, EEUU). Posteriormente se mezclaron con 3 µl de ARN dando lugar a un volumen total de la reacción de 7,5 µl. Se llevaron a cabo dos reacciones RT por cada muestra de ARN, ya que se utilizaron dos pool de primers distintos (pool A y pool B), cada uno de los cuales incluía la amplificación de 380 microARNs. La reacción de RT se llevó a cabo en un termociclador ABI 9600, con un programa en modo 9700 Std que constó de 40 ciclos a 16 °C durante 2 minutos, 42 °C durante 1 minuto y 50 °C durante 1 segundo, posteriormente 1 ciclo a 85 °C durante 5 minutos y se mantuvo finalmente a 4 °C.

#### Preamplificación microARN (Megaplex Preamp)

Cada reacción de preamplificación se realizó con 0,5 µl del volumen final de la RT, que se mezcló con 2,5 µl de TaqMan PreAmp Master Mix (2x), 0,5 µl de Megaplex PreAmp Primers (10x), 1,5 µl de agua libre de nucleasas (todos ellos de Applied Biosystems), hasta completar un volumen total de 5 µl. Hubo que realizar dos preamplificaciones de cada muestra, ya que se utilizaron dos pool de primers distintos (pool A y pool B). La reacción se llevó a cabo en

el termociclador en modo 9700 Std, con los siguientes parámetros: un ciclo a 95 °C durante 10 minutos, un ciclo a 55 °C durante 2 minutos, un ciclo a 72 °C durante 2 minutos, 12 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 4 minutos, seguido de un ciclo a 99,9 °C durante 10 minutos y se mantuvo finalmente a 4 °C. Posteriormente se añadieron a cada muestra 75 µl de 0,1 x TE (pH 8).

#### PCR cuantitativa de microARNs en placas de arrays precargadas (mini-arrays de 384 pocillos)

La reacción para la RT-PCR se realizó con 450 µl de TaqMan Universal Master Mix II, 441 µl de agua libre de nucleasas; 9 µl del producto de la preAmp diluído a 1/4. Se cargaron 100 µl de la mezcla anterior en cada uno de los puertos de la placa (Applied Biosystems, Foster, CA, EEUU). Tras esto se llevó la placa al termociclador en modo 7900 emulation, con un ciclo a 95 °C durante 10 minutos y 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

De esta forma analizamos las diferencias en los niveles de 380 miARNs en las placas “pool A” y otros 380 en las placas “pool B” en hueso de sujetos osteoporóticos y artrósicos (Anexo 1 y 2).

#### PCR cuantitativa de microARNs en ensayos individuales (placas de 96 pocillos)

La reacción para la RT-PCR se realizó con 5 µl de TaqMan Universal Master Mix II, 5 µl de agua libre de nucleasas, 0,5 µl de 20x Taqman microARN mix, 1 µl del producto de la preAmp diluído a 1/10 (todos ellos de Applied Biosystems). Tras esto se llevó la placa al termociclador en modo 7900 , con

un ciclo a 95 °C durante 10 minutos y 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto.

### 3.4.2. Análisis de las diferencias de los niveles de microARNs en suero

Se realizó un análisis en suero de los niveles de los microARNs que mostraron diferencias significativas en hueso, mediante ensayos individuales, en 4 muestras de sujetos con osteoporosis y 4 de sujetos con artrosis. No pudimos seleccionar las muestras de suero en función de la mejor expresión en hueso debido a que en la seroteca no disponíamos de muestras de todos los pacientes. Los microARNs analizados fueron: miR-187 y miR-518f.

#### 3.4.2.1. Procesamiento de las muestras

Se obtuvieron 5 ml. de sangre en tubos “Vacuette” (Ref.456073), por personal entrenado para la flebotomía. Se dejó reposar el tubo en torno a 30´ para que actuasen los factores activadores de la coagulación y se procesó la muestra en un tiempo inferior a 1h, mediante centrifugación a 1500 g durante 15 minutos. Tras ello se aspiró el sobrenadante (suero) y se almacenó en crioviales a -80 °C.

Aislamiento de microARNs: a partir de las muestras de 300 microlitros de suero se extrajeron los microARN, con un kit específico para ello (mirVANA, Ambion-Applied Biosystems), de acuerdo al protocolo del fabricante. Tras ello se obtuvo cADN mediante transcripción inversa con un pool de primers específicos (Applied BioSystems). Realizamos una pre-amplificación mediante el kit de Megaplex. Se analizaron las diferencias de los niveles de

microARNs seleccionados mediante una PCR cuantitativa en tiempo real. Para ello se siguió el protocolo anteriormente descrito.

### 3.4.3. Análisis de la producción in vitro de los microARNs y su influencia sobre otros genes

Una vez identificados los miARNs que mostraron diferencias entre sujetos con osteoporosis, artrosis y controles, se analizó si estas diferencias se mantenían en cultivos de osteoblastos y como influían sobre la expresión de genes implicados en el metabolismo óseo (fosfatasa alcalina, RANKL, IGF1R y OPG). Todo ello se llevó a cabo como se describe a continuación:

#### 3.4.3.1. Cultivos celulares

Para los experimentos de expresión génica se usaron las líneas celulares osteoblásticas humanas MG-63 y HOS-TE8537 (ambas derivadas de un osteosarcoma humano) y para el análisis de los niveles de los microARNs se usaron cultivos primarios de osteoblastos de sujetos con osteoporosis (n: 8) y artrosis (n: 8).

Los osteoblastos primarios se aislaron a partir de las cabezas femorales de pacientes con osteoporosis y artrosis. Mediante un trócar de 6 mm se obtuvieron muestras de hueso trabecular de la zona central de la cabeza. Los fragmentos se lavaron extensamente con PBS. Tras esto, se depositaron en placas petri estériles de 10 cm preparadas con 10 ml de medio de cultivo DMEM (Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbeco), 10% FCS (Suero de ternera fetal), 1% P/S (Penicilina-estreptomicina y 1% fungizone) y se

guardaron en el incubador durante 10-12 días, cambiando el medio cada 3-4 días.

#### 3.4.3.2. Aislamiento de microARNs

A partir de las muestras de cultivos primarios de osteoblastos de sujetos artrósicos y osteoporóticos se extrajeron los microARNs seleccionados, con un kit comercial (mirVANA, Ambion-Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del fabricante. Tras ello se obtuvo cADN mediante transcripción inversa con un pool de primers específicos (Applied BioSystems). Realizamos una pre-amplificación mediante el kit de Megaplex (ya comentado). Se analizaron los niveles diferenciales de los microARNs en estos sujetos mediante una PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis se realizó en placas de 96 pocillos en un termociclador qRT-PCR Applied BioSystems 7900HT.

#### 3.4.3.3. Análisis de las diferencias en la expresión de genes osteoblásticos en relación con los microARNs seleccionados

Para este estudio se sembraron células de las líneas celulares MG-63 y HOS-TE8537. Para realizar la transfección se utilizaron 20 nM del inhibidor de microARNs (Exiqon, Woburn, MA, EEUU), 50.000 células/pocillo y 4  $\mu$ L de Lipofectamina (Lipofectamina; Invitrogen, Calsbad, CA, EEUU). El primer día se rellenaron las placas con 50.000 células por pocillo con un volumen final de 500  $\mu$ L de medio y 10% de FCS. A las 48 horas, aspiramos el medio de los pocillos y dejamos las células en 200  $\mu$ L de BSA y DMEM durante una 1 hora. En viales separados añadimos 50  $\mu$ L de DMEM, 2  $\mu$ L del inhibidor (20 nM) y 8  $\mu$ L de Plus Reagent. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, añadimos 50  $\mu$ L de la mezcla de Lipofectamina con DMEM (4  $\mu$ L de

Lipofectamina y 96  $\mu\text{L}$  de DMEM). Aspiramos el medio de las células hasta dejar solo 200  $\mu\text{L}$  por pocillo y añadimos 55  $\mu\text{L}$  de la mezcla final. Finalmente, 6 h después de la transfección, completamos el volumen del medio con 50  $\mu\text{L}$  de FCS por pocillo y se mantuvo el cultivo durante 24 ó 48 horas. Tras esto se analizó la expresión diferencial de fosfatasa alcalina, RANKL, IGF1R y OPG mediante RT-PCR cuantitativa y las variaciones en los niveles de los microARNs.

### 3.5. Análisis estadístico

Para el análisis de las diferencias en los niveles de los microARNs entre sujetos osteoporóticos, artrósicos y control mediante RT-PCR cuantitativa se requirió un proceso de normalización de los datos, evitando así la influencia de las condiciones externas al experimento, algo esencial para una cuantificación correcta de los miARNs. Normalmente el método utilizado en el proceso de normalización es el uso de un control (*house-keeping*). En el caso de los miARNs todavía no hay suficientes datos que establezcan cual es el mejor control endógeno. Por esta razón, los datos de expresión de miARNs fueron normalizados seleccionando aquellos microARNs que se mantenían más constantes entre sujetos. Para determinar estos microARNs control utilizamos los programas informáticos NormFinder y GeNorm. De esta forma, el promedio de los Ct de los microARNs miR-222 y let-7b, que se expresaron de forma muy estable entre los dos grupos, fue utilizado como control. La única excepción fue en el análisis de los microARNs en suero, en que solo utilizamos el miR-222, dado la variabilidad de let-7b entre grupos.

En los arrays las diferencias de los microARNs entre los grupos se analizaron mediante los programas ExpressionSuite Software v1.0 (Applied Biosystems) y GenEx (bioMCC, Freising-Weihenstephan, Alemania) y se realizó un análisis estadístico de las diferencias de los Ct entre los diferentes grupos mediante el test U de Mann-Whitney y el posterior ajuste de comparaciones múltiples de Benjamini-Hochberg.

En los ensayos individuales, suero y cultivos celulares: se estimó la abundancia relativa de microARNs y ARNm por el método de la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  ( $2^{-(Ct \text{ de la muestra} - Ct \text{ control})}$ ). Las diferencias entre grupos se analizaron mediante los tests no paramétricos de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, o mediante la prueba de chi-cuadrado y la t de Student, utilizando el programa SPSS.





# Resultados



## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISIS DE MINIARRAYS EN HUESO

#### 4.1.1. Características de la muestra

##### **Grupo fracturados:**

Los 8 casos incluidos eran mujeres, con una edad media de  $81 \pm 4$  años (media  $\pm$  DE).

##### **Grupo artrósicos:**

Las muestras seleccionadas procedían de 8 mujeres, con una edad media de  $75 \pm 8$  (media  $\pm$  DE).

#### 4.1.2. Análisis de los microARNs

De los 760 microARNs (pool A y pool B: ver anexo 1 y 2) que analizamos, encontramos los resultado que se muestran a continuación.

##### ➤ Pool A

En la tabla siguiente (Tabla 2) vemos el número de microARNs que se amplificaron eficazmente, de manera que se detectó su expresión en al menos una muestra de hueso, con independencia de que fueran fracturas o artrosis. El valor umbral de detección (delta Rn) se estableció en 0,2. Se consideró que un microARN se expresaba en el tejido cuando el ciclo en el que se alcanzó ese umbral (Ct) era inferior a 35. Es de destacar que el 74% de los microARNs analizados se expresaba en al menos 12 muestras de las 16 analizadas (75% de las muestras).

Distribución de la expresión de los microARNs en el pool A	
Número de microARNs	Muestras en las que se expresa
128	16
63	15
40	14
32	13
18	12
14	11
10	10
10	9
8	8
9	7
5	6
8	5
12	4
6	3
13	2
5	1

Tabla 2. MicroARNs que se amplificaron eficazmente en las diferentes muestras.

En esta tabla (Tabla 3) vemos el valor medio de todos los Ct de los microARNs de cada muestra.

Valor medio de los Ct de los microARNs del pool A en cada una de las muestras analizadas		
Identificación de la muestra	Tipo	Ct
11	Artrosis	25,5
12	Artrosis	25,6
14	Artrosis	25,5
17	Artrosis	25,3
52	Artrosis	24,8
53	Artrosis	25,3
63	Artrosis	28,1
64	Artrosis	29
13	Fracturas	25,3
15	Fracturas	24,6
16	Fracturas	25,3
18	Fracturas	24,7
49	Fracturas	25
51	Fracturas	26,4
62	Fracturas	29,3
65	Fracturas	29,6

Tabla 3. Valor medio de todos los Ct de los microARNs de cada muestra. Se consideró que un microARN se expresaba en el tejido cuando el ciclo en el que se alcanzó ese umbral (Ct) era inferior a 35.

Hay que destacar que hubo 4 muestras en las que la expresión global de los microARNs fue más baja que en las demás, posiblemente por una peor conservación de los mismos. Esto no influyó en la comparación entre los grupos, dado que la distribución de esas muestras fue similar en ambos (2 correspondían a artrosis y 2 a fracturas). De hecho, en un estudio preliminar no encontramos diferencias significativas en los resultados de la expresión relativa de los microARNs dependiendo de que se mantuvieran o se excluyeran esas muestras, por lo que a continuación se exponen los resultados del análisis global, incluyendo todas las muestras.

Al comparar los resultados obtenidos en ambos grupos, encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la expresión de 9 microARNs del pool A (miR-187; miR-330-5p; miR-193a-3p; miR-214; miR-636; miR-519d; miR-135; miR-518f; miR-137). Este resultado se presenta en la siguiente figura (Fig. 7), un gráfico “tipo volcán”, diagrama de dispersión que nos ayuda a relacionar la magnitud del cambio biológico (“fold change”) con el nivel de significación estadística ( $p$ ). Los microARN que muestren diferencias asociadas a una mayor significación estadística estarán en la parte superior del gráfico, mientras que los que muestran las diferencias más amplias estarán en los extremos izquierdo y derecho del mismo.

Cabe señalar que para la comparación de los grupos se consideró como umbral de significación el valor estándar de  $p = 0,05$ , sin corrección por comparaciones múltiples. Esa decisión se basó en el hecho de que esta fase inicial del estudio era exploratoria e iría seguida de una fase posterior de replicación de los resultados considerados inicialmente como significativos (ver más adelante).

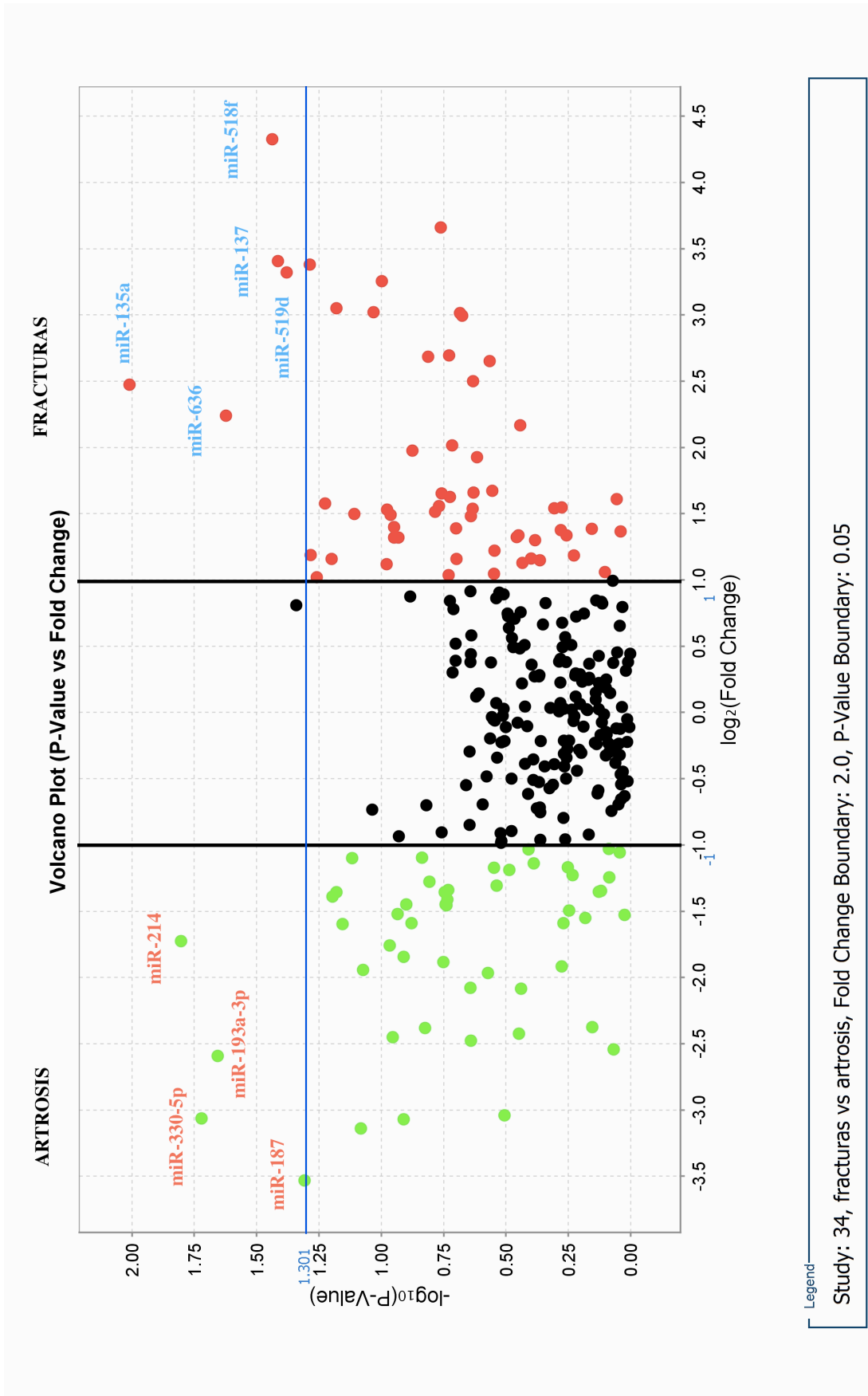


Fig. 7. Gráfico tipo volcán que muestra las diferencias de expresión de los microARNs en el pool A.

La tabla (Tabla 4) muestra la expresión de los microARNs en los que encontramos diferencias significativas entre fracturas y artrosis. En negrita se destaca el grupo (fractura, artrosis) en el que hay una mayor expresión del microARN.



Expresión de los microARNs destacados en el pool A					
MicroARN	Tipo	Ct	$\Delta$ Ct	DE	p
miR-135a	Artrosis	33,3	7,1	0,5	0,01
	<b>Fracturas</b>	30,4	4,6	0,3	
miR-137	Artrosis	33,1	6,9	1,1	0,038
	<b>Fracturas</b>	29,3	3,5	0,4	
miR-187	<b>Artrosis</b>	27,1	0,5	0,8	0,049
	Fracturas	30,5	4	0,7	
miR-193a-3p	<b>Artrosis</b>	26,4	-0,2	0,4	0,022
	Fracturas	28,8	2,4	0,8	
miR-214	<b>Artrosis</b>	18,8	-7,8	0,3	0,016
	Fracturas	20,8	-6,1	0,7	
miR-330-5p	<b>Artrosis</b>	31,4	5,6	0,3	0,019
	Fracturas	34,1	8,6	0,7	
miR-518f	Artrosis	34,3	8,4	0,9	0,037
	<b>Fracturas</b>	29,9	4,1	0,6	
miR-519d	Artrosis	33,4	7,2	0,5	0,042
	<b>Fracturas</b>	29,7	3,9	0,9	
miR-636	Artrosis	30,8	4,2	0,6	0,024
	<b>Fracturas</b>	28,8	1,9	0,4	

Tabla 4. Expresión de los microARNs en los que encontramos diferencias significativas entre fracturas y artrosis. Se consideró que un miARN se expresaba en el tejido cuando el ciclo en el que se alcanzó ese umbral (Ct) era inferior a 35.  $\Delta$ Ct: Ct de la muestra- Ct control; DE: Desviación estándar; p: significación estadística

➤ Pool B

En la Tabla 5 vemos el número de microARNs que se detectaron en las muestras analizadas, independientemente de si eran fracturas o artrosis. Cabe destacar que solo el 51% de los microARNs analizados se expresaba en al menos 12 muestras de las 16 analizadas, porcentaje muy inferior al de los microARN incluidos en el pool A.

Distribución de la expresión de los microARNs en el pool B	
Número de microARNs	Muestras en las que se expresa
104	16
19	15
26	14
24	13
23	12
16	11
13	10
22	9
20	8
12	7
13	6
9	5
19	4
20	3
13	2
16	1
12	0

Tabla 5. MicroARNs que se amplificaron eficazmente en las diferentes muestras.

En esta Tabla 6 vemos el valor medio de todos los Ct de los microARNs de cada muestra.

Valor medio de los Ct de los microARNs del pool B en cada una de las muestras analizadas		
Identificación de la muestra	Tipo	Ct
11	Artrosis	26,9
12	Artrosis	27,4
14	Artrosis	27,3
17	Artrosis	27
52	Artrosis	25,5
53	Artrosis	25,5
63	Artrosis	28,4
64	Artrosis	29,7
13	Fracturas	27,1
15	Fracturas	27,2
16	Fracturas	28
18	Fracturas	26,8
49	Fracturas	26,9
51	Fracturas	27,3
62	Fracturas	29,1
65	Fracturas	28,2

Tabla 6. Valor medio de todos los Ct de los microARNs de cada muestra. Se consideró que un miARN se expresaba en el tejido cuando el ciclo en el que se alcanzó ese umbral (Ct) era inferior a 35.

En el gráfico siguiente (Fig. 8) vemos cómo hubo diferencias estadísticamente significativas entre fracturas y artrosis en 4 de los microARNs del pool B (let-7i; miR-181a-2; miR-643; miR-524).

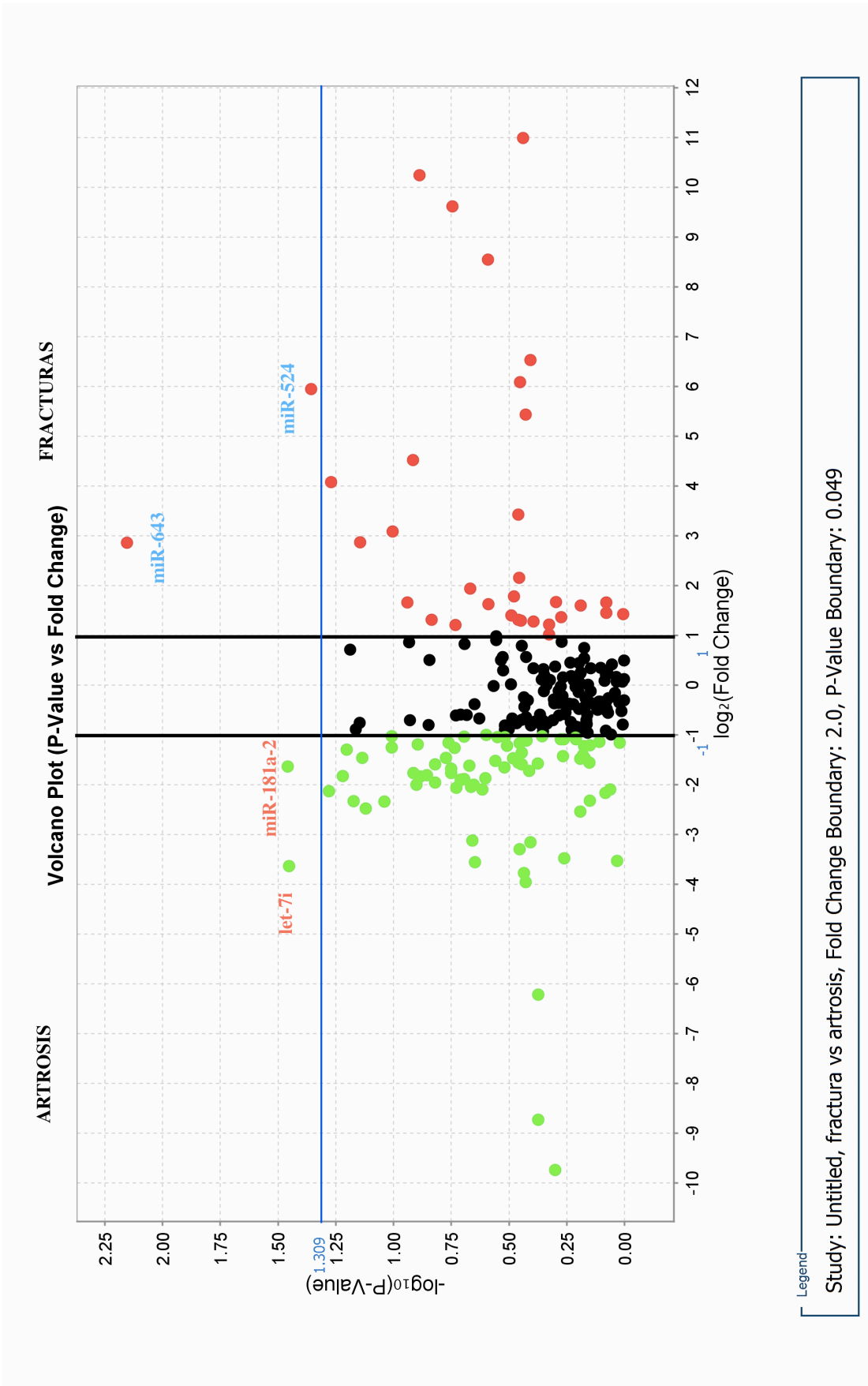


Fig. 8. Gráfico tipo volcán que muestra las diferencias de expresión de los microARNs en el pool A.

La Tabla 7 muestra la expresión de los microARNs en los que encontramos diferencias significativas entre fracturas y artrosis. En negrita se destaca el grupo (fractura, artrosis) en el que había una mayor expresión del microARN.

Expresión de los microARNs destacados en el pool B					
MicroARN	Tipo	Ct	$\Delta$ Ct	DE	p
Let-7i	<b>Artrosis</b>	28,6	0,8	0,5	0,035
	Fracturas	32	4,4	1,5	
miR-181a-2	<b>Artrosis</b>	25	-2,9	0,4	0,035
	Fracturas	27	-1,27	0,6	
miR-643	Artrosis	30,8	3,3	0,9	0,007
	<b>Fracturas</b>	28,4	0,4	0,6	
miR-524	Artrosis	33,6	5,6	1,6	0,044
	<b>Fracturas</b>	28	-0,3	2,3	

Tabla 7. Expresión de los microARNs en los que encontramos diferencias significativas entre fracturas y artrosis. Se consideró que un miARN se expresaba en el tejido cuando el ciclo en el que se alcanzó ese umbral (Ct) era inferior a 35.  $\Delta$ Ct: Ct de la muestra- Ct control; DE: Desviación estándar; p: Significación estadística

Posteriormente realizamos, aprovechando las bases de datos bioinformáticas disponibles en la red (DIANA-MicroT-CDS, miRIAD, RefGene, microRNA.org, miRDB, TargetScanHuman, PicTar), un análisis de los posibles genes diana de esos microARNs, en particular de los genes relacionados con el metabolismo óseo. De esta forma identificamos aquellos microARNs que eran candidatos potencialmente interesantes para las fases siguientes de nuestro estudio.

microARN	Gen	Base de datos	Homología (miRSV)
miR-187	WISP1	microRNA.org	-0,18
	FGF3	RefGene	
miR-330-5p	Runx2	microRNA.org	-1,45
	FGF1	TargetScan	-0,36
	Smad3	TargetScan	-0,31
	LRP6	miRIAD	-0,22
	HDAC5	PicTar	-0,81
	HDAC8	TargetScan	-0,15
miR-193a	NF- K $\beta$	PicTar	-0,88
miR-214	BMP2	TargetScan	-0,09
	CDH6	miRDB	
miR-636	Runx2	TargetScan	-0,25
	TGF- $\beta$	TargetScan	-012
miR-135a	TGF- $\beta$	miRDB	
miR-519d	BMP2	TargetScan	-0,31
miR-137	ACVR1	TargetScan	-0,11
	EFNB2	Targetscan	>-0,01
miR-518f	CTNBI	MicroRNA.org	-0,12
	EFNA4	miRDB	

Tabla 8. MicroARNs que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de artrosis y fracturas y los genes con los que se les ha relacionado bioinformáticamente. miRSV: grado de homología predicha entre el microARN y el gen.



La Tabla 8 incluye los microARNs que mostraron diferencias significativas entre los grupos de artrosis y fracturas y los genes con los que se les ha relacionado en las diferentes bases de datos bioinformáticas. Además nos muestra el grado de homología predicha que existe entre ellos (miRSV) según estas bases de datos. Este valor es una herramienta de predicción del grado de complementariedad entre los microARNs y los genes diana. Viene determinado por el número de pares de bases que tengan en común y de la energía libre de unión de los primeros 8 nucleótidos del extremo 5. Se suele considerar como punto de corte de un gen diana el que tiene valores inferiores a -1,2, aunque hay autores que utilizan valores algo más bajos, inferiores a -0,1 (88), dado que no está bien establecido cuál es el valor de corte ideal.

Entre los microARNs del pool B no encontramos que ninguno tuviera una relación destacable con genes del metabolismo óseo. Por esta razón no se analizó ninguno de los microARNs del pool B en las fases siguientes del estudio.

## 4.2. ANÁLISIS DE MICROARNs INDIVIDUALES EN HUESO

### 4.2.1. Características de la muestra

#### **Grupo de pacientes con fractura de cadera:**

Se incluyeron 19 casos, 1 hombre y 18 mujeres, con una edad media de  $78 \pm 4$  años (media  $\pm$  DE).

El tiempo desde la fractura hasta la cirugía fue de  $11 \pm 20$  días (media  $\pm$  DE).

El número de casos fallecidos en el primer año tras la cirugía fue de 5, un 26% (similar a lo que sucede en la población general en pacientes con fractura de cadera).

**Grupo de pacientes con coxartrosis:**

Se incluyeron 19 casos, 1 hombre y 18 mujeres, con una edad media de  $73 \pm 3$  años (media  $\pm$  DE).

El número de casos fallecidos en el primer año tras la cirugía fue de 1.

**Grupo control:**

Estaba formado por 6 sujetos, 4 hombres y 2 mujeres, con una edad media de  $75 \pm 14$  (media  $\pm$  DE)

En la Tabla 9 se muestra un resumen de las características de los diferentes grupos:

Tipo	Edad (media)	Sexo: mujer (%)	DM (%)	HTA (%)	DL (%)	Éxitus (%)	Días hasta IQ (media)	I.Charlson (media)
Fractura	78	95	28	67	28	26	11	5
Artrosis	73	95	11	72	28	5	-	4
Control	75	33	-	-	-	-	-	-

Tabla 9. Resumen de las características de la muestra a estudio. Edad: media de edad en años; Sexo: porcentaje de mujeres; DM: porcentaje Diabetes mellitus; HTA: porcentaje de hipertensión arterial; DL: porcentaje de dislipemias; Éxitus: porcentaje de éxitus en el primer año tras la cirugía; Días hasta la intervención; Índice de Charlson (sistema de valoración de la comorbilidad, que se ha relacionado con el pronóstico y la expectativa de vida en diferentes situaciones clínicas).

#### 4.2.2. Análisis de los microARNs

##### **MicroARNs seleccionados para la normalización:**

Para realizar la normalización de las muestras (ya explicado anteriormente), seleccionamos la media de la expresión de miR-let-7b y miR-222. Estos miARNs se expresaban de manera bastante constante en los tres grupos de sujetos estudiados, como se refleja en la tabla siguiente (tabla 10), en la que se muestran los Ct.

Tipo	Let-7b		miR-222		Promedio	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Fracturas	19,2	3,3	17,4	3,5	18,3	3,2
Artrosis	19,3	2,7	17,8	2,6	18,6	2,5
Control	18,5	1,4	16,8	1,9	17,6	1,5

Tabla 10. Expresión de miR-let-7b, miR-222 y su promedio en los grupos de artrosis, fracturas y controles. Se indican los Ct de cada microARN en cada uno de los tres grupos. DE: Desviación estándar.

##### **miARNs seleccionados para el estudio:**

Como se ha dicho, de los 9 microARNs cuya expresión mostraba diferencias significativas entre fracturas y artrosis, identificamos mediante análisis bioinformático aquéllos que tenían asociación con genes implicados en la biología ósea, y aquéllos que manifestaban esas diferencias de forma más consistente. De esta manera, seleccionamos 5 microARNs: miR-187, miR-193a-3p, miR-636, miR-518f y miR-210. Este último microARN fue incluido porque, una vez iniciado este estudio, se publicó un artículo que lo relacionaba con algunas enfermedades óseas (70), al tiempo que en el ensayo con

miniarrays se observó una diferencia entre artrosis y fracturas próxima a la significación estadística.

➤ Análisis de los microARNs individuales:

Los resultados de los análisis de asociación de los microARNs y los grupos estudiados (fracturas osteoporóticas de cadera, coxartrosis y control) se exponen a continuación. Para cada microARN realizamos un análisis cualitativo y un análisis cuantitativo.

- Análisis cualitativo de los microARNs: establecimos como punto de corte de la PCR cuantitativa un valor de Ct de 35, entendiendo como ausencia de expresión los casos con Ct igual o superior a 35; mientras que se consideró que el microARN se expresaba en los casos con Ct inferiores a 35. El análisis estadístico de resultados se realizó mediante un test de Chi-cuadrado (Tabla 11).

- miR-636: globalmente se expresó en el 96% de las muestras, incluyendo 100% de las fracturas, en el 90% de las artrosis y en el 100% de los controles. La odds ratio entre fracturas y artrosis fue de 1,12 con un intervalo de confianza de 0,96-1,30 ( $p=0,49$ ). (Fig. 9).

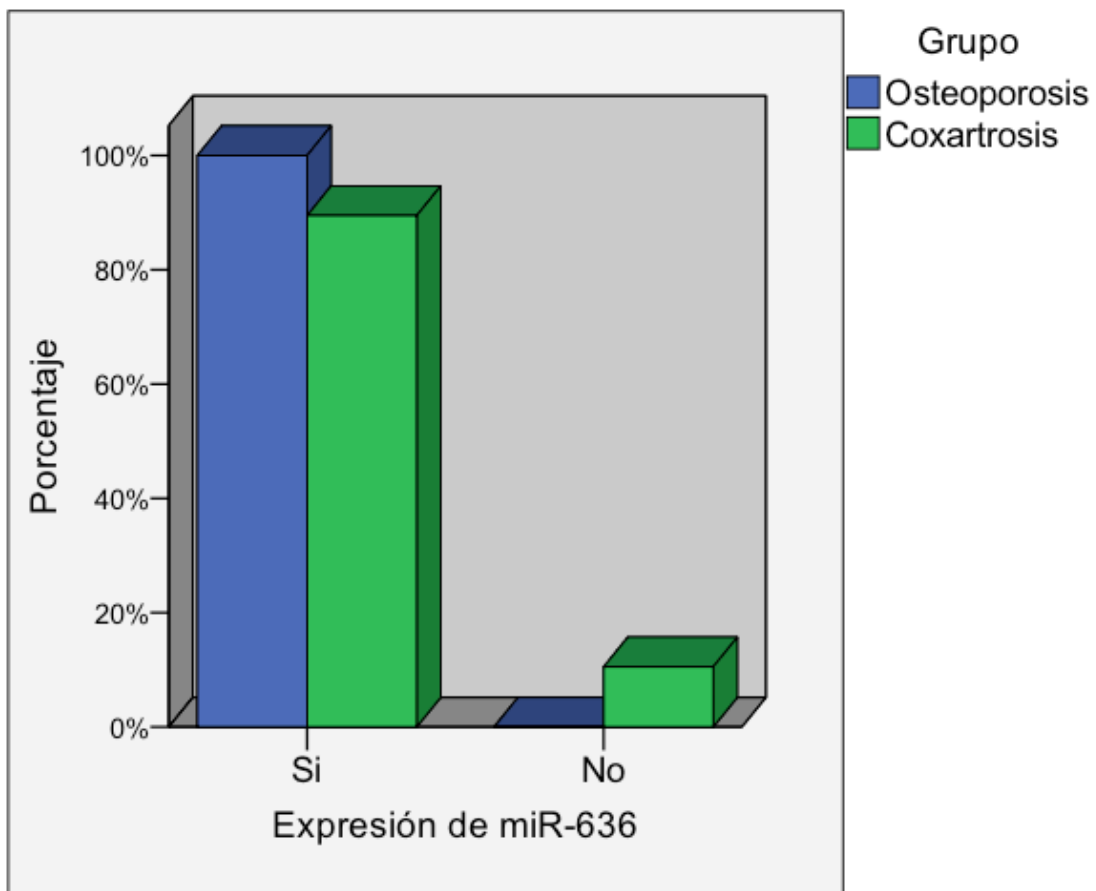


Fig. 9. Representación gráfica de miR-636 en los diferentes grupos (fracturas osteoporóticas y coxartrosis)

- miR-210: se expresó en el 96% de las muestras de hueso estudiadas. Por grupos, se detectó en el 95% de las fracturas, en el 95% de las artrosis y en el 100% de los controles. La odds ratio entre fracturas y artrosis fue de 1 con un intervalo de confianza de 0,06-17,25 ( $p= 1$ ). (Fig. 10).

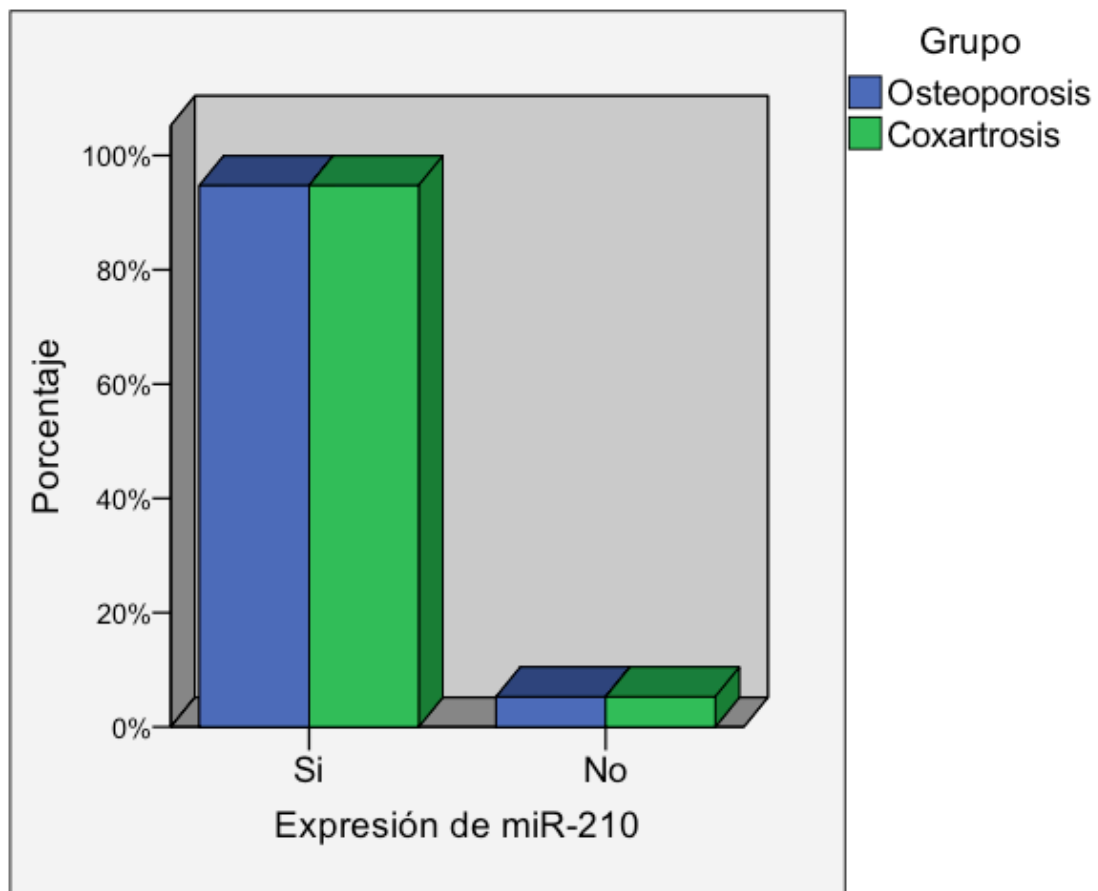


Fig. 10. Representación gráfica de miR-210 en los diferentes grupos (fracturas osteoporóticas y coxartrosis)

- miR-518f: se expresó en el 57% de los casos; en el 74% de las fracturas, en el 37% de las artrosis y en el 67% de los controles. La odds ratio entre fracturas y artrosis fue de 4,80 con un intervalo de confianza de 1,20-19,13 ( $p= 0,049$ ). Por lo tanto, podemos decir que miR-518f se expresa más frecuentemente en el grupo de fracturas que en el de artrosis, siendo la diferencia estadísticamente significativa (Fig. 11).

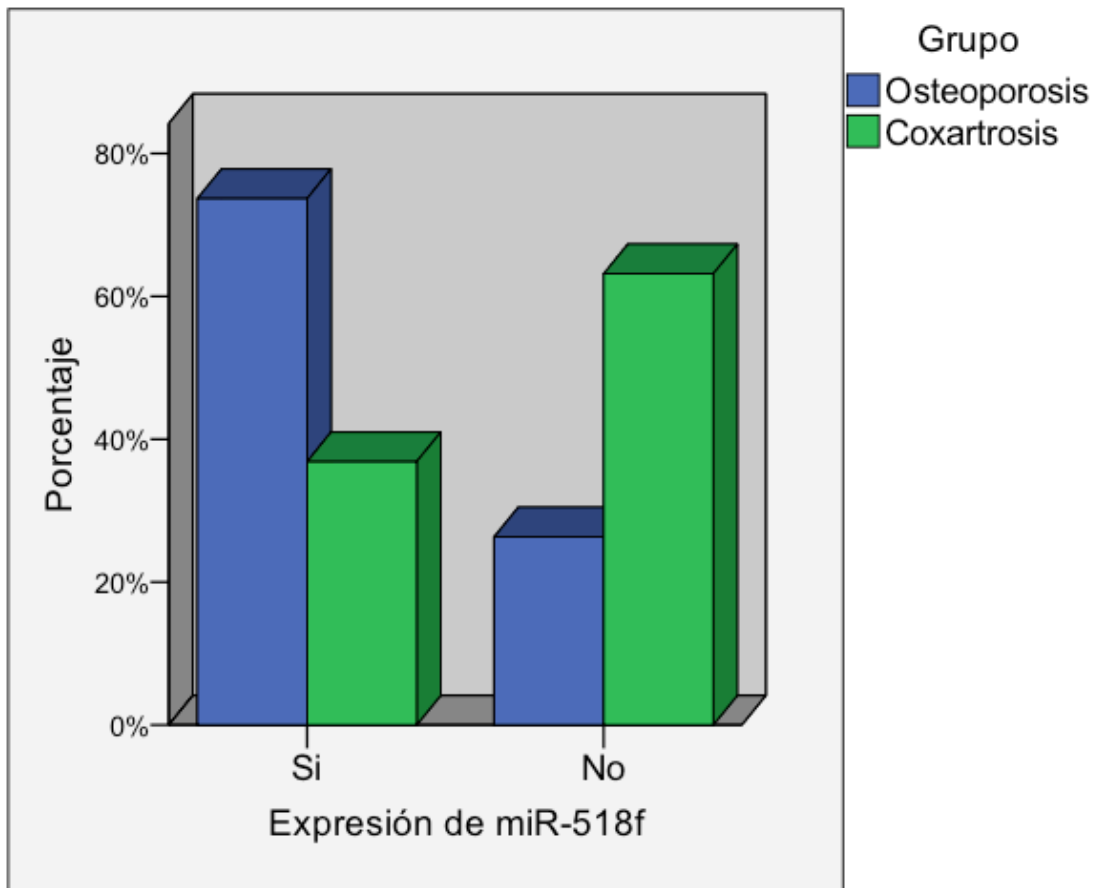


Fig. 11. Representación gráfica de miR-518f en los diferentes grupos (fracturas osteoporóticas y coxartrosis)

- miR-193a-3p: se detectó su expresión en el 86% de los casos. Por grupos, se detectó en el 84% de las fracturas, en el 84% de las artrosis y en el 100% de los controles. La odds ratio entre fracturas y artrosis fue de 1 con un intervalo de confianza de 0,18-5,72 ( $p= 1$ ). (Fig. 12).

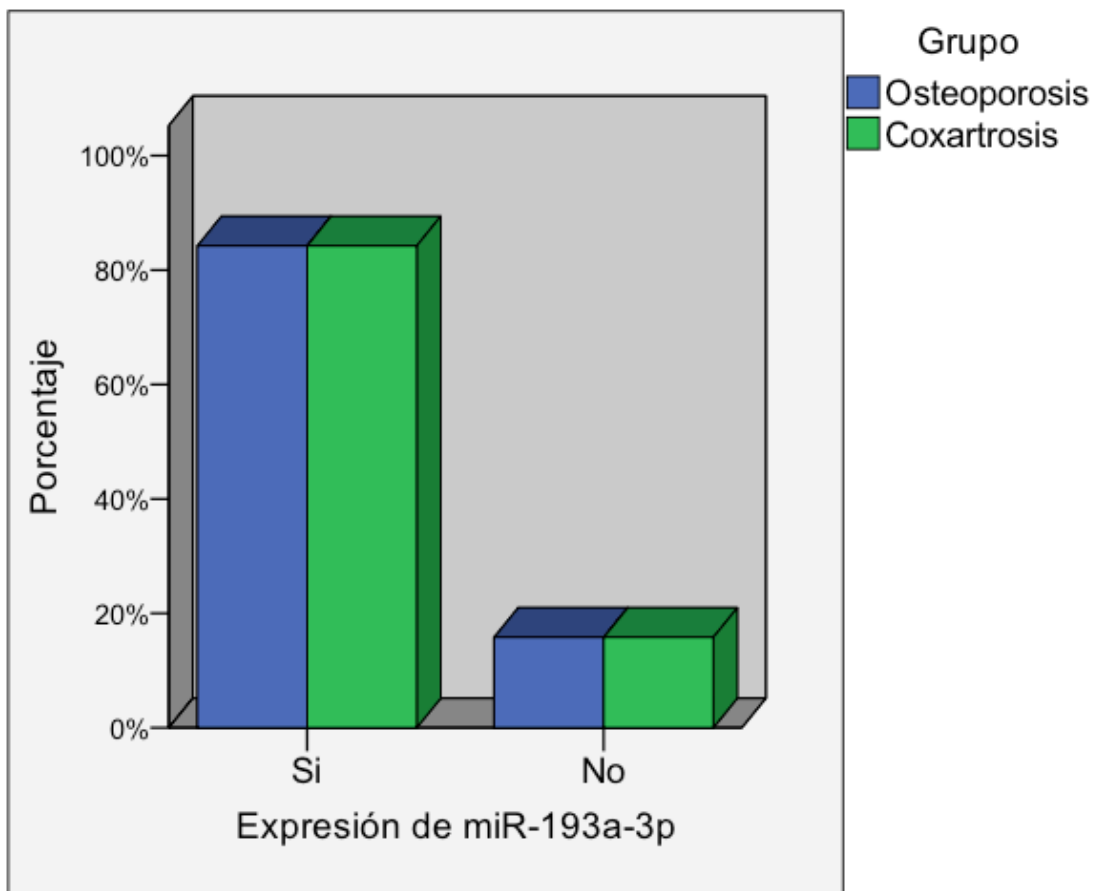


Fig. 12. Representación gráfica de miR-193a-3p en los diferentes grupos (fracturas osteoporóticas y coxartrosis)



- miR-187: se expresó en el 84% de los casos, incluyendo el 74% de las fracturas, el 90% de las artrosis y el 100% de los controles. La odds ratio entre fracturas y artrosis fue de 0,33 con un intervalo de confianza de 0,06-1,97 ( $p= 0,405$ ). (Fig. 13).

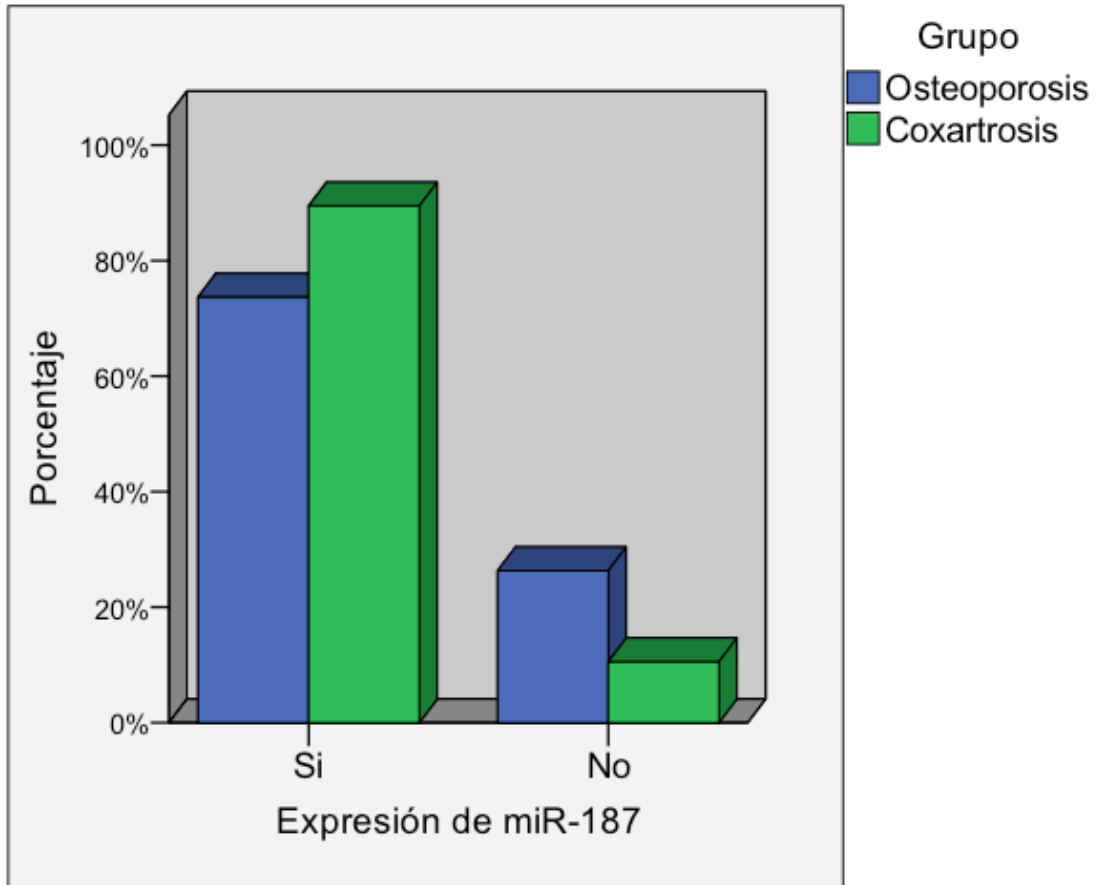


Fig. 13. Representación gráfica de miR-187 en los diferentes grupos (fracturas osteoporóticas y coxartrosis)

MicroARN	OR (IC-95%)	p
miR-636	1,1 (1,0-1,3)	0,49
miR-210	1,0 (0,1-17,3)	1
miR-193a-3p	1,0 (0,2-5,7)	1
<b>miR-518f</b>	<b>4,8 (1,2-19,1)</b>	<b>0,049</b>
miR-187	0,3 (0,1-2,0)	0,405

Tabla 11: Chi-cuadrado: Asociación cualitativa de los microARNs y los grupos fracturados y artrósicos. OR: Odds ratio; IC-95%: intervalo de confianza del 95% para la odds ratio; p: Significación estadística.

- Análisis cuantitativo de los microARNs: el análisis de resultados de la PCR cuantitativa mediante ensayos individuales se realizó mediante un test de t-student para la media de  $\Delta\text{Ct}$  (diferencia en los ciclos umbral entre el microARN de interés y los microARN control) y mediante un test de U-Mann Whitney para el  $2^{\Delta\text{Ct}}$  (que equivale a la abundancia relativa del microARN de interés en comparación con los microARN control).

- miR-636: la expresión valorada como  $\Delta\text{Ct}$  fue de  $9,6 \pm 3,1$  (media  $\pm$  DE) en el grupo de fracturados,  $11,0 \pm 3,4$  en las artrosis y  $11,8 \pm 1,7$  en los controles. La abundancia relativa, valorada como  $2\Delta\text{Ct}$  fue de  $3.573,6 \pm 7.798,1$  para los fracturados,  $25.931,3 \pm 67.180,8$  en las artrosis y  $5.628,4 \pm 5.773,6$  en los controles. No encontramos diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ninguno de los grupos (Fig. 14).

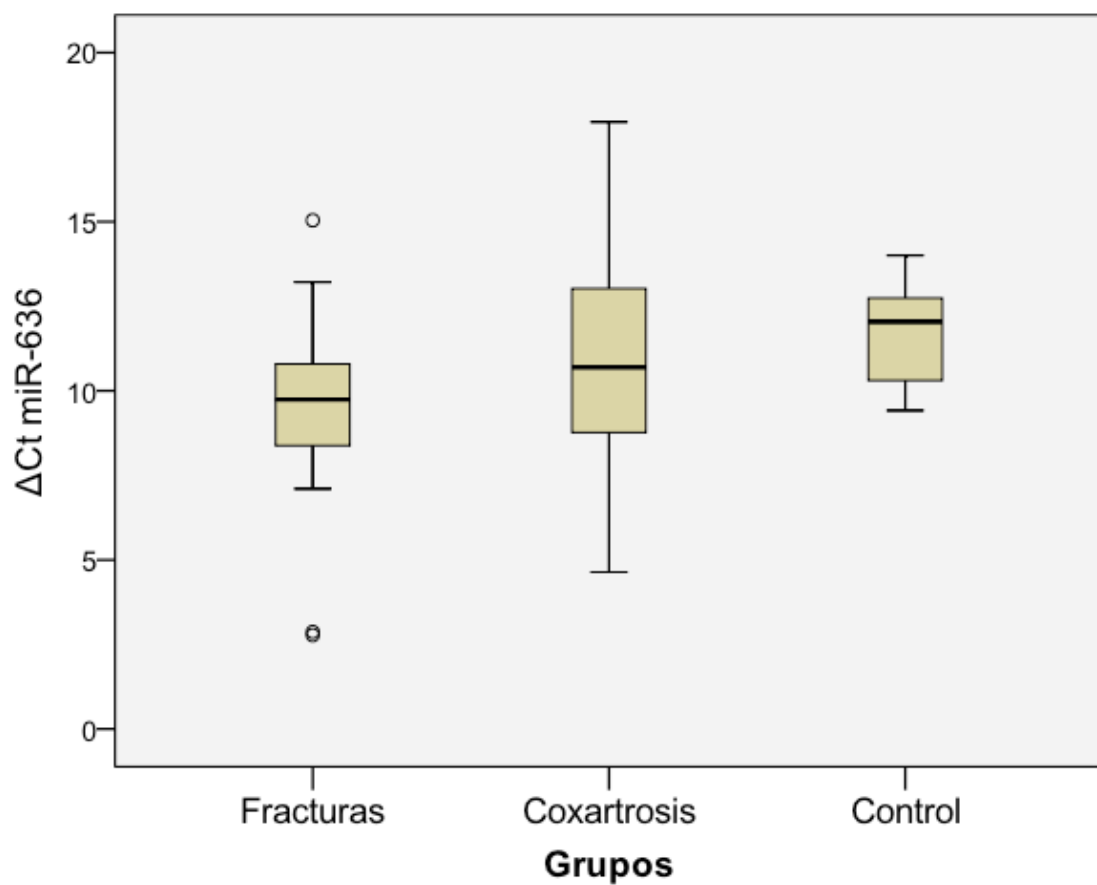


Fig. 14. Análisis cuantitativo de miR-636 según la expresión valorada como  $\Delta\text{Ct}$  en los grupos de fracturas, coxartrosis y control. La figura representa la mediana, los percentiles 3, 25, 75 y 97 y los casos extremos (“outliers”).

- miR-210: la expresión valorada como  $\Delta\text{Ct}$  de miR-210 fue de  $5,9 \pm 2,7$  (media  $\pm$  DE) para las fracturas,  $6,8 \pm 2,6$  para las artrosis y  $6,3 \pm 1,9$  para los controles. La abundancia relativa, valorada como  $2\Delta\text{Ct}$ , fue de  $275,0 \pm 531,6$  para las fracturas,  $473,3 \pm 986,1$  para las artrosis y  $146,0 \pm 168,9$  para los controles. No encontramos diferencias significativas entre los grupos (Fig. 15).

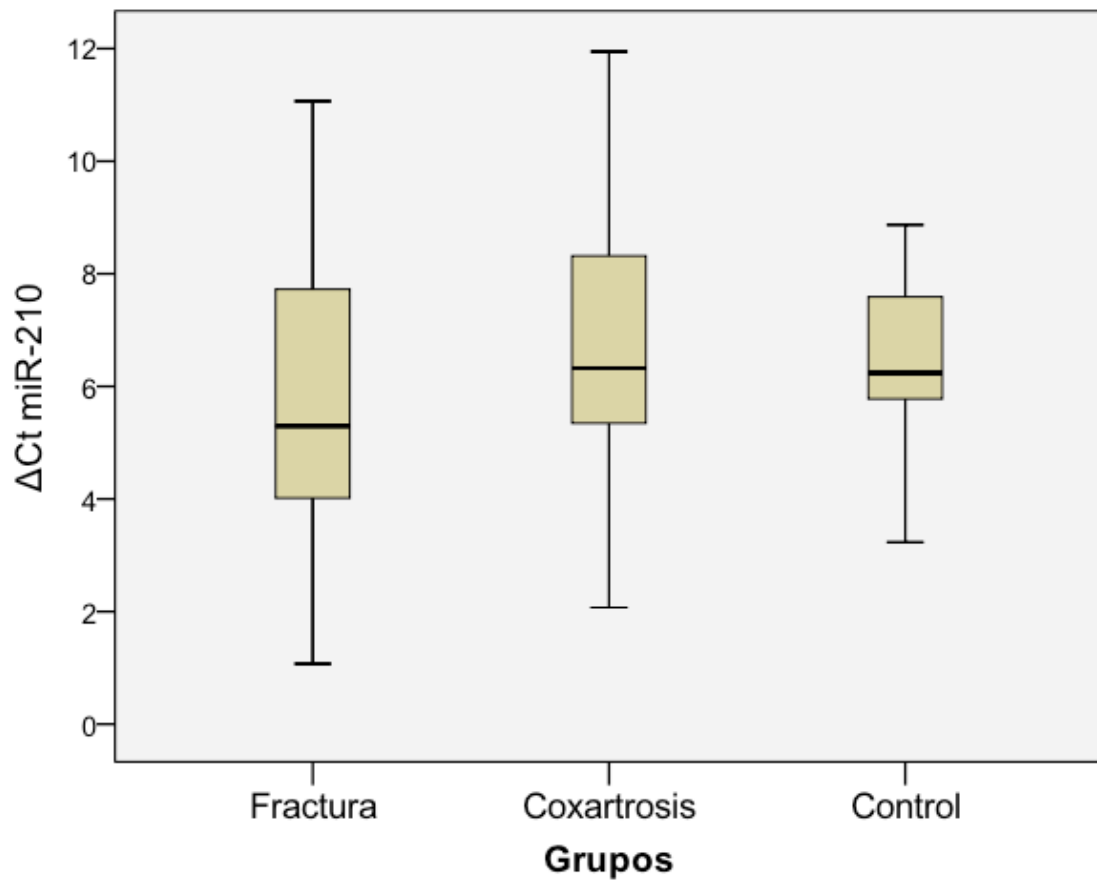


Fig. 15. Análisis cuantitativo de miR-210 según la expresión valorada como  $\Delta\text{Ct}$  en los grupos de fracturas, coxartrosis y control. La figura representa la mediana y los percentiles 3, 25, 75 y 97.

- miR-518f: la expresión media valorada como  $\Delta Ct$  de miR-518f fue de  $13,2 \pm 4,2$  para las fracturas,  $15,9 \pm 3,0$  para las artrosis y  $17,3 \pm 3$  para los controles. La abundancia relativa, valorada como  $2\Delta Ct$ , fue de  $113.026,4 \pm 213.812,8$  para las fracturas,  $400.545,5 \pm 927.482,8$  para las artrosis y  $753.789,6 \pm 1.102.994,0$  para los controles. Al comparar los 3 grupos mediante el test de Kruskal-Wallis observamos que las diferencias entre ellos globalmente no alcanzaban la significación estadística, pero quedaban al borde del umbral convencional de significación ( $p=0,052$ ). Tras esto aplicamos el test de U-Mann Whitney y observamos que había diferencias significativas ( $p<0,05$ ) en la expresión de miR-518f entre el grupo de fracturados y artrosis ( $p=0,046$ ) y muy próxima a la significación estadística en fracturados frente a controles ( $p=0,065$ ), con una mayor expresión en el grupo de fracturados (Fig.16).

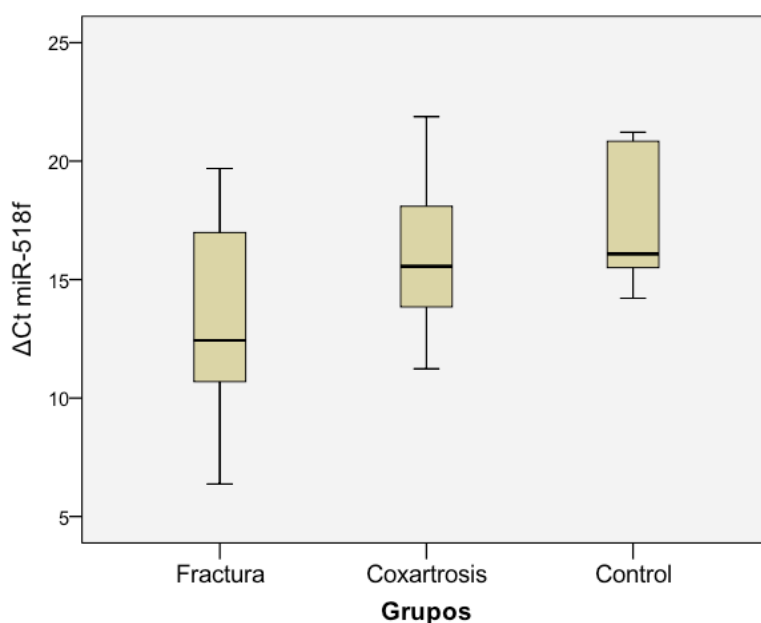


Fig. 16. Análisis cuantitativo de miR-518f según la expresión valorada como  $\Delta Ct$  en los grupos de fracturas, coxartrosis y control. La figura representa la mediana y los percentiles 3, 25, 75 y 97.

- miR-193a-3p: la expresión media valorada como  $\Delta\text{Ct}$  de miR-193a-3p fue de  $10,9 \pm 4,3$  para las fracturas,  $9,1 \pm 4,1$  para las artrosis y  $8,7 \pm 2,0$  para los controles. La abundancia relativa, valorada como  $2\Delta\text{Ct}$  fue de  $75.243,9 \pm 208.741,8$  para las fracturas,  $46.783,1 \pm 188.567,2$  para las artrosis y  $900,7 \pm 1.321,4$  para los controles. No encontramos diferencias significativas entre ninguno de los grupos analizados (Fig.17)

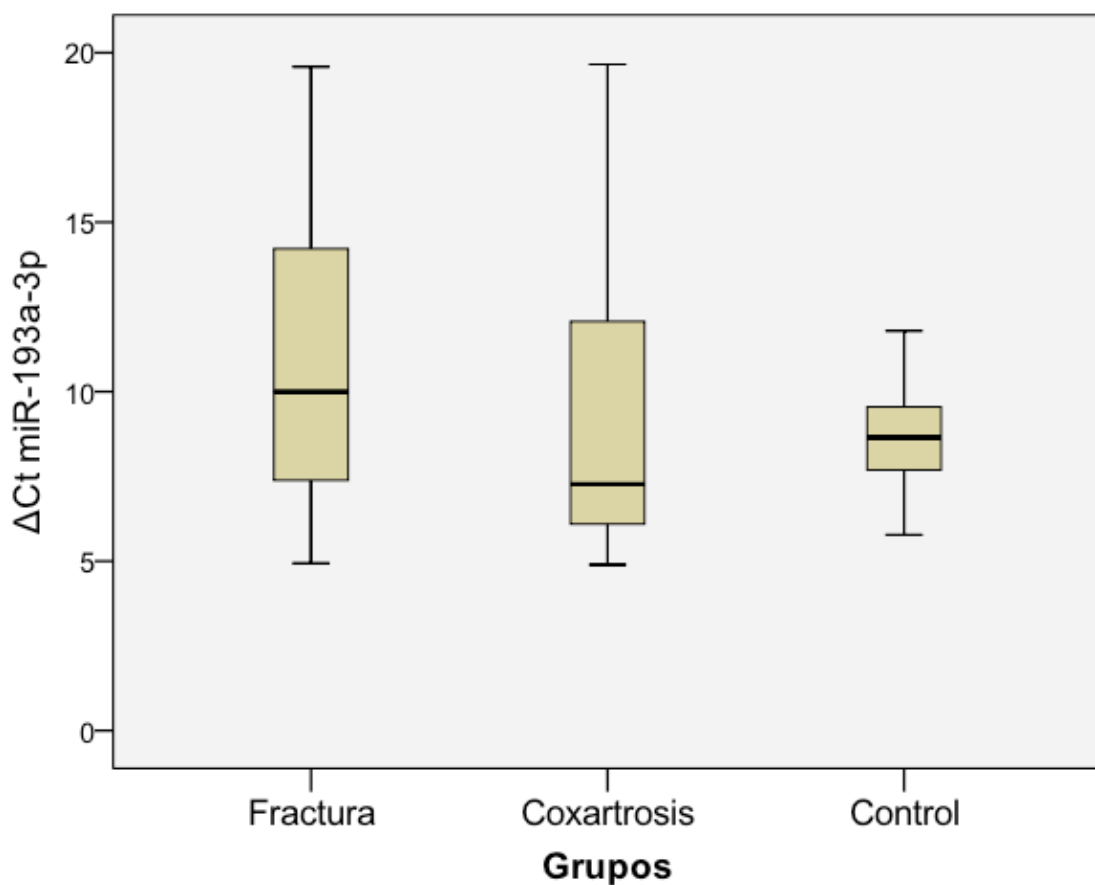


Fig. 17. Análisis cuantitativo de miR-193a-3p según la expresión valorada como  $\Delta\text{Ct}$  en los grupos de fracturas, coxartrosis y control. La figura representa la mediana y los percentiles 3, 25, 75 y 97.

- miR-187: la expresión valorada como  $\Delta\text{Ct}$  de miR-187 fue de  $14,2 \pm 3,9$  para las fracturas,  $10,4 \pm 3,3$  para las artrosis y  $13,2 \pm 2,1$  para los controles. La abundancia relativa, valorada como  $2\Delta\text{Ct}$ , fue de  $248.277,2 \pm 612.039,1$  para las fracturas,  $84.123,8 \pm 348.987,7$  para las artrosis y  $23.276,7 \pm 35.385,3$  para los controles. Al aplicar el test de Kruskal-Wallis observamos como había diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,004$ ). Tras esto aplicamos el test de U-Mann Whitney y observamos que había diferencias significativas en los niveles de miR-187 entre fracturas y artrosis ( $p=0,002$ ), con una mayor expresión en el grupo de artrosis, y en artrosis frente a controles ( $p=0,031$ ) (Fig. 18).

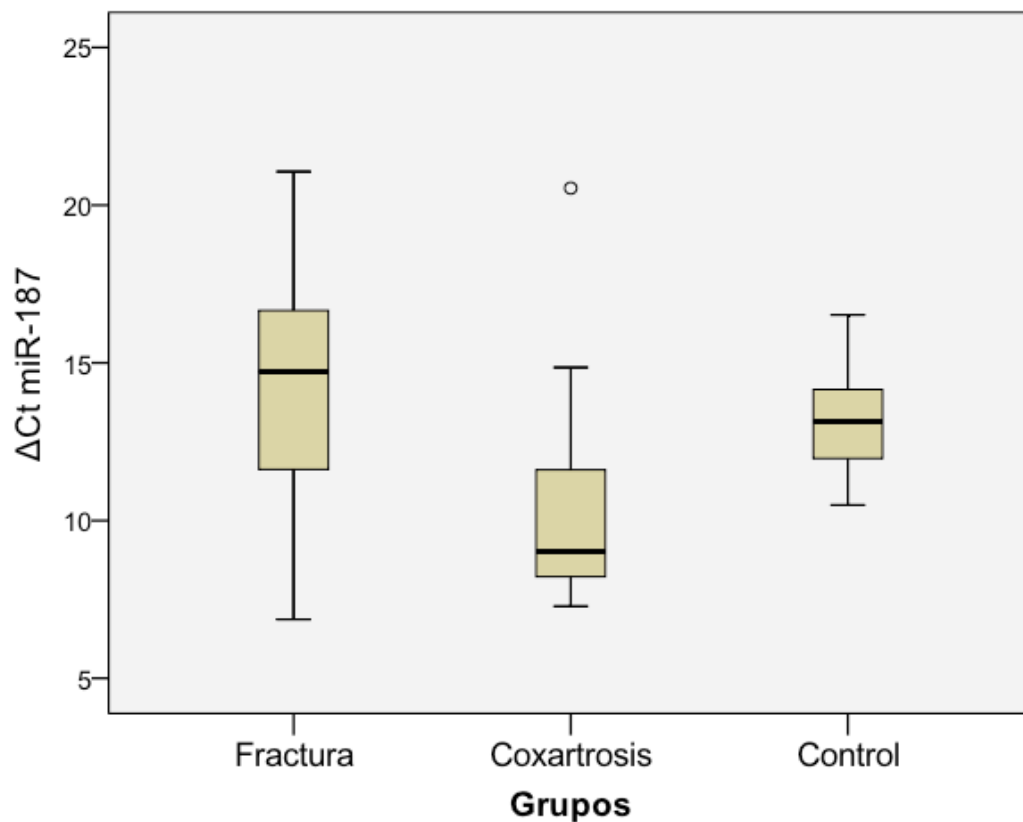


Fig. 18. Análisis cuantitativo de miR-187 según la expresión valorada como  $\Delta\text{Ct}$  en los grupos de fracturas, coxartrosis y control. La figura representa la mediana, los percentiles 3, 25, 75 y 97 y los casos extremos (“outliers”).

Estos resultados de los análisis de asociación de la expresión de los microARNs y los grupos de estudio (osteoporosis, artrosis y control) se resumen en la siguiente tabla (Tabla 12).

T- student: Análisis de $\Delta$ Ct de los microARNs y los grupos de estudio (Fracturas (F), artrosis (A) y control (C))						
MicroARN	Grupo	Media	Desviación estándar	p		
				F vs A	F vs C	A vs C
miR-636	Fracturas	9,6	3,1	0,179	0,109	0,609
	Artrosis	11,0	3,4			
	Control	11,8	1,7			
miR-210	Fracturas	5,9	2,7	0,332	0,735	0,708
	Artrosis	6,8	2,6			
	Control	6,3	1,9			
miR-193a-3p	Fracturas	10,9	4,3	0,184	0,239	0,833
	Artrosis	9,1	4,1			
	Control	8,7	2,0			
<b>miR-518f</b>	Fracturas	13,2	4,2	<b>0,029</b>	<b>0,035</b>	0,316
	Artrosis	15,9	3,0			
	Control	17,3	3,0			
<b>miR-187</b>	Fracturas	14,2	3,9	<b>0,003</b>	0,576	<u>0,064</u>
	Artrosis	10,4	3,3			
	Control	13,2	2,1			



U-Mann Whitney: Análisis de 2ΔCt de los microARNs y los grupos de estudio (Fracturas (F), artrosis (A) y control (C))						
MicroARN	Tipo	Media	Desviación estándar	p		
				F vs A	F vs C	A vs C
miR-636	Fracturas	3.573,6	7.798,1	0,237	0,065	0,408
	Artrosis	25.931,3	67.180,8			
	Control	5.628,4	5.773,6			
miR-210	Fracturas	275,0	531,6	0,300	0,66	0,899
	Artrosis	473,3	986,1			
	Control	146,0	168,9			
miR-193a-3p	Fracturas	75.243,9	208.741,8	0,140	0,309	0,611
	Artrosis	46.783,1	188.567,2			
	Control	900,7	1.321,4			
<b>miR-518f</b>	Fracturas	113.026,4	213.812,8	<b>0,046</b>	<b>0,065</b>	0,34
	Artrosis	400.545,5	927.482,8			
	Control	753.789,6	1.102.994			
<b>miR-187</b>	Fracturas	248.277,2	612.039,1	<b>0,002</b>	0,525	<b>0,031</b>
	Artrosis	84.123,8	348.987,7			
	Control	23.276,7	35.385,3			

Tabla 12. Asociación entre microARNs y la muestra a estudio: osteoporosis (Fracturados); artrosis; control. F: Fracturados; A: Artrosis; C: Control; p: Significación estadística.

También analizamos la posible interacción entre los microARNs y su efecto combinado. Como se muestra en la Tabla 13 y la Figura 19, observamos

que había un mayor número de pacientes con fracturas osteoporóticas con expresión conjunta para miR-187 y miR-518f (Ct<35), que cuando solo se expresaba miR-518f. Es decir, la expresión de miR-518f se asociaba más claramente a las fracturas en el grupo de los sujetos que también expresaban miR-187 que en los que no expresaban este último microARN. Así, el grupo de pacientes que expresaban miR-518f y miR-187 presentaba una odds ratio de 11,0 con un intervalo de confianza al 95% de 1,8-66,4 (en comparación con los que expresaban miR-187 pero no expresaban miR-518f); mientras que el grupo de pacientes que expresaba miR-518f y no expresaba miR-187 presentaba una odds ratio de 0,7 y un intervalo de confianza al 95% de 0,0-18,1 (en comparación con los que no expresaban ninguno de los dos miARN).

		miR-518f		OR (IC-95%)
		+	-	
miR-187 +	Fractura	12	2	11,0 (1,8-66,4)
	Coxartrosis	6	11	
miR-187 -	Fractura	2	3	0,7 (0,0-18,1)
	Coxartrosis	1	1	

Tabla 13. La tabla representa el número de pacientes que expresaban o no miR-187 y miR-518f comparando fracturas frente a coxartrosis. Podemos observar como hay un mayor número de muestras que expresan conjuntamente miR-187 y miR-518f en el grupo de fracturados. OR: Odds ratio; IC-95%: Intervalo de confianza del 95% para la Odds ratio.

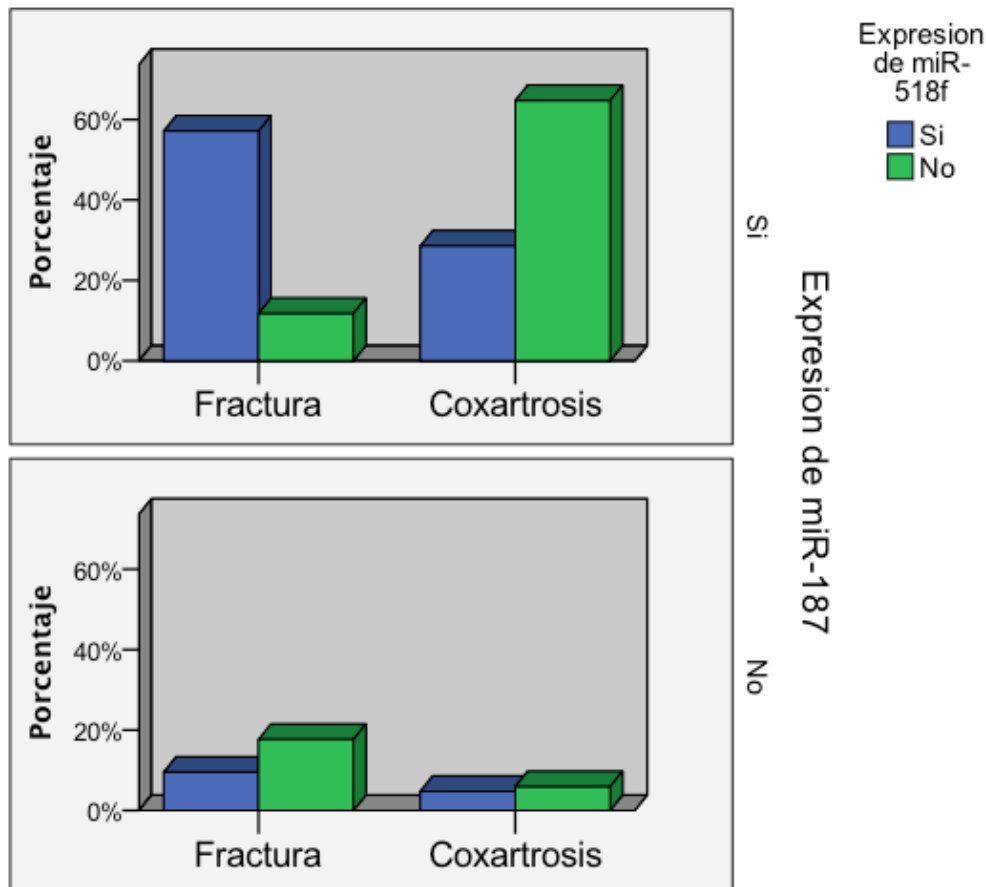


Fig. 19. La gráfica representa el número de pacientes que expresaban o no de miR-187 y miR-518f comparando fracturas frente a coxartrosis. Podemos observar como hay un mayor número de muestras que expresan conjuntamente miR-187 y miR-518f en el grupo de fracturados.

Además realizamos un análisis de asociación entre los microARN y diversas características de los pacientes (edad, sexo, presencia o no de factores de riesgo cardiovascular (diabetes mellitus, dislipemia, hipertensión arterial, hiperuricemia), fallecimiento o no, índice de Charlson), sin encontrar relaciones significativas.

#### ➤ Análisis de miR-214

Por razones presupuestarias que obligaban a limitar el número de análisis, en un primer momento no seleccionamos miR-214 para la fase de replicación, a pesar de que en nuestros estudios con miniarrays mostraba

diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de fracturas y el grupo de artrosis, con una mayor expresión en los artrósicos ( $p=0,016$ ). Sin embargo, a raíz de la publicación del estudio de Wang (Nature, Diciembre 2012) (67), decidimos ampliar nuestro trabajo e incluir este microARN en el análisis con la intención de confirmar o refutar los resultados del mencionado estudio.

Las características de la muestra seleccionada incluyó los mismos sujetos anteriormente descritos, pero incrementamos el tamaño muestral como se expone a continuación:

#### **Grupo fracturados:**

Se incluyeron 24 muestras de hueso en pacientes con fracturas de cadera, 1 varón y 23 mujeres, con una edad media de  $78 \pm 5$  años (media  $\pm$  DE).

#### **Grupo artrosis:**

Se incluyeron 27 sujetos, 1 varón y 26 mujeres, con una edad media de  $75 \pm 5$  años (media  $\pm$  DE).

#### **Grupo control:**

Se incluyeron 6 muestras, 4 varones y 2 mujeres, con una edad media de  $75 \pm 14$  años (media  $\pm$  DE).

#### Análisis de miR-214

Los resultados de los análisis de asociación entre los niveles de miR-214 y la muestra a estudio (fracturas, artrosis y control) fueron:

- miR-214: la expresión media valorada como  $\Delta Ct$  de miR-214 fue de  $2,3 \pm 2,0$  para las fracturas,  $1,6 \pm 1,2$  para las artrosis y  $2,3 \pm 0,6$  para los controles. La abundancia relativa, valorada como  $2\Delta Ct$  fue de  $11,9 \pm 18,2$  para las fracturas,  $4,2 \pm 4,8$  para las

artrosis y  $5,2 \pm 2,3$  para los controles. No encontramos diferencias significativas entre ninguno de los grupos analizados (Tabla 14 y Fig. 20). Tampoco encontramos diferencias cualitativas estadísticamente significativas al comparar la expresión o no de miR-214. Establecimos como punto de corte de la PCR cuantitativa un valor de Ct de 35, entendiendo como ausencia de expresión los casos con Ct igual o superior a 35; mientras que se consideró que el microARN se expresaba en los casos con Ct inferiores a 35.

T- student: Análisis de $\Delta$ Ct de los microARNs y la muestra a estudio (Fracturas (F), artrosis (A) y control (C))						
MicroARN	Grupo	Media	Desviación estándar	p		
				F vs A	F vs C	A vs C
miR-214	Fracturas	2,3	2,0	0,119	0,98	0,173
	Artrosis	1,6	1,2			
	Control	2,3	0,6			
U-Mann Whitney: Análisis de $2\Delta$ Ct de los microARNs y la muestra a estudio						
MicroARN	Grupo	Media	Desviación estándar	p		
				F vs A	F vs C	A vs C
miR-214	Fracturas	11,9	18,2	0,136	0,756	0,062
	Artrosis	4,2	4,8			
	Control	5,2	2,3			

Tabla 14. Asociación entre microARNs y la muestra a estudio: fracturas; artrosis; control. F: Fracturados; A: Artrosis; C: Control; p: Significación estadística.

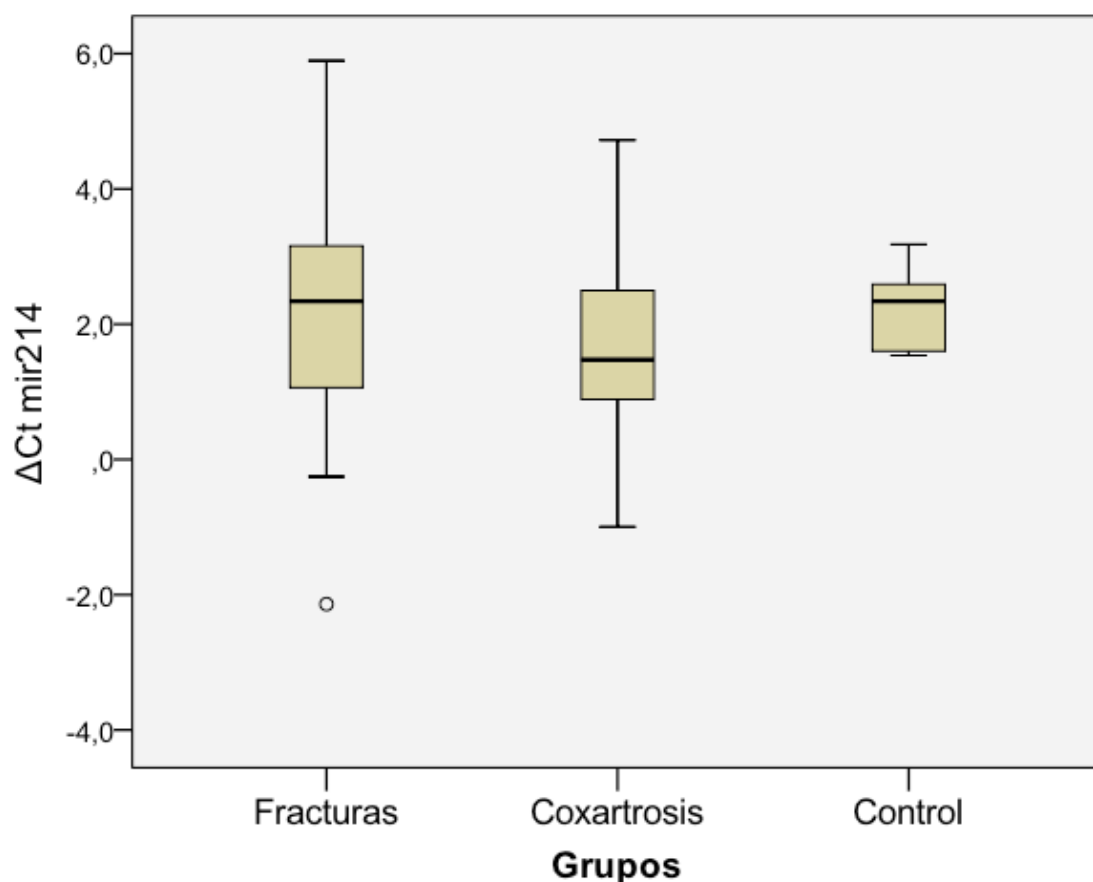


Fig. 20. Análisis cuantitativo de miR-214 según la expresión valorada como  $\Delta Ct$  en los grupos de fracturas, coxartrosis y control. La figura representa la mediana, los percentiles 3, 25, 75 y 97 y los casos extremos (“outliers”).

No realizamos un análisis cualitativo comparativo de los datos, como en las otras muestras, ya que en el 100% de las muestras (fracturas, coxartrosis y controles) presentaron valores de Ct inferiores a 35.

Realizamos un análisis de asociación entre la expresión de miR-214 y las características generales de los pacientes (como se ha mencionado anteriormente) sin encontrar relaciones estadísticamente significativas.

Wang y sus colaboradores realizaron un análisis comparativo de los niveles de miR-214 por subgrupos de edad donde encontraron diferencias significativas, nosotros debido a un menor tamaño muestral, hicimos el análisis

por subgrupos de edad sin diferenciar por el sexo con rangos de edad establecidos como se expone a continuación: 63-71 años, n=2; 72-80, n=15; 81-88, n=7. No encontramos diferencias significativas. Además realizamos un análisis de correlación entre miR-214 y la edad en pacientes fracturados, con el resultado que se muestra en la Figura 21.

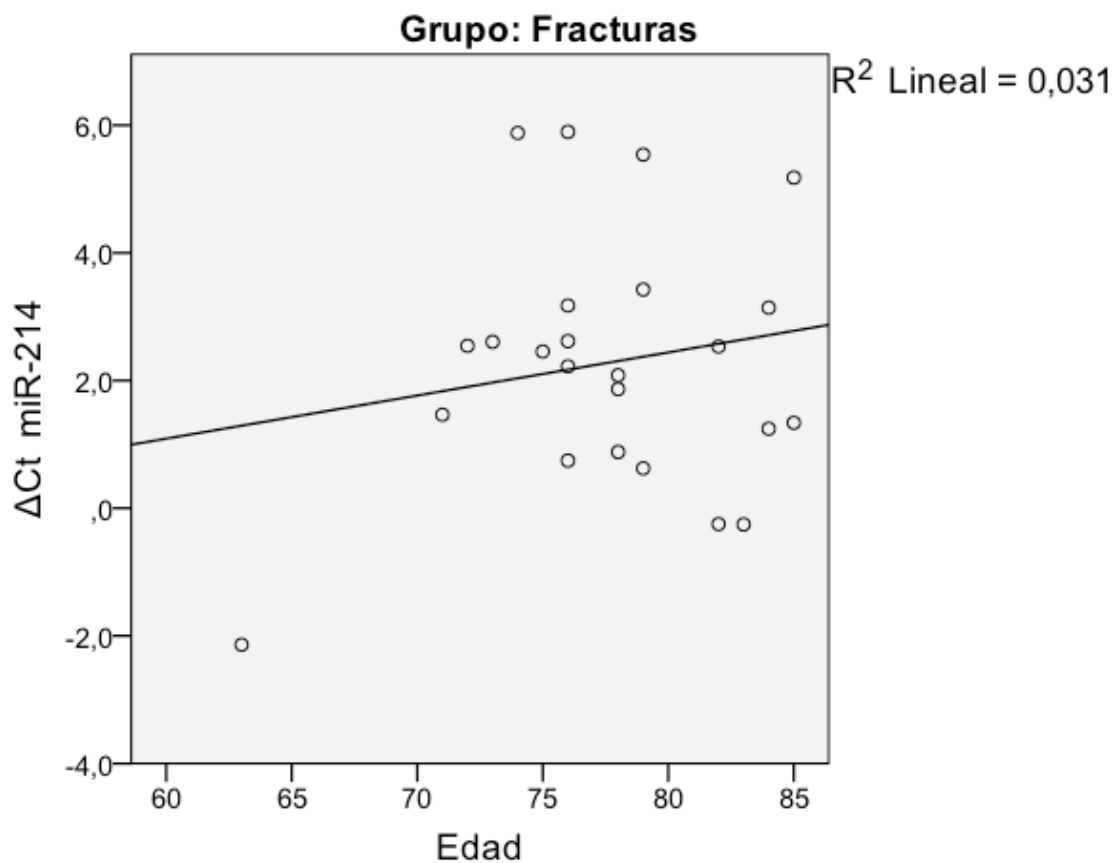


Fig. 21. Análisis de correlación entre miR-214 y la edad en pacientes fracturados.

La figura muestra una mala correlación entre estas dos variables en este grupo de pacientes y un bajo coeficiente de determinación ( $r^2=0,031$ ). Además estos resultados son opuestos a los de Wang, ya que muestra una relación inversa de los niveles de miR-214 con respecto a la edad.

### 4.3. ANÁLISIS DE LOS MICROARNs EN SUERO

#### 4.3.1. Características de la muestra

##### **Grupo fracturados:**

Incluimos 4 muestras de suero de mujeres con una edad media de  $78 \pm 4$  años (media  $\pm$  DE).

##### **Grupo artrosis:**

Seleccionamos 4 muestras, 1 varón y 3 mujeres, con una edad media de  $77 \pm 7$  años (media  $\pm$  DE).

Las muestras de suero seleccionadas eran de alguno de los pacientes que habían sido analizados anteriormente en hueso.

#### 4.3.2. Análisis de los microARNs

Analizamos la expresión de miR-187 y miR-518f, dado que eran los microARNs que mostraban diferencias significativas entre fracturas y artrosis en hueso.

En este caso la normalización se realizó solo con miR-222, ya que let-7b no era homogéneo entre los grupos en suero. Es decir, los niveles de expresión de let-7b no se mantenían constantes entre los grupos y además en alguna de las muestras no se detectaba la expresión de este microARN (Ct>35).

##### ➤ Análisis de resultados:

Los resultados de los análisis de asociación entre los microARNs y los grupos de estudio (osteoporosis y artrosis) se exponen a continuación:

- miR-518f: Al igual que observamos en el hueso, los niveles séricos tendían a ser algo mayores en las muestras de pacientes con fracturas que en las de los pacientes con artrosis. Sin



embargo, la diferencia estaba muy lejos de la significación estadística ( $p=0,69$ ).

- mir-187: Este microARN no se detectó en ninguna de las muestras de suero analizadas (Tabla 15).

T- student: Análisis de $\Delta$ Ct de los microARNs y la muestra a estudio en suero (Fracturas (F) y artrosis (A))				
MicroARN	Grupo	Media	Desviación típica	p F vs A
miR-518f	Fracturas	11,46	7,77	0,687
	Artrosis	13,57	6,21	
miR-187	Fracturas	-	-	-
	Artrosis	-	-	

Tabla 15. Asociación entre microARNs y la muestra a estudio en suero: osteoporosis (fracturados); artrosis. F: fracturados; A: Artrosis; p: Significación estadística.

Dado que se analizó un menor número de muestras de suero que de hueso y que no pudimos seleccionar las muestras de suero en función de la mejor expresión en hueso debido a que en la seroteca no disponíamos de muestras de todos los pacientes, el siguiente paso que realizamos fue comparar si las muestras analizadas en suero mostraban diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de hueso y si había algún tipo de relación entre los resultados de hueso y suero.

- miR-518f: No encontramos diferencias significativas entre fracturas y artrosis en suero ni en hueso en las muestras analizadas, pero al igual que sucedió en el conjunto total de las

muestras de hueso, en este subgrupo se observó una cierta tendencia a una mayor expresión en el grupo de fracturas que en el de artrosis, análoga a la observada en el suero (Tabla 16)

- miR-187: El subgrupo de muestras de hueso analizadas mostraron expresión detectable de este miARN, con diferencias significativas entre artrosis y fracturas. Esto contrastaba con lo observado en el suero, como se ha comentado anteriormente (Tabla 16).

T- student: Análisis comparativo de hueso frente a suero de $\Delta Ct$ (normalización con miR-222) de los microARNs y la muestra estudio (Fracturas (F) y artrosis (A))				
MicroARN	Grupo	Media	Desviación estándar	p F vs A
miR-518f en <b>hueso</b>	Fracturas	13,2	2,9	0,118
	Artrosis	17,4	2,4	
miR-518f en <b>suero</b>	Fracturas	11,5	7,8	0,687
	Artrosis	13,6	6,2	
miR-187 en <b>hueso</b>	Fracturas	16,4	1,5	0,028
	Artrosis	10,4	2,7	
miR-187 en <b>suero</b>	Fracturas	-	-	-
	Artrosis	-	-	

Tabla16. Análisis comparativo de la expresión de los miARNs en hueso y suero en los diferentes grupos. Para comparar las muestras ambas se normalizaron únicamente con miR-222. F: Fracturas; A: Artrosis; p: Significación estadística.

Si el hueso fuera una fuente preferente de estos miARN, cabría esperar la existencia de una correlación directa entre los niveles de los miARN detectados, en un individuo dado, en hueso y suero. Por ello, aun siendo conscientes de la limitación resultante del escaso tamaño muestral, realizamos un análisis para intentar establecer dicha relación. El resultado se expone en la Figura 22.

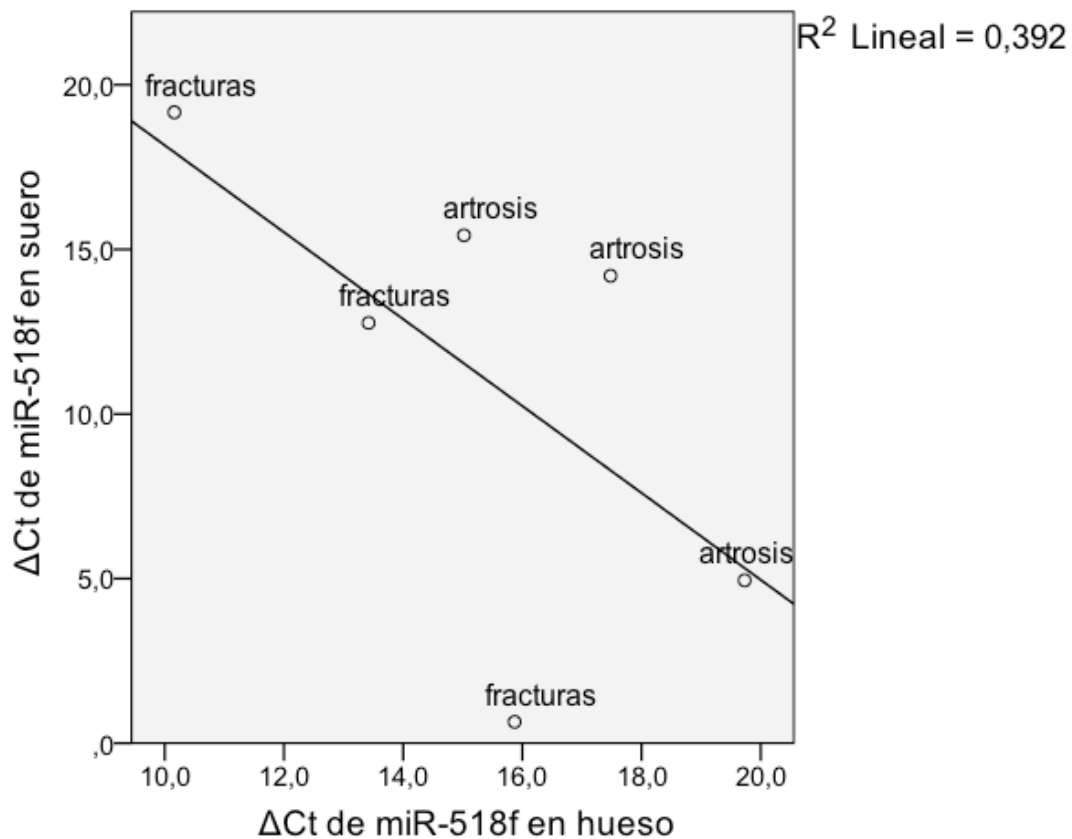


Fig. 22. Representación gráfica de la relación entre los valores de miR-518f en hueso (abscisas) y suero (ordenadas).

Como se observa en la figura, no pudimos detectar una correlación significativa entre los niveles del miR-518f en hueso y suero. Aún más, la tendencia fue a observar una correlación negativa. Evidentemente, al no detectarse en suero no se pudo hacer un análisis similar con respecto al miR-187.

#### 4.4. ANÁLISIS DE MICROARNs EN CULTIVOS PRIMARIOS DE OSTEOLASTOS

##### 4.4.1. Características de la muestra

Se seleccionaron 8 muestras de cultivos primarios de osteoblastos obtenidos a partir de pacientes fracturados y 8 muestras de artrósicos.

##### 4.4.2. microARNs analizados

Realizamos un análisis de miR-518f y miR-187 y normalizamos los resultados mediante la media de los niveles de let-7b y miR-222.

##### 4.4.3. Análisis de resultados

En la tabla siguiente se resumen los resultados de la expresión de esos miARNs en los cultivos de osteoblastos de los dos grupos de pacientes estudiados (Tabla 17).

U-Mann Whitney: Análisis de $2\Delta Ct$ de los microARNs y muestra estudio (Fracturas (F) y artrosis (A)) en cultivos primarios de osteoblastos.				
MicroARN	Grupo	Media	Desviación estándar	p F vs A
miR-518f	Fracturas	0,007	0,02	0,199
	Artrosis	0,86	1,81	
miR-187	Fracturas	0,002	0,004	1
	Artrosis	0,001	0,004	

Tabla 17. Análisis comparativo de la expresión de los miARNs en cultivos primarios de osteoblastos en los diferentes grupos. F: Fracturas; A: Artrosis; p: Significación estadística.

Podemos observar que no hubo diferencias significativas en la expresión de los miARNs entre los cultivos de osteoblastos procedentes de pacientes con coxartrosis y los procedentes de pacientes con fracturas de cadera.

En el análisis cualitativo de los microARNs: establecimos como punto de corte de la PCR cuantitativa un valor de Ct de 35, entendiendo como ausencia de expresión los casos con Ct igual o superior a 35; mientras que se consideró que el microARN se expresaba en los casos con Ct inferiores a 35 (Tabla 18).

- miR-518f: globalmente se expresó en el 55% de las muestras, incluyendo 30% de las fracturas y en el 80% de las artrosis. La odds ratio entre fracturas y artrosis fue de 0,1 con un intervalo de confianza de 0,0-0,8 (p=0,07).
- miR-187: se expresó globalmente en el 60% de las muestras. En el 50% de las fracturas y en el 70% de las artrosis. La odds ratio entre fracturas y artrosis fue de 0,4 con un intervalo de confianza de 0,1-2,7 (p=0,650).

MicroARN Grupo	miR-518f		miR-187	
	+	-	+	-
Fracturas	3	7	5	5
Coxartrosis	8	2	7	3

Tabla 18: Análisis cualitativo de la expresión de miR-518f y miR-187 en los pacientes con fracturas y en los pacientes con coxartrosis.

## 4.5. EFECTO DE LOS MICROARNs SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES PROPIOS DE LOS OSTEOLASTOS

### 4.5.1. Características de la muestra

Realizamos un primer experimento para ver la expresión de los microARNs en cultivos de dos líneas celulares de tipo osteoblástico (MG-63 y HOS-TE8537) y observamos que los dos microARNs, miR-187 y miR-518f, solo se expresaban en MG-63. Ante este hallazgo decidimos realizar los estudios sobre cultivos de la línea MG-63. En esta línea valoramos los efectos de la transfección con inhibidores de esos microARN, sobre los niveles de los propios microARN y de otros genes típicos de la línea osteoblástica.

### 4.5.2. Análisis de resultados

En un primer estudio comparamos si había diferencias en los niveles de miR-518f y miR-187 a las 24 y 48 horas de transfectar las células con inhibidores de esos microARNs.

- Inhibición miR-187: No encontramos diferencias significativas en la expresión de miR-187 a las 24 horas de transfectar las células con un inhibidor de este microARN o con un control. Además, a las 48 horas no se expresó en ninguna de las muestras (incluidos controles), lo que hace pensar que el resultado obtenido no es un efecto específico del antagonista transfectado, sino un artefacto propio del procedimiento.
- Inhibición miR-518f: No encontramos diferencias significativas frente al control en la expresión de miR-518f a las 24 ó 48 horas de la transfección de un inhibidor (Tabla 19; Fig. 23).

microARN	24 horas (Ct)	48 horas (Ct)
Inh miR-187	32,9	40
Control miR-187	32,7	40
Inh miR-518f	17,8	19,1
Control miR-518f	18,2	19

Tabla 19. Análisis comparativo de las variaciones en los Ct de miR-518f y miR-187 tras una transfección realizada tras 24horas y tras 48horas con los inhibidores correspondientes (Inhibidor de miR-187; Inhibidor miR-518f).

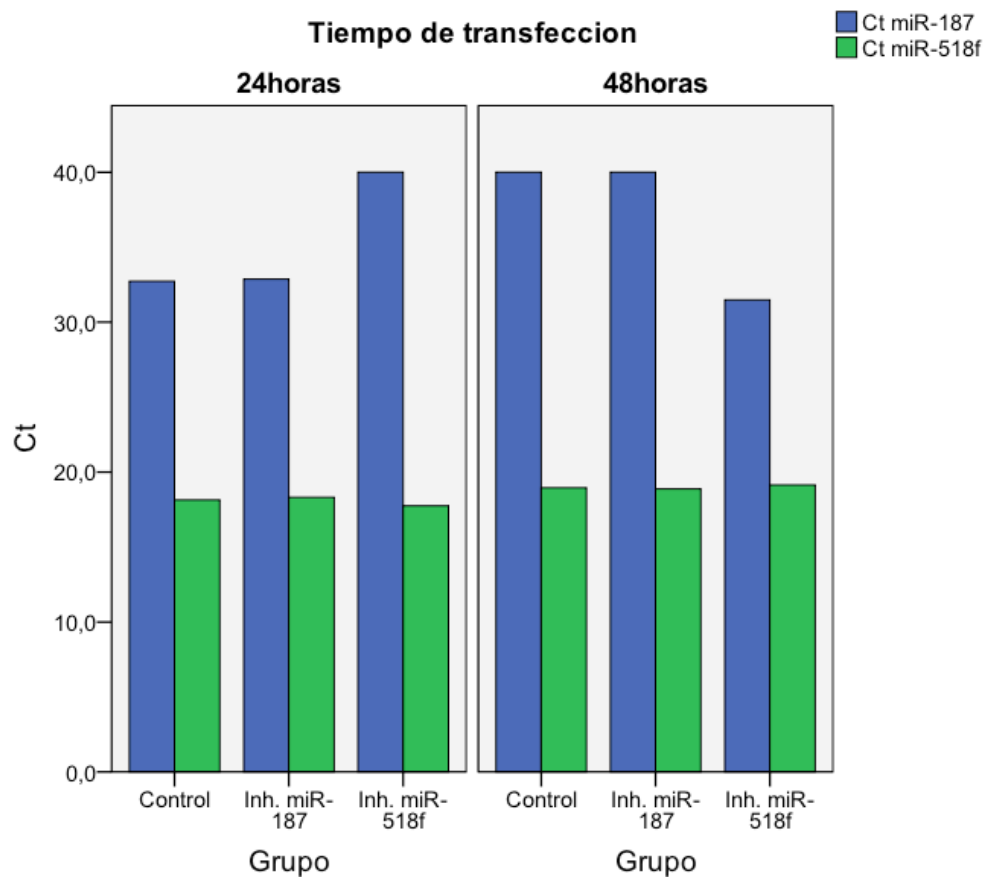


Fig. 23. Representación gráfica de las variaciones de los miARNs (miR-518f y miR-187) en relación con el tiempo de la transfección.

A pesar de los anteriores resultados negativos, decidimos explorar si la transfección de estos inhibidores se asociaba a algún cambio en la expresión de genes relacionados con el metabolismo óseo. Los resultados se resumen en la Tabla 20 y la figura 24.

Expresión	Control (Ct)	Inh-miR-187 (Ct)	Inh-miR-518f (Ct)
miR-518f	17,3	16,9	16,5
ALPL	28,6	30,2	31,1
RANKL	34,3	36,4	36,8
IGF1R	22,5	23,2	31,6 (23,1)*
OPG	24,8	25,7	26,4

Tabla 20. Variaciones en los niveles de miR-518f y en la expresión de los genes seleccionados tras la transfección con el inhibidor de miR-518f. ALPL: Fosfatasa Alcalina; RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$ ; IGF1R: Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1; OPG: Osteoprotegerina. (\*): valor Ct de IGF1R al excluir la muestra que no mostro expresión (Ct=40).



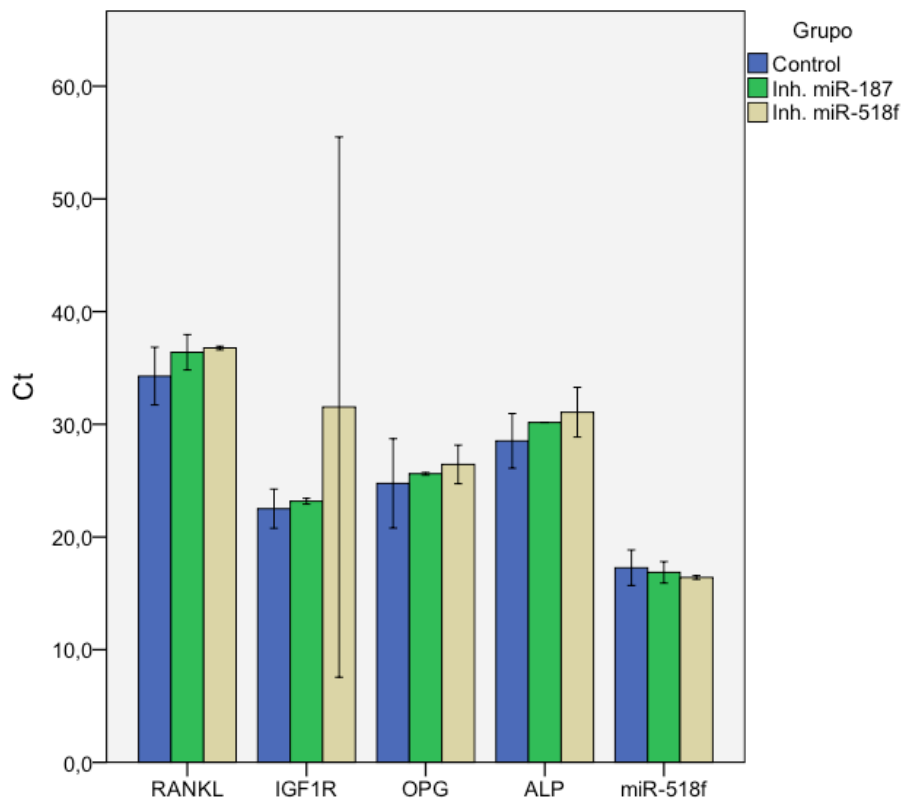


Fig. 24 Variaciones en los niveles de miR-518f y en la expresión de los genes seleccionados tras la transfección con el inhibidor de miR-518f. ALPL: Fosfatasa Alcalina; RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$   $\beta$ ; IGF1R: Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1; OPG: Osteoprotegerina.

Podemos observar que no se detectaron diferencias en los niveles de miR-518f ni en la expresión de los genes analizados. En el único gen que parecía haber diferencias era en IGF1R debido a que en uno de los duplicados no hubo expresión (Ct=40), por lo que si excluimos dicho resultado tampoco muestra significación estadística.



# Discusión



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Expresión diferencial de microARNs: barrido inicial

La epigenética nos ayuda a explicar los patrones de herencia “complejos”, es decir, los que subyacen en enfermedades frecuentes en la población, que son el resultado de la acción combinada de varios genes y de la interacción entre estos y diversos factores ambientales. Por otro lado, los mecanismos epigenéticos inducen cambios estables en la expresión de genes que explican porqué los diferentes tipos celulares tienen patrones de expresión diversos (y, en consecuencia, características fenotípicas) que se mantienen a través de la división celular, aún cuando todas las células del organismo comparten un mismo genotipo. Entre los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica se encuentran los microARNs. Estos han sido estudiados en diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, las enfermedades neurológicas, las enfermedades cardiovasculares, etc (46)(89)(90). Pero hasta la fecha, el papel de los microARNs en la fisiopatología del metabolismo óseo apenas es conocido.

Los estudios de epidemiología genética han confirmado que la osteoporosis y la artrosis son enfermedades que siguen patrones de herencia en los que intervienen numerosos genes, así como factores ambientales, como la dieta, la actividad física, las funciones endocrinas y la exposición a diversas sustancias, como el alcohol, algunas drogas y medicamentos o el tabaco (29)(35). Como es bien sabido, estas enfermedades aparecen generalmente en individuos de edad avanzada, aún cuando evidentemente las características genéticas están presentes en el individuo desde antes de su nacimiento. Ello

refuerza la idea de que su desarrollo depende de la interacción de diversos factores genéticos y ambientales.

Los microARNs pueden representar uno de los mecanismos por los que los factores ambientales modulan el fenotipo celular. En todo caso, en los últimos años se han acumulado numerosos datos que indican su importante papel en la modulación de los patrones de expresión génica de los diferentes tejidos. Por tanto, el conocimiento del efecto de los microARNs sobre el metabolismo óseo es muy interesante por diferentes motivos. Por un lado, para incrementar el conocimiento sobre la patogenia de estas enfermedades esqueléticas que suponen una importante carga de morbilidad en la población de edad avanzada. Ello, a su vez, puede permitir identificar genes regulados por esos microARNs y eventualmente marcar nuevas dianas que permitan desarrollar fármacos alternativos más potentes o seguros que los actualmente disponibles. Por otro lado, los propios microARNs podrían tener importancia como biomarcadores que ayuden a predecir el riesgo de enfermedad, o dentro de una perspectiva farmacogenómica, las respuestas beneficiosas y los efectos adversos a los fármacos. Merece la pena señalar que en la actualidad ya disponemos de algunos biomarcadores útiles en las enfermedades esqueléticas, especialmente en la osteoporosis. Es el caso de la densitometría ósea y de los marcadores del remodelado óseo. Estos (especialmente la densitometría) tienen una clara utilidad en la predicción del riesgo de fractura (91). Sin embargo, distan de tener una eficacia perfecta. De manera peculiar, sus cambios son un pobre reflejo del efecto antifracturario de los fármacos empleados en el tratamiento de la osteoporosis (92). Disponer de nuevos marcadores, fácilmente medibles en muestras accesibles (por ejemplo, en

suero), estables en el tiempo y eficaces para predecir el riesgo futuro de desarrollar osteoporosis o artrosis y la respuesta a los tratamientos es un objetivo de muchos grupos de investigación en el campo de la fisiopatología ósea.

El propósito principal de nuestro estudio era identificar microARNs que pudieran expresarse con intensidad diferente en la osteoporosis y la artrosis, en suero y en hueso, y que, por tanto, pudieran estar involucrados en la patogenia de estos procesos y pudieran servir como biomarcadores. Desearíamos señalar la novedad de este objetivo, pues en el momento en que iniciamos nuestro estudio no existía en la literatura ninguna publicación con un objetivos similar. Incluso en el momento actual apenas existen estudios similares. De hecho, hasta donde nosotros sabemos, se han publicado sólo 3 artículos en los que se evalúa la expresión de microARNs en hueso de humanos (67)(69) y sólo en uno de ellos, actualmente publicado sólo en su versión online, se han explorado los niveles de microARNs en el suero de pacientes (87).

Hasta la fecha, hay descritos 1872 microARNs en la especie humana. Este número dificulta el estudio de la posible implicación de los microARNs en las alteraciones del metabolismo óseo. A la hora de plantear un estudio de este tipo, cabe adoptar una de dos estrategias posibles. Por un lado, se puede optar por una estrategia de asociación de microARNs candidatos con la enfermedad. En este caso, se trata de seleccionar a priori algunos microARNs, los cuales se piensa pueden estar implicados (a partir de los conocimientos previamente existentes, por estudios clínicos o experimentales). Este es un enfoque potencialmente atractivo, pero poco factible, dado el escaso

conocimiento existente sobre el papel de los microARNs en la biología ósea. Un enfoque alternativo es la aproximación sin hipótesis previa (“hypothesis-free”). En este caso, se plantea un barrido inicial de todos los microARNs. Hay que tener en cuenta que se espera que la gran mayoría de los microARNs estudiados en la fase inicial no estarán relacionados con la enfermedad. Será a partir de los resultados de ese estudio inicial como se seleccionan los microARNs de interés, potencialmente asociados con la enfermedad, para confirmar los resultados en otra muestra más amplia. Este tipo de aproximación es equivalente al utilizado en los estudios de asociación genómica (“genomewide association studies” o GWAS) y fue la que decidimos utilizar en nuestro estudio.

Por razones de índole práctica, en la primera fase de nuestro estudio analizamos la expresión de 760 microARNs que podían determinarse de una manera relativamente sencilla, por estar incluidos en “mini-arrays” comerciales. Ello por un lado obviaba la necesidad de diseñar ensayos individuales, abarataba los costes y permitía llevar a cabo las medidas por un procedimiento cuantitativo (qRT-PCR en tiempo real) con resultados directamente relacionados con los niveles de los microARNs. Por otro lado, en ese grupo de 760 se encuentran los microARNs mejor conocidos y validados. En las siguientes fases de nuestro estudio intentamos replicar dichos resultados con una selección de un grupo de unos pocos microARNs, medidos en un mayor número de muestras de hueso y de suero de pacientes y en cultivos celulares.

Entre los 760 microARNs analizados identificamos algunos que se expresaban de manera más abundante en el hueso de los pacientes con coxartrosis que en el hueso de los pacientes con fracturas osteoporóticas de



cadera: miR-187, miR-330-5p, miR-193a-3p, miR-214, let-7i y miR-181a-2. Por el contrario, miR-636, miR-519d, miR-135, miR-518f, miR-137, miR-643 y miR-524 se expresaban más en los huesos de pacientes con fracturas.

Cabe señalar que para la comparación de los grupos se consideró como umbral de significación el valor estándar de  $p=0,05$ , sin corrección por comparaciones múltiples. Esa decisión lógicamente supuso asumir un riesgo elevado de falsos positivos. Sin embargo, se hizo así como solución de compromiso y a fin de no comprometer la potencia del estudio. Además, puesto que esta fase inicial del estudio era exploratoria e iría seguida de una fase posterior de replicación de los resultados considerados inicialmente como significativos, las asociaciones espurias de la fase inicial podrían ser excluidas posteriormente. De todas maneras, y esta es una limitación relevante de nuestro estudio, dado el número relativamente pequeño de muestras no podemos descartar que algunos otros microARNs, no identificados aquí, puedan expresarse también de manera diferente en ambas enfermedades.

Por razones de eficiencia, para la fase de replicación se seleccionaron, pues, aquellos microARNs con mayor significación estadística, mayores diferencias en la expresión en artrosis y fracturas y una mayor plausibilidad biológica. Para considerar este último parámetro exploramos las bases de datos disponibles en la red (DIANA-MicroT-CDS, miRIAD, RefGene, microRNA.org, miRDB, TargetScanHuman, PicTar) e identificamos los posibles genes diana de esos microARNs, en particular los genes relacionados con el metabolismo óseo. De esta forma identificamos aquellos microARNs que eran candidatos de mayor interés “a priori” para las fases siguientes de nuestro estudio. A continuación se hace una breve descripción de los microARNs que

mostraron diferencias significativas en su nivel de expresión en hueso artrósico y osteoporótico. Esta incluye las especies en las que se ha identificado y el cromosoma en el que se localiza dicho microARN, la secuencia de nucleótidos que lo constituyen y los posibles genes diana con los que se ha relacionado.

**-Hsa-miR-187** (hsa-miR-187-3p) se ha descrito en homo sapiens (hsa), ratón (mmu), rata (rno), ganado vacuno (bta), perro (cfa), cerdo (ssc), mono Rhesus (mml) y en el caballo (eca). Se localiza en el cromosoma 18 (q12.2).

Su secuencia madura es la siguiente:

UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG

Esta secuencia madura nos ayuda a conocer los posibles genes diana de este microARN. Entre los genes diana de este microARN se encuentran algunos relacionados con la homeostasis esquelética:

- WISP1 (Proteína secretada inducida por Wnt1): proteína derivada de la familia de factores de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) que parece regular la diferenciación osteogénica por medio de BMP2 (93).
- FGF3 (Factor de crecimiento de fibroblastos 3): regula negativamente la osificación al inhibir la proliferación de condrocitos.

**-Hsa-miR-193a-3p:** (hsa-miR-193a-3p) se ha descrito en homo sapiens (hsa) y ratón (mmu). Se localiza en el cromosoma 17 (q11.2).

Su secuencia madura es:

AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU

Entre sus genes diana descritos relacionados con el metabolismo óseo está:

- **NF- $\kappa$ B** (Factor nuclear kappa B): gen que codifica una proteína que pertenece a una familia de factores de transcripción. Esta proteína se encuentra en el citoplasma de forma inactiva. Al activarse se trasloca hacia el núcleo. Es un mediador esencial de la vía RANK-RANKL. Su importancia en el metabolismo óseo se ha demostrado en modelos que muestran como su bloqueo in vitro produce una inhibición de la osteoclastogénesis y de la resorción ósea. Como es bien conocido, RANKL es producido por los osteocitos y otras células presentes en el microambiente óseo. Existe en forma soluble y ligado a membrana (94). Cuando RANKL se une a su receptor RANK, presente en los precursores de los osteoclastos, induce su diferenciación y, por tanto, favorece la formación de osteoclastos. De hecho, un anticuerpo neutralizante de RANKL (denosumab) se utiliza a menudo en el tratamiento de la osteoporosis (95).

**-Hsa-miR-210:** (hsa-miR-210-3p) se ha descrito en homo sapiens (hsa).

Se localiza en el cromosoma 11 (p15.5)

Su secuencia madura es:

CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA

En el análisis de miniarrays sus resultados estaban próximos a la significación estadística. Mizuno y colaboradores publicaron un artículo en el que demostraban cómo este microARN estimulaba la diferenciación osteoblástica por medio del receptor AcvR1b (receptor tipo 1B de la activina A).

AcvR1b es un miembro de la familia de receptores de BMP que transmite señales a Smad 2 y 3, las cuales a su vez, inducen la transcripción de genes que inhiben la diferenciación osteoblástica (70). Por este motivo decidimos seleccionarlo para intentar replicar estos resultados en nuestros ensayos individuales.

**-Hsa-miR-214:** (hsa-miR-214-3p) se ha descrito en homo sapiens (hsa).

Se localiza en el cromosoma 1(q24.3).

Su secuencia madura es:

ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU

Entre los genes diana descritos están:

- BMP2 (Proteína morfogenética ósea 2): las familia de las BMPs pertenecen a la superfamilia TGF- $\beta$ . Están implicadas en el modelado y posiblemente en el remodelado del hueso. De hecho, son potentes inductores de la diferenciación de los precursores mesenquimales hacia la línea osteoblástica. En consecuencia, tienden a promover la formación de hueso (96).
  
- CDH6 (Cadherina 6): codifica moléculas de adhesión celular dependientes de calcio que intervienen en el reconocimiento celular y la morfogénesis de los tejidos. A nivel del hueso las cadherinas parecen desempeñar un papel importante en la diferenciación osteoblástica. Por otro lado, hay que tener en cuenta que, además de intervenir en los procesos de contacto célula-célula, las cadherinas pueden modular diversas funciones celulares y, de modo particular, la actividad de la vía Wnt (97).

Además Wang y colaboradores (67) establecieron un efecto inhibitorio de miR-214 sobre la diferenciación osteoblástica a través del gen ATF4 (Factor activador de la transcripción 4). Hoy en día, el mecanismo de acción de este gen sobre el metabolismo óseo no está del todo bien establecido, pero sabemos que es fundamental en la proliferación y diferenciación osteoblástica. Entre sus posibles mecanismos de acción se ha descrito su implicación en aumentos en la expresión de osteocalcina, RANKL, osterix, la síntesis de colágeno tipo 1, VEGF (98)(99).

**-MiR-518f** (hsa-miR-518f-3p) es un microARN que pertenece a la familia de miR-515. Se ha descrito en Homo sapiens (hsa), Pan troglodytes (ptr; chimpancé común) y Pongo pygmaeus (ppy; orangután de Borneo). Se localiza en el cromosoma 19 (q13.42)

Su secuencia madura es la siguiente:

GAAAGCGCUUCUCUUUAGAGG

En las bases de datos bioinformáticas se han descrito los siguientes genes diana relacionados con el metabolismo óseo:

- CTNNB1 ( $\beta$ -catenina): codifica una proteína fundamental en la activación de la vía Wnt clásica. Cuando los ligandos Wnt se unen a sus receptores de membrana, disminuye la actividad de un complejo molecular que fosforila  $\beta$ -catenina. En consecuencia aumentan los niveles citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina no fosforilada, que se trasloca al núcleo, donde modula la transcripción de los genes diana (100).

- EFNA4 (Efrina A4): no se conoce muy bien su efecto pero parece participar en procesos de comunicación intercelular. De hecho, las efrinas se han implicado recientemente en los procesos de comunicación osteoblastos-osteoclastos, explicando en parte el acoplamiento que existe normalmente entre la formación y la resorción ósea (101).

**-Hsa-miR-636:** (hsa-miR-636): se ha descrito en homo sapiens (hsa). Se localiza en el cromosoma 17 (q25.1)

Su secuencia de nucleótidos madura es:

UGUGCUUGCUCGUCCCGCCCGCA

Entre sus genes diana se encuentran los siguientes:

- Runx2 (Factor de transcripción 2 relacionado con Runt): gen que codifica la proteína que lleva su mismo nombre o también conocida como CBFA1 (Core-binding factor alfa 1). Este factor de transcripción parece desempeñar un papel fundamental en las fases iniciales de la diferenciación osteoblástica a partir de los precursores mesenquimales pluripotenciales (12). Algunas mutaciones de este gen se consideran responsables de la displasia cleidocraneal (102).
- TGF- $\beta$  (Factor de crecimiento transformante): relacionado con la maduración de los osteoclastos y de las células del estroma precursoras de osteoblastos. Además estimula la síntesis de osteoprotegerina (OPG), por lo que tiene una acción muy importante

sobre el remodelado óseo. De todas maneras, sus efectos in vitro dependen de las condiciones experimentales, y en particular de las concentraciones utilizadas, por lo que no se conoce bien cuál es su efecto predominante en condiciones fisiológicas (103). Además, se considera que puede quedar almacenado en la matriz ósea en forma latente, para liberarse y activarse posteriormente cuando esa matriz es resorbida (104).

## 5.2. Asociación de microARNs con enfermedades esqueléticas

**-miR-518f:** mostró una mayor expresión en las muestras de pacientes con fracturas osteoporóticas, que en pacientes con artrosis y que en los controles, tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo. En el análisis cualitativo, estableciendo como punto de corte de expresión positiva valores de Ct inferiores a 35, encontramos que miR-518f se expresaba en la mayoría de las muestras de pacientes con osteoporosis (74%) y en pocas muestras de los pacientes con coxartrosis (37%). En el análisis cuantitativo miR-518f mostró una mayor expresión en el grupo de pacientes con fracturas frente al grupo de pacientes con coxartrosis con resultados estadísticamente significativos ( $p=0,046$ ) y muy cercano a la significación estadística al comparar el grupo de pacientes con fracturas frente a los controles ( $p=0,065$ ). El hecho de no encontrar diferencias entre estos dos últimos grupos puede deberse a un escaso tamaño muestral del grupo control ( $n=6$ ).

Tras esto, intentamos replicar estos resultados en muestras de suero de los mismos pacientes, con el inconveniente que en nuestra seroteca solo teníamos muestras de algunos de los casos en los que se habían analizado las

muestras de hueso (4 fracturas y 4 coxartrosis). En este análisis no encontramos diferencias significativas en los niveles de miR-518f entre fracturas y coxartrosis ( $p=0,687$ ), pero sí que se mantuvo la tendencia de unos mayores niveles medios en el grupo de pacientes con fracturas osteoporóticas. Esto podría deberse a un escaso tamaño muestral y una mala conservación de los microARNs en las muestras de suero analizadas. No obstante, al comparar los niveles de expresión en suero y hueso de un pequeño grupo de pacientes, no encontramos una correlación directa entre ambos, por lo que no podemos asegurar que los niveles séricos sean un buen índice de la situación en el hueso. Lógicamente, cabe pensar que otros tejidos contribuyan de manera importante a los niveles séricos de miR-518f.

Para analizar la capacidad funcional de miR-518f intentamos realizar una transfección con un inhibidor de este microARN (antimiR) y estudiar las diferencias en la expresión de genes interesantes en el metabolismo óseo. Para ello analizamos las variaciones en ALPL (Fosfatasa Alcalina), RANKL (Ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa \beta$ ), IGF1R (Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1) y OPG (Osteoprotegerina).

Hay que explicar que entre los genes diana descritos en las bases de datos bioinformáticas para miR-518f no encontramos relación directa con ninguno de estos genes, pero dado que son genes muy importantes en el metabolismo óseo, consideramos que era pertinente explorar si podía ejercer efectos indirectos sobre la expresión de estos genes. De hecho, como hemos señalado anteriormente, entre las dianas de este microARN sí se encuentran la betacatenina y algunas efrinas, que son moduladores importantes de la función de osteoblastos y osteoclastos.



En nuestros experimentos, tras inhibir este microARN no encontramos diferencias en la expresión de dichos genes. Ello iría en contra de la implicación de miR-518f en la regulación de estos genes. Sin embargo, es necesario señalar que tampoco pudimos demostrar una reducción consistente de los niveles del microARN tras la transfección del inhibidor, por lo que cabe la posibilidad de que la inhibición conseguida fuera insuficiente como para afectar los potenciales genes diana.

Tampoco encontramos diferencias al comparar la expresión de miR-518f en cultivos primarios de osteoblastos de sujetos con osteoporosis frente a coxartrosis. De nuevo, si bien este resultado evidentemente no apoya la implicación de este microARN en la patogenia de estos procesos, tampoco la excluye. De hecho, es bien conocido que durante el cultivo las células pueden experimentar variaciones fenotípicas y epigenéticas que las alejen del patrón normal cuando se encuentran en el seno de un tejido complejo, como el hueso (105).

Llegado este punto, creemos que pese a no haber encontrado diferencias en la expresión de los genes tras inhibir miR-518f, es posible que la relación con el gen CTNBI ( $\beta$ -catenina) descrita en las bases de datos bioinformáticas explique una mayor expresión en los fracturados (106). La vía Wnt/ $\beta$ -catenina (canónica) constituye un mecanismo esencial en la regulación del remodelado óseo, controlando la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de los osteoblastos. Esta vía regula la proteólisis de  $\beta$ -catenina. En condiciones normales, la activación de la vía Wnt inhibe la formación de osteoclastos, puesto que tiende a disminuir la unión de RANKL a RANK (receptor de membrana presente en los precursores de osteoclastos) por

aumentar la producción de osteoprotegerina (OPG) en los osteoblastos. La unión de OPG a RANKL impide la unión de este a RANK, y por tanto la inducción de la diferenciación osteoclástica. Por otro lado, el papel de la vía Wnt mejor conocido es la regulación de la actividad osteoblástica (3)(4).

Otros autores han descrito la relación de los microARNs con la vía Wnt. Entre ellos, Kapinas (53)(54) demostró en cultivos celulares de osteoblastos que mir-29a y mir-29c están regulados por la vía canónica Wnt e inducen un descenso en los niveles de osteonectina y la diferenciación osteoblástica. Liu (68) determinó en cultivos celulares como mir-17 actúa inhibiendo la diferenciación osteoblástica por acción sobre TCF3 (Factor transcriptor 3), pieza clave en la vía Wnt. Por su parte, Zhang (74) demostró en osteoblastos de ratón, cómo mir-335-5p regula negativamente DKK1 (dickkopf 1, inhibidor de la vía Wnt), lo cual favorece un aumento en la actividad de la vía Wnt y en consecuencia la potenciación de la diferenciación osteoblástica y condrocítica.

Teóricamente, a la vista de nuestros resultados podríamos sugerir que miR-518f puede participar en el desarrollo de osteoporosis al ejercer un posible efecto inhibitorio sobre la expresión del gen CTNBI ( $\beta$ -catenina). Sin embargo, sería necesario confirmar este resultado en otras cohortes de pacientes y complementarlo con estudios funcionales alternativos. Sin embargo, la mala correlación que hemos encontrado en nuestro estudio entre la expresión en hueso y los niveles séricos no apoya el uso potencial de estos últimos como biomarcador.

**-miR-210:** tampoco encontramos diferencias significativas en la expresión de este microARN entre las muestras de hueso de los diversos

grupos de individuos. Si acaso, en nuestro estudio observamos una pequeña tendencia no significativa ( $p=0,30$ ) a una mayor expresión en el grupo de fracturados frente al grupo de coxartrosis. Estos resultados no van en línea con lo comentado por Mizuno y sus colaboradores (70), quienes describieron en cultivo celulares cómo miR-210 tenía un efecto positivo sobre la diferenciación osteoblástica al inhibir el gen *AcvR1b* (receptor tipo 1B de la activina A). *AcvR1b* es un miembro de la familia de receptores de BMP que transmite señales a Smad 2 y 3, las cuales a su vez, inducen la transcripción de genes que inhiben la diferenciación osteoblástica.

**-miR-187:** mostró una mayor expresión en las muestras de pacientes con artrosis, que en pacientes con fracturas osteoporóticas y que en los controles. En el análisis cuantitativo observamos una clara mayor expresión en hueso de los pacientes con coxartrosis que en los fracturados ( $p=0,002$ ) y en coxartrosis frente a controles ( $p=0,031$ ). De cara a valorar el posible uso de este microARN como biomarcador, exploramos sus niveles en suero. Sin embargo, no conseguimos detectarlo de manera consistente. Ello evidentemente cuestiona su uso como biomarcador aplicable en la clínica.

El siguiente paso fue intentar realizar una transfección en cultivos primarios con el inhibidor de miR-187 (anti-miR), sin conseguir variaciones en los niveles de este microARN.

Como comentamos con anterioridad, miR-187 parece guardar relación con FGF3. Este es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, que se une al Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 3 para actuar como un regulador negativo del crecimiento de los huesos

durante la osificación. De esta forma inhibe la proliferación de los condrocitos dentro de la placa de crecimiento. Chen y colaboradores (107) estudiaron en cultivos de células del endotelio vascular cómo descensos en la actividad de FGF, conduce a una disminución de miR-let-7 y aumentos de TGF- $\beta$ . Esto desencadena aumentos de marcadores mesenquimales tipo fibronectina, vimentina, colágeno que pueden favorecer el desarrollo de ciertas enfermedades como algunos tipos de fibrosis cardiaca (108) o hipertensión portal (109). Mecanismos biológicos similares a los anteriormente descritos podrían favorecer ciertas enfermedades relacionadas con el metabolismo óseo como la artrosis. La inhibición de FGF3 por parte de miR-187 podría explicar un incremento en la proliferación e hipertrofia de los condrocitos (110). Esto explicaría una mejor expresión de miR-187 en los pacientes con artrosis frente a los pacientes con osteoporosis y los controles.

**-miR-636:** no encontramos diferencias entre los grupos de pacientes con fracturas, coxartrosis y controles en la fase de replicación, por lo que presumiblemente las diferencias encontradas en la fase inicial de barrido representan un falso positivo, una asociación con significación espuria relacionada con el hecho de haber llevado a cabo múltiples comparaciones entre los grupos.

**-miR193a-3p:** no encontramos diferencias entre los grupos de pacientes con fracturas, coxartrosis y controles.

**-miR-214:** Wang y colaboradores (67) establecieron, tras estudiar muestras de fémur de 40 pacientes, cómo mir-214 presenta una relación directa con la edad e inversa con la masa ósea. Esto último puede deberse a que mir-214 tiene como gen diana ATF4, por lo que tiene un efecto inhibitorio sobre la diferenciación osteoblástica. Contrariamente al estudio de Wang, nosotros no encontramos diferencias en la expresión de este microARN entre las muestras de hueso de los diversos grupos analizados. Globalmente en nuestro estudio observamos una tendencia a mayor expresión en el grupo de artrosis frente al grupo de fracturas, pero este hallazgo puede ser debido al azar, pues la diferencia no era estadísticamente significativa ( $p=0,136$ ). Wang y sus colaboradores realizaron un análisis comparativo de los niveles de miR-214 por subgrupos de edad, con lo que encontraron diferencias significativas. Nosotros intentamos reproducir esos resultados sin encontrar diferencias significativas entre huesos osteoporóticos y artrósicos.

Estas diferencias en los resultados entre ambos estudios nos hacen ser cautelosos a la hora de sacar conclusiones, ya que podría haber gran variabilidad en los niveles de los microARNs por influencia de agentes externos que son difíciles de controlar, como podrían ser otras enfermedades, variaciones raciales, etc.

Por otro lado, es necesario señalar que el análisis de los microARNs individuales puede ser excesivamente simplista. Cabe pensar que la actividad celular sea el resultado de integrar el efecto de diversos moduladores, incluyendo varios microARNs. De hecho, nuestros resultados aportan alguna sugerencia en ese sentido. En efecto, aún cuando el número de muestras analizadas fue limitado, parecía darse una interacción entre miR-518f y miR-

187, de manera que la expresión simultánea de ambos microARNs se asociaba de manera más importante con las fracturas que la expresión de cada uno de ellos por separado.

Esto podría estar relacionado con un mecanismo de acción común de estos dos microARNs sobre la vía Wnt. Como comentamos anteriormente, se ha descrito cierta complementariedad entre estos microARNs y algunos genes importantes de esta vía (CTNNB1, WISP1). Esta posible interacción de estos dos microARNs, inhibiendo dianas importantes para la activación de la vía Wnt, justificaría un incremento en el riesgo de padecer osteoporosis.

Por otro lado, hoy sabemos que cada microARN puede ejercer su efecto sobre varios genes diana. Esto evidentemente aumenta la complejidad del análisis de sus posibles efectos y de los mecanismos involucrados.

### 5.3. Expresión diferencial de microARNs en enfermedades óseas: situación actual

Como comentamos anteriormente, en la actualidad además de nuestro estudio hay otros tres trabajos publicados que evalúan la asociación entre los microARNs y el metabolismo óseo humano.

El primer estudio publicado en hueso de pacientes con osteoporosis fue el de Li y colaboradores (69). En cultivos celulares murinos en los que inhibieron miR-2861 consiguieron un aumento de la expresión de HDAC5 y un descenso de Runx2, inhibiendo así la formación ósea. Por el contrario, en presencia de miR-2861 hubo menor expresión de HDAC5 y mayor de Runx2. Estos resultados los confirmaron en estudios en ratones. Además identificaron en

hueso fracturado de una familia de sujetos con osteoporosis precoz algunas mutaciones de pre-miR-2861 que reducen la expresión de miR-2861.

Posteriormente Wang y colaboradores (67) identificaron en muestras de fémur de 40 pacientes, cómo mir-214 presenta una relación directa con la edad e inversa con la masa ósea. Tras esto en cultivos con preosteoblastos de ratón establecieron que mir-214 tiene como gen diana ATF4 (Factor activador de la transcripción 4), por lo que tiene un efecto inhibitorio sobre la diferenciación osteoblástica.

Muy recientemente, Seeliger y colaboradores (87) acaban de publicar un artículo que sigue una sistemática de investigación muy similar a la desarrollada por nosotros. Estos autores inicialmente realizaron una fase exploratoria en suero de pacientes mediante arrays. De esta forma seleccionaron aquellos microARNs que consideraron más destacados. En una segunda fase confirmaron dichos resultados en muestras de suero y hueso de pacientes con osteoporosis comparados frente a controles. Así, describieron cinco microARNs que presentan una mayor expresión en suero y en hueso de sujetos con osteoporosis. Estos cinco microARNs son miR-21, miR-23, miR-24, miR-100 y miR-125b.

En nuestro trabajo hay que destacar que se hizo un análisis exploratorio con un mayor número de microARNs (760 microARNs) que el resto de estudios. Además incluimos sujetos con artrosis para el análisis de la expresión de los microARNs, junto a los controles y sujetos con osteoporosis, lo cual puede resultar interesante ya que hasta la fecha y hasta donde nosotros sabemos, no hay ningún estudio de similares características al respecto. Un dato destacable en nuestros resultados es que a diferencia del estudio de

Wang y Mizuno nosotros no encontramos diferencias en la expresión de miR-214 y miR-210, lo que está de acuerdo con lo publicado por Seeliger en el análisis en suero con respecto a estos dos microARNs.

Como vemos resumido en la Tabla 21 estos estudios, a pesar de tratar sobre un mismo tema, presentan diferencias metodológicas y resultados muy dispares entre ellos.



Autor	Cultivos celulares	Ratón	Suero de pacientes	Hueso de pacientes	microARN control	microARN candidato	Gen	Comentario
<b>Li et al (2009)(69)</b>	Osteoblastos primarios de ratón	+	-	Fémur	RNU-6	miR-2861	Runx-2 (HDAC5)	Su mutación favorece osteoporosis precoz
<b>Wang et al (2012) (67)</b>	Preosteoblastos de ratón MC3T3	+	-	Fémur	RNU-6	miR-214	ATF4	Favorece osteoporosis
<b>Seeliger et al (2014) (92)</b>	-	-	+	Fémur	RNU-6 SNORD96a	miR-21 miR-23a-24 miR-100 miR-125b	PDCD4 Runx-2 BMPR2 ¿?	Resultados concordantes en suero y en hueso de pacientes con osteoporosis
<b>Garmilla et al (tesis)</b>	Osteoblastos primarios humanos MG-63 HOS-TE8537	-	+	Fémur	Let-7b miR-222	miR-518f miR-187	CTNNB1 FGF-3	Favorece osteoporosis Favorece artrosis

Tabla 21. Resumen de los estudios publicados sobre la expresión de los microARNs y metabolismo óseo en humanos. MC3T3: Mus musculus, preosteoblastos de ratón; MG-63: Homo sapiens, osteosarcoma; HOS-TE8537: Human osteosarcoma; Runx-2: Runt-related transcription factor 2; HDAC5: Histona deacetilasa 5; ATF4: activating transcription factor 4; PDCD4: Programmed cell death protein 4; BMPR2: Bone morphogenetic protein receptor 2; ¿?: diana desconocida; CTNNB1:  $\beta$ -catenina; FGF-3: Fibroblast Growth Factor 3.

#### 5.4. Fortalezas y limitaciones del estudio

Desearíamos destacar que este es un estudio muy novedoso. En el momento de iniciar nuestra investigación no había ningún artículo similar al nuestro. De hecho, hasta la fecha solo se han publicado tres artículos en los que se evalúa la expresión de microARNs en hueso de humanos y solo uno en el que se exploran los niveles de estos en suero de pacientes.

Hay que resaltar también el diseño. Realizamos una primera fase exploratoria, seguida de una fase en la que realizamos un análisis comparativo de los microARNs destacados en la fase anterior, para así evitar falsos positivos debido a comparaciones múltiples. Pese a ello, al realizar un análisis de resultados comparativo con más de un contraste estadístico, aumentó la probabilidad de que alguno de nuestros resultados fuese debido al azar.

La validez de nuestros resultados puede estar limitada por un sesgo de confusión, ya que nuestra población está expuesta a muchas variables no controladas, como la edad u otras enfermedades, que pueden influir sobre los niveles de los microARNs y de ahí las diferencias en los resultados con otros autores. Además hay que destacar que los estudios se han realizado sobre muestras de sujetos de sexo femenino, por lo que nuestros resultados se limitaran a dicha población.

Uno de los pasos fundamentales en el diseño y la planificación de un estudio de asociación es el cálculo del tamaño de la muestra que sería necesaria para detectar un determinado efecto genotípico sobre una enfermedad concreta. El hecho de que nuestro estudio sea tan novedoso limitaba la posibilidad de conocer la variabilidad de los niveles de microARNs y,

en consecuencia, la estimación del tamaño muestral. Por ello, seleccionamos un tamaño muestral similar al utilizado por otros autores que obtuvieron resultados satisfactorios en esta materia. Debido a esto y a las limitaciones económicas que nos condicionaron el tamaño muestral, nuestro estudio tuvo una potencia limitada, especialmente para el análisis por subgrupos y para el análisis en las muestras de suero.

### 5.5. Perspectivas

Actualmente numerosos autores investigan el uso de la terapia génica, incluyendo el uso de microARNs, en la regeneración ósea, con algunos resultados preliminares exitosos in vitro e in vivo (111). Pero el principal inconveniente de estas nuevas terapias es que necesitaremos ampliar nuestros conocimientos sobre la farmacocinética y farmacodinamia y controlar mejor las diferencias que existen entre los estudios en cultivos celulares e in vivo. En el caso de los microARNs será muy importante ampliar nuestros conocimientos sobre sus posibles genes diana (112)(113). Por este motivo creemos que nuestros resultados son de importancia para la comunidad científica al ampliar el conocimiento de la epigenética en el metabolismo óseo humano. No obstante, somos conscientes de las limitaciones de nuestro estudio, por lo que creemos que serían necesarios otros trabajos para confirmar nuestros resultados.

A raíz de este estudio nos surge la obligación de continuar empujando las puertas del conocimiento, que hemos entreabierto, pero distan de estar plenamente abiertas. Por ello en próximos trabajos intentaremos comprender

mejor los mecanismos de acción de estos microARNs en la fisiopatología de las enfermedades óseas e intentaremos reproducir dichos resultados en el suero de pacientes. Esto nos ayudará a ampliar los conocimientos necesarios para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y nuevos marcadores diagnósticos más precisos, precoces y menos lesivos para nuestros pacientes.

# Conclusiones



## 6. CONCLUSIONES

1. miR-518f se expresa más en hueso de sujetos con osteoporosis que en sujetos con artrosis.
2. miR-518f se expresa más en hueso de sujetos con osteoporosis que en hueso de controles.
3. miR-187 se expresa más en hueso de sujetos con artrosis que en sujetos con osteoporosis.
4. miR-187 se expresa más en hueso de sujetos con artrosis que en hueso de controles.
5. La expresión simultánea de miR-187 y miR-518f se asocia de manera más importante con la osteoporosis que cada uno de ellos por separado.
6. miR-187 y miR-518f han mostrado diferencias suficientemente importantes para ser estudiados como futuros biomarcadores del metabolismo óseo (herramientas diagnósticas, pronósticas y/o terapéuticas).
7. Globalmente, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que algunos microARNs contribuyen a explicar la patogenia de enfermedades esqueléticas comunes como la osteoporosis y la artrosis. Los mecanismos moleculares implicados aún deben ser identificados.





# Bibliografía



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 2002;3(1):REVIEWS3001.
2. Velasco J, Riancho JA. La vía Wnt y el hueso. *Rev Esp Enferm Metab Oseas.* 2008;17(1):5–9.
3. Velasco Montes J, Riancho J, González Macías J. Polimorfismo de la vía de señalización Wnt, fractura y artrosis de cadera [Tesis doctoral]. [Santander]: Universidad de Cantabria; 2010.
4. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1202–9.
5. Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, et al. BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2008;283(43):29119–25.
6. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003;24(2):218–35.
7. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med.* 2007;53(2):121–7.
8. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103–8.
9. Bilezikian JP. *Principles of Bone Biology.* Academic Press; 2002. 1744 p.
10. Van Leeuwen JP, van Driel M, van den Bemd GJ, Pols HA. Vitamin D control of osteoblast function and bone extracellular matrix mineralization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2001;11(1-3):199–226.

11. Greenblatt MB, Shim J-H, Zou W, Sitara D, Schweitzer M, Hu D, et al. The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2457–73.
12. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol*. 2010;658:43–9.
13. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997;89(5):755–64.
14. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006;235(1):176–90.
15. Plotkin LI, Lezcano V, Thostenson J, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *J Bone Miner Res*. 2008;23(11):1712–21.
16. Bivi N, Condon KW, Allen MR, Farlow N, Passeri G, Brun LR, et al. Cell autonomous requirement of connexin 43 for osteocyte survival: consequences for endocortical resorption and periosteal bone formation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2012;27(2):374–89.
17. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337–42.
18. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med*. 2006;354(21):2250–61.
19. Suva LJ, Gaddy D, Perrien DS, Thomas RL, Findlay DM. Regulation of bone mass by mechanical loading: microarchitecture and genetics. *Curr Osteoporos Rep*. 2005;3(2):46–51.

20. Skerry TM. The response of bone to mechanical loading and disuse: fundamental principles and influences on osteoblast/osteocyte homeostasis. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):117–23.
21. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med*. 1993;94(6):646–50.
22. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1994;843:1–129.
23. Martín Millán M, Riancho Moral JA, Macías JG. Efectos antiosteoporóticos de los estrógenos. Estudio sobre las acciones del receptor de estrógeno alfa en células de linaje osteoclástico. [Tesis doctoral]. [Santander]: Cantabria; 2009.
24. Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2002;23(3):303–26.
25. Delgado Calle J, Riancho Moral JA. Implicación de los mecanismos epigenéticos en enfermedades esqueléticas prevalentes [Tesis doctoral]. [Santander]: Cantabria; 2012.
26. Consenso iberoamericano de osteoporosis SIBOMM 2009. 2009.
27. Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, et al. The Epidemiology of Osteoporosis-Bone Evaluation Study (BEST): An Analysis of Routine Health Insurance Data. *Dtsch Ärzteblatt Int*. 2013;110(4):52–7.
28. Guañabens N. Osteoporosis: realidad o ficción. *Reumatol Clin*. 2007;3:23–5.
29. Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(2 Suppl):S3–11.

30. Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int.* 2007;18(1):77–84.
31. Quintana JM, Arostegui I. Prevalence of knee and hip osteoarthritis and the appropriateness of joint replacement in an older population. *Arch Intern Med.* 2008;168(14):1576–84.
32. Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology.* 2002;3(5):257–64.
33. Allen KD. Racial and ethnic disparities in osteoarthritis phenotypes. *Curr Opin Rheumatol.* 2010;22(5):528–32.
34. Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2005;13(9):769–81.
35. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18(1):24–33.
36. Brandt KD, Dieppe P, Radin EL. Etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008;34(3):531–59.
37. Chapman K, Valdes AM. Genetic factors in OA pathogenesis. *Bone.* 2012;51(2):258–64.
38. Amin S. Osteoarthritis and bone mineral density: what is the relation and why does it matter? *J Rheumatol.* 2002;29(7):1348–9.
39. Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet.* 2006;15 Spec No 1:R95–101.

40. Cavagnari BM. [Regulation of gene expression: how do epigenetic mechanisms work]. *Arch Argent Pediatr*. 2012;110(2):132–6.
41. Uitterlinden AG, Pols HAP, Riancho JA, Macías JG. Genética de la osteoporosis. *Manual Práctico de la Osteoporosis y Enfermedades del Metabolismo Óseo*. 1ª ed. Madrid: Jarpyo; 2004. p. 49–50.
42. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.
43. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *Plos Biol*. 2005;3(3):e85.
44. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997–1006.
45. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010;50(4):298–301.
46. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1148–59.
47. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522–31.
48. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 2004;18(5):504–11.
49. Scheideler M, Elabd C, Zaragosi L-E, Chiellini C, Hackl H, Sanchez-Cabo F, et al. Comparative transcriptomics of human multipotent stem cells during adipogenesis and osteoblastogenesis. *Bmc Genomics*. 2008;9:340.

50. Inose H, Ochi H, Kimura A, Fujita K, Xu R, Sato S, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(49):20794–9.
51. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. 2010;28(2):357–64.
52. Chen Q, Liu W, Sinha KM, Yasuda H, de Crombrughe B. Identification and Characterization of MicroRNAs Controlled by the Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix. *Plos One*. 2013;8(3):e58104.
53. Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem*. 2009;108(1):216–24.
54. Kapinas K, Delany AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(3):220.
55. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):13906–11.
56. Hassan MQ, Gordon JAR, Beloti MM, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, et al. A network connecting Runx2, SATB2, and the miR-23a~27a~24-2 cluster regulates the osteoblast differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(46):19879–84.
57. Luzi E, Marini F, Sala SC, Tognarini I, Galli G, Brandi ML. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J Bone Miner Res*. 2008;23(2):287–95.



58. Itoh T, Nozawa Y, Akao Y. MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5. *J Biol Chem*. 2009;284(29):19272–9.
59. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368(2):267–72.
60. Schaap-Oziemlak AM, Raymakers RA, Bergevoet SM, Gilissen C, Jansen BJH, Adema GJ, et al. MicroRNA hsa-miR-135b regulates mineralization in osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(6):877–85.
61. Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(15):6139–44.
62. Yu F, Cui Y, Zhou X, Zhang X, Han J. Osteogenic differentiation of human ligament fibroblasts induced by conditioned medium of osteoclast-like cells. *Biosci Trends*. 2011;5(2):46–51.
63. Yang L, Cheng P, Chen C, He H-B, Xie G-Q, Zhou H-D, et al. miR-93/Sp7 function loop mediates osteoblast mineralization. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2012;27(7):1598–606.
64. Kim KM, Park SJ, Jung S-H, Kim EJ, Jogeswar G, Ajita J, et al. miR-182 is a negative regulator of osteoblast proliferation, differentiation, and skeletogenesis through targeting FoxO1. *J Bone Miner Res*. 2012;27(8):1669–79.

65. Zhang Y, Xie R-L, Croce CM, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(24):9863–8.
66. Itoh T, Takeda S, Akao Y. MicroRNA-208 modulates BMP-2-stimulated mouse preosteoblast differentiation by directly targeting V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1. *J Biol Chem*. 2010;285(36):27745–52.
67. Wang X, Guo B, Li Q, Peng J, Yang Z, Wang A, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat Med*. 2013;19(1):93–100.
68. Liu W, Liu Y, Guo T, Hu C, Luo H, Zhang L, et al. TCF3, a novel positive regulator of osteogenesis, plays a crucial role in miR-17 modulating the diverse effect of canonical Wnt signaling in different microenvironments. *Cell Death Dis*. 2013;4:e539.
69. Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan Y-F, et al. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3666–77.
70. Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, Yagi K, Yatsuka-Kanesaki Y, Suda T, et al. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *Febs Lett*. 2009 Jul 7;583(13):2263–8.
71. Gao J, Yang T, Han J, Yan K, Qiu X, Zhou Y, et al. MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem*. 2011;112(7):1844–56.
72. Jafferji M. Regulation of osteoblast differentiation by microRNAs [Thesis]. [Worcester]: Worcester Polytechnic Institute; 2009.

73. Kim YJ, Bae SW, Yu SS, Bae YC, Jung JS. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *J Bone Miner Res.* 2009;24(5):816–25.
74. Zhang J, Tu Q, Bonewald LF, He X, Stein G, Lian J, et al. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1953–63.
75. Guo J, Ren F, Wang Y, Li S, Gao Z, Wang X, et al. miR-764-5p promotes osteoblast differentiation through inhibition of CHIP/STUB1 expression. *J Bone Miner Res.* 2012;27(7):1607–18.
76. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2009;284(23):15676–84.
77. Guo L, Xu J, Qi J, Zhang L, Wang J, Liang J, et al. MicroRNA-17-92a upregulation by estrogen leads to Bim targeting and inhibition of osteoblast apoptosis. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 4):978–88.
78. Yang N, Wang G, Hu C, Shi Y, Liao L, Shi S, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2013;28(3):559–73.
79. Lisse TS, Chun RF, Rieger S, Adams JS, Hewison M. Vitamin D activation of functionally distinct regulatory miRNAs in primary human osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2013;28(6):1478–88.
80. Eguchi T, Watanabe K, Hara ES, Ono M, Kuboki T, Calderwood SK. OsteMiR: A Novel Panel of MicroRNA Biomarkers in Osteoblastic and Osteocytic Differentiation from Mesenchymal Stem Cells. *Plos One.* 2013;8(3):e58796.

81. Wang F-S, Chuang P-C, Chung P-C, Lin C-L, Chen M-W, Ke H-J, et al. MicroRNA-29a protects against glucocorticoid-induced bone loss and fragility in rats by orchestrating bone acquisition and resorption. *Arthritis Rheum.* 2013;65(6):1530–40.
82. 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(20):14264–75.
83. Sugatani T, Hruska KA. MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem.* 2007;101(4):996–9.
84. Cheng P, Chen C, He H-B, Hu R, Zhou H-D, Xie H, et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J Bone Miner Res.* 2013;28(5):1180–90.
85. Lei S-F, Papasian CJ, Deng H-W. Polymorphisms in predicted miRNA binding sites and osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):72–8.
86. Zhou Q, Zhao Z, Cheng J, Zhang B, Xu J, Huang F, et al. Ibandronate promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating the expression of microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;404:127–32.
87. Seeliger C, Karpinski K, Haug A, Vester H, Schmitt A, Bauer J, et al. Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs are Associated with Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2014 Jan 16; (in press).
88. Mura M, Cappato S, Giacomelli F, Ravazzolo R, Boccardi R. The role of the 3'UTR region in the regulation of the ACVR1/Alk-2 gene expression. *Plos One.* 2012;7(12):e50958.

89. Coppieters N, Dragunow M. Epigenetics in Alzheimer's disease: a focus on DNA modifications. *Curr Pharm Des.* 2011;17(31):3398–412.
90. Kwok JBJ. Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Epigenomics.* 2010;2(5):671–82.
91. Fardellone P. Predicting the fracture risk in 2008. *Jt Bone Spine Rev Rhum.* 2008;75(6):661–4.
92. Cummings SR, Palermo L, Browner W, Marcus R, Wallace R, Pearson J, et al. Monitoring osteoporosis therapy with bone densitometry: misleading changes and regression to the mean. Fracture Intervention Trial Research Group. *Jama J Am Med Assoc.* 2000;283(10):1318–21.
93. Ono M, Inkson CA, Kilts TM, Young MF. WISP-1/CCN4 regulates osteogenesis by enhancing BMP-2 activity. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2011;26(1):193–208.
94. Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2001;276(23):20659–72.
95. Wensel TM, Iranikhah MM, Wilborn TW. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *Pharmacotherapy.* 2011;31(5):510–23.
96. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* 2006;38(12):1424–9.

97. Haÿ E, Laplantine E, Geoffroy V, Frain M, Kohler T, Müller R, et al. N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol Cell Biol.* 2009;29(4):953–64.
98. Zhang X, Yu S, Galson DL, Luo M, Fan J, Zhang J, et al. Activating transcription factor 4 is critical for proliferation and survival in primary bone marrow stromal cells and calvarial osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2008;105(3):885–95.
99. Zhu K, Jiao H, Li S, Cao H, Galson DL, Zhao Z, et al. ATF4 promotes bone angiogenesis by increasing VEGF expression and release in the bone environment. *J Bone Miner Res.* 2013;28(9):1870–84.
100. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, et al. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2010;30(12):3071–85.
101. Edwards CM, Mundy GR. Eph receptors and ephrin signaling pathways: a role in bone homeostasis. *Int J Med Sci.* 2008;5(5):263–72.
102. Otto F, Kanegane H, Mundlos S. Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat.* 2002;19(3):209–16.
103. Fox SW, Lovibond AC. Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;243(1-2):19–26.
104. Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta )-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21352–60.

105. Ruiz S. Cultivo primario para el estudio de la función osteoblástica [Tesis doctoral]. [Barcelona]: Universidad Autonoma de Barcelona; 2005.
106. Ko J-Y, Chuang P-C, Chen M-W, Ke H-C, Wu S-L, Chang Y-H, et al. MicroRNA-29a ameliorates glucocorticoid-induced suppression of osteoblast differentiation by regulating  $\beta$ -catenin acetylation. *Bone*. 2013;57(2):468–75.
107. Chen P-Y, Qin L, Barnes C, Charisse K, Yi T, Zhang X, et al. FGF regulates TGF- $\beta$  signaling and endothelial-to-mesenchymal transition via control of let-7 miRNA expression. *Cell Reports*. 2012;2(6):1684–96.
108. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*. 2007;13(8):952–61.
109. Kitao A, Sato Y, Sawada-Kitamura S, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, et al. Endothelial to mesenchymal transition via transforming growth factor-beta1/Smad activation is associated with portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension. *Am J Pathol*. 2009;175(2):616–26.
110. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):216.
111. Deng Y, Bi X, Zhou H, You Z, Wang Y, Gu P, et al. Repair of critical-sized bone defects with anti-miR-31-expressing bone marrow stromal stem cells and poly(glycerol sebacate) scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2014;27:13–25.
112. Rose L, Uludağ H. Realizing the potential of gene-based molecular therapies in bone repair. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2013;28(11):2245–62.
113. Wang J, Lu Z, Wientjes MG, Au JL-S. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *Aaps J*. 2010;12(4):492–503.





# ANEXOS



## 9. ANEXOS

Anexo 1. Listado de los microARNs presentes en el pool A de Applied Biosystems utilizados para el análisis de los miniarrays.

miRBase ID_v18	LT <sup>†</sup> Assay ID	LT <sup>†</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-let-7a-5p	000377	hsa-let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7c	000379	hsa-let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
hsa-let-7d-5p	002283	hsa-let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
hsa-let-7e-5p	002406	hsa-let-7e	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7f-5p	000382	hsa-let-7f	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
hsa-let-7g-5p	002282	hsa-let-7g	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
hsa-miR-1	002222	hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
hsa-miR-9-5p	000583	hsa-miR-9	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-10a-5p	000387	hsa-miR-10a	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG
hsa-miR-10b-5p	002218	hsa-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
hsa-miR-15a-5p	000389	hsa-miR-15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUUGUG
hsa-miR-15b-5p	000390	hsa-miR-15b	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
hsa-miR-16-5p	000391	hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAUUUUUGGCG
hsa-miR-17-5p	002308	hsa-miR-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-18a-5p	002422	hsa-miR-18a	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
hsa-miR-18b-5p	002217	hsa-miR-18b	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG
hsa-miR-19a-3p	000395	hsa-miR-19a	UGUGCAAUCUUAUGCAAACUGA
hsa-miR-19b-3p	000396	hsa-miR-19b	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA
hsa-miR-20a-5p	000580	hsa-miR-20a	UAAAGUGCUUUAUGUGCAGGUAG
hsa-miR-20b-5p	001014	hsa-miR-20b	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG
hsa-miR-21-5p	00397	hsa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUUUUGA
hsa-miR-22-3p	000398	hsa-miR-22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU
hsa-miR-23a-3p	000399	hsa-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC
hsa-miR-23b-3p	000400	hsa-miR-23b	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
hsa-miR-24-3p	000402	hsa-miR-24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
hsa-miR-25-3p	000403	hsa-miR-25	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA
hsa-miR-26a-5p	000405	hsa-miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
hsa-miR-26b-5p	000407	hsa-miR-26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU
hsa-miR-27a-3p	000408	hsa-miR-27a	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG
hsa-miR-27b-3p	000409	hsa-miR-27b	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
hsa-miR-28-3p	002446	hsa-miR-28-3p	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA
hsa-miR-28-5p	000411	hsa-miR-28-5p	AAGGAGCUCACAGUCUAAUUGAG
hsa-miR-29a-3p	002112	hsa-miR-29a	UAGCACCAUCUGAAUUCGGUUA

miRBase ID_v18	LT <sup>†</sup> Assay ID	LT <sup>†</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-29b-3p	000413	hsa-miR-29b	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-29c-3p	000587	hsa-miR-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-30b-5p	000602	hsa-miR-30b	UGUAAACAUCUACACUCAGCU
hsa-miR-30c-5p	000419	hsa-miR-30c	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC
hsa-miR-31-5p	002279	hsa-miR-31	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU
hsa-miR-32-5p	002109	hsa-miR-32	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA
hsa-miR-33b-5p	002085	hsa-miR-33b	GUGCAUUGCUGUUGCAUUGC
hsa-miR-34a-5p	000426	hsa-miR-34a	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU
hsa-miR-34c-5p	000428	hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUGCUGAUUGC
hsa-miR-92a-3p	000431	hsa-miR-92a	UAUUGCACUUGUCCCGCCUGU
hsa-miR-93-5p	001090	mmu-miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG
hsa-miR-95	000433	hsa-miR-95	UUCAACGGGUUUUUAUUGAGCA
hsa-miR-96-5p	000186	mmu-miR-96	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU
hsa-miR-98	000577	hsa-miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU
hsa-miR-99a-5p	000435	hsa-miR-99a	AACCCGUAGAUCGUAUCUUGUG
hsa-miR-99b-5p	000436	hsa-miR-99b	CACCCGUAGAACCAGCCUUGCG
hsa-miR-100-5p	000437	hsa-miR-100	AACCCGUAGAUCGUAUCUUGUG
hsa-miR-101-3p	002253	hsa-miR-101	UACAGUACUGUGUAACUGAA
hsa-miR-103a-3p	000439	hsa-miR-103	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-105-5p	002167	hsa-miR-105	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGU
hsa-miR-106a-5p	002169	hsa-miR-106a	AAAAGUCUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-106b-5p	000442	hsa-miR-106b	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
hsa-miR-107	000443	hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA
hsa-miR-122-5p	002245	hsa-miR-122	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
hsa-miR-124-3p	001182	mmu-miR-124a	UAAGGCACGGUGAAUGCC
hsa-miR-125a-3p	002199	hsa-miR-125a-3p	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC
hsa-miR-125a-5p	002198	hsa-miR-125a-5p	UCCUGAGACCCUUUACCUGUGA
hsa-miR-125b-5p	000449	hsa-miR-125b	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA
hsa-miR-126-3p	002228	hsa-miR-126	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
hsa-miR-127-3p	000452	hsa-miR-127-3p	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU
hsa-miR-127-5p	002229	hsa-miR-127-5p	CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAU
hsa-miR-128	002216	hsa-miR-128	UCACAGUGAACGGUCUCUUU
hsa-miR-129-2-3p	001184	mmu-miR-129-3p	AAGCCUUAACCCAAAAAGCAU
hsa-miR-129-5p	000590	hsa-miR-129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
hsa-miR-130a-3p	000454	hsa-miR-130a	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU
hsa-miR-130b-3p	000456	hsa-miR-130b	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
hsa-miR-132-3p	000457	hsa-miR-132	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG
hsa-miR-133a	002246	hsa-miR-133a	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-133b	002247	hsa-miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA
hsa-miR-134	001186	mmu-miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG
hsa-miR-135a-5p	000460	hsa-miR-135a	UAUGGCUUUUUUAUCCUAUGUGA
hsa-miR-135b-5p	002261	hsa-miR-135b	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA
hsa-miR-136-5p	000592	hsa-miR-136	ACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGA
hsa-miR-137	001129	mmu-miR-137	UUUAUUGCUAAGAUAACGCGUAG
hsa-miR-138-5p	002284	hsa-miR-138	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG
hsa-miR-139-3p	002313	hsa-miR-139-3p	GGAGACGCGGCCUUGUGGAGU
hsa-miR-139-5p	002289	hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG
hsa-miR-140-3p	002234	hsa-miR-140-3p	UACCACAGGGUAGAACCACGG
hsa-miR-140-5p	001187	mmu-miR-140	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
hsa-miR-141-3p	000463	hsa-miR-141	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG
hsa-miR-142-3p	000464	hsa-miR-142-3p	UGUAGUGUUCCUACUUUAUGGA
hsa-miR-142-5p	002248	hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
hsa-miR-143-3p	002249	hsa-miR-143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
hsa-miR-145-5p	002278	hsa-miR-145	GUCCAGUUUCCAGGAUCCCU
hsa-miR-146a-5p	000468	hsa-miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUUGGGUU
hsa-miR-146b-3p	002361	hsa-miR-146b-3p	UGCCUGUGGACUCAGUUCUGG
hsa-miR-146b-5p	001097	hsa-miR-146b	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU
hsa-miR-147b	002262	hsa-miR-147b	GUGUGCGGAAUUGCUUCUGCUA
hsa-miR-148a-3p	000470	hsa-miR-148a	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
hsa-miR-148b-3p	000471	hsa-miR-148b	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
hsa-miR-149-5p	002255	hsa-miR-149	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC
hsa-miR-150-5p	000473	hsa-miR-150	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG
hsa-miR-152	000475	hsa-miR-152	UCAGUGCAUGACAGAACUUGG
hsa-miR-153	001191	mmu-miR-153	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC
hsa-miR-154-5p	000477	hsa-miR-154	UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCG
hsa-miR-181a-5p	000480	hsa-miR-181a	AACAUUCAACGUCUGCGGUGAGU
hsa-miR-181c-5p	000482	hsa-miR-181c	AACAUUCAACCGUCGGUGAGU
hsa-miR-182-5p	002334	hsa-miR-182	UUUGGCAAUGGUAGAUCACACU
hsa-miR-183-5p	002269	hsa-miR-183	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU
hsa-miR-184	000485	hsa-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAAAGGU
hsa-miR-185-5p	002271	hsa-miR-185	UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA
hsa-miR-186-5p	002285	hsa-miR-186	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU
hsa-miR-187-3p	001193	mmu-miR-187	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG
hsa-miR-188-3p	002106	hsa-miR-188-3p	CUCCACAUGCAGGGUUUGCA
hsa-miR-190a	000489	hsa-miR-190	UGAUUUGUUUGAUUAUUAGGU
hsa-miR-191-5p	002299	hsa-miR-191	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG

miRBase ID_v18	LT <sup>†</sup> Assay ID	LT <sup>†</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-192-5p	000491	hsa-miR-192	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
hsa-miR-193a-3p	002250	hsa-miR-193a-3p	AACUGGCCUACAAGUCCAGU
hsa-miR-193a-5p	002281	hsa-miR-193a-5p	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA
hsa-miR-193b-3p	002367	hsa-miR-193b	AACUGGCCCUACAAGUCCGCU
hsa-miR-194-5p	000493	hsa-miR-194	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA
hsa-miR-195-5p	000494	hsa-miR-195	UAGCAGCACAGAAUUAUUGGC
hsa-miR-196b-5p	002215	hsa-miR-196b	UAGGUAGUUCCUGUUGUUGGG
hsa-miR-197-3p	000497	hsa-miR-197	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC
hsa-miR-198	002273	hsa-miR-198	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC
hsa-miR-199a-5p	000498	hsa-miR-199a	CCCAGUGUUCAGACUACCGUUC
hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-199b-3p	002304	hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
hsa-miR-199b-5p	000500	hsa-miR-199b	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC
hsa-miR-200a-3p	000502	hsa-miR-200a	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
hsa-miR-200b-3p	002251	hsa-miR-200b	UAAUACUGCCUGGUAUUGAUGA
hsa-miR-200c-3p	002300	hsa-miR-200c	UAAUACUGCCGGGUAAUUGAUGGA
hsa-miR-202-3p	002363	hsa-miR-202	AGAGGUUAUAGGGCAUGGGAA
hsa-miR-203	000507	hsa-miR-203	GUGAAUUGUUUAGGACCACUAG
hsa-miR-204-5p	000508	hsa-miR-204	UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
hsa-miR-205-5p	000509	hsa-miR-205	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG
hsa-miR-208b	002290	hsa-miR-208b	AUAAGACGAACAAAAGGUUUUGU
hsa-miR-210	000512	hsa-miR-210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
hsa-miR-214-3p	002306	hsa-miR-214	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
hsa-miR-215	000518	hsa-miR-215	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC
hsa-miR-216a	002220	hsa-miR-216a	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA
hsa-miR-216b	002326	hsa-miR-216b	AAAUCUCUGCAGGCAAAUGUGA
hsa-miR-217	002337	hsa-miR-217	UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGA
hsa-miR-218-5p	000521	hsa-miR-218	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU
hsa-miR-219-5p	000522	hsa-miR-219	UGAUUGUCCAAACGCAAUUCU
hsa-miR-221-3p	000524	hsa-miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
hsa-miR-222-3p	002276	hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
hsa-miR-223-3p	002295	hsa-miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
hsa-miR-224-5p	002099	hsa-miR-224	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU
hsa-miR-296-3p	002101	hsa-miR-296-3p	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC
hsa-miR-296-5p	000527	hsa-miR-296	AGGGCCCCCCUCAAUCCUGU
hsa-miR-299-3p	001015	hsa-miR-299-3p	UAUGUGGGAUGGUAAACCGCUU
hsa-miR-299-5p	000600	hsa-miR-299-5p	UGGUUUACCGUCCCAUACAU
hsa-miR-301a-3p	000528	hsa-miR-301a	CAGUGCAAUGAUUUGUCAAAAGC
hsa-miR-301b	002392	hsa-miR-301b	CAGUGCAAUGAUUUGUCAAAAGC

miRBase ID_v18	LT <sup>†</sup> Assay ID	LT <sup>†</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-302a-3p	000529	hsa-miR-302a	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA
hsa-miR-302b-3p	000531	hsa-miR-302b	UAAGUGCUUCCAUGUUUAGUAG
hsa-miR-302c-3p	000533	hsa-miR-302c	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG
hsa-miR-320a	0002277	hsa-miR-320	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
hsa-miR-323-3p	002227	hsa-miR-323-3p	CACAUUACACGGUCGACCUCU
hsa-miR-324-3p	002161	hsa-miR-324-3p	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG
hsa-miR-324-5p	000539	hsa-miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU
hsa-miR-326	000542	hsa-miR-326	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG
hsa-miR-328	000543	hsa-miR-328	CUGGCCUCUCUGCCUUCCGU
hsa-miR-329	110100	hsa-miR-329	AACACACUGGUUAACCCUUUU
hsa-miR-330-3p	000544	hsa-miR-330-3p	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA
hsa-miR-330-5p	002230	hsa-miR-330-5p	UCUCUGGGCCUGUGUCUAGGC
hsa-miR-331-3p	000545	hsa-miR-331	GCCCCUGGGCCUUAUCCUAGAA
hsa-miR-331-5p	002233	hsa-miR-331-5p	CUAGGUUAGGUCCAGGGAUCC
hsa-miR-335-5p	000546	hsa-miR-335	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU
hsa-miR-337-5p	002156	hsa-miR-337-5p	GAACGGCUUCAUACAGGAGUU
hsa-miR-338-3p	002252	hsa-miR-338-3p	UCCAGCAUCAGUAAUUUGUUG
hsa-miR-339-3p	002184	hsa-miR-339-3p	UGAGCGCCUCGACGACAGGCCG
hsa-miR-339-5p	002257	hsa-miR-339-5p	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG
hsa-miR-340-5p	002258	hsa-miR-340	UUAAAGCAAUGAGACUGAUU
hsa-miR-155-5p	002623	has-miR-155	UUAUUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
hsa-let-7b-5p	002619	hsa-let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
hsa-miR-342-3p	002260	hsa-miR-342-3p	UCUCACACAGAAUCGCACCCGU
hsa-miR-342-5p	002147	hsa-miR-342-5p	AGGGGUGCUAUCUGAUUGA
hsa-miR-345-5p	002186	hsa-miR-345	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC
hsa-miR-361-5p	000554	hsa-miR-361	UUAUCAGAAUCCAGGGGUAC
hsa-miR-362-3p	002117	hsa-miR-362-3p	AACACACCUAAUUAAGGAUUCA
hsa-miR-362-5p	001273	hsa-miR-362	AAUCCUUGGAACCUAGGUGUGAGU
hsa-miR-363-3p	001271	hsa-miR-363	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA
hsa-miR-365a-3p; hsa-miR-365b-3p	001020	hsa-miR-365	UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
hsa-miR-367-3p	000555	hsa-miR-367	AAUUGCACUUUAGCAAUGGUGA
hsa-miR-369-3p	000557	hsa-miR-369-3p	AAUAAUACAUGGUUGAUCUUU
hsa-miR-369-5p	001021	hsa-miR-369-5p	AGAUCGACCGUGUUAUUAUCGC
hsa-miR-370	002275	hsa-miR-370	GCCUGCUGGGGUGGAACCGGU
hsa-miR-371-3p	002124	hsa-miR-371-3p	AAGUGCCGCAUCUUUUGAGUGU
hsa-miR-372	000560	hsa-miR-372	AAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGU
hsa-miR-373-3p	000561	hsa-miR-373	GAAGUCUUCGAUUUUGGGGUGU
hsa-miR-374a-5p	000563	hsa-miR-374	UUAAUACAACCUGAUAAGUG

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-374b-5p	001319	mmu-miR-374-5p	AUAUAAUACAACCUAGUAAGUG
hsa-miR-375	000564	hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
hsa-miR-376a-3p	000565	hsa-miR-376a	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU
hsa-miR-376b	001102	hsa-miR-376b	AUCAUAGAGGAAAAUCCAUGUU
hsa-miR-377-3p	000566	hsa-miR-377	AUCACACAAAGGCAACUUUUGU
hsa-miR-379-5p	001138	mmu-miR-379	UGGUAGACUAUGGAACGUAGG
hsa-miR-380-3p	000569	hsa-miR-380-3p	UAUGUAAUAUGGUCCACAUCUU
hsa-miR-381	000571	hsa-miR-381	UAUACAAGGGCAAGCUCUCUGU
hsa-miR-382-5p	000572	hsa-miR-382	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG
hsa-miR-383	000573	hsa-miR-383	AGAUCAGAAGGUGAUUGUGGCU
hsa-miR-409-5p	002331	hsa-miR-409-5p	AGGUUACCCGAGCAACUUUGCAU
hsa-miR-410	001274	hsa-miR-410	AAUUAUAACACAGAUAGCCUGU
hsa-miR-411-5p	001610	hsa-miR-411	UAGUAGACCGUAUAGCGUACG
hsa-miR-422a	002297	hsa-miR-422a	ACUGGACUUAGGGUCAGAAGGC
hsa-miR-423-5p	002340	hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU
hsa-miR-424-5p	000604	hsa-miR-424	CAGCAGCAAUUCAGUUUUUGAA
hsa-miR-425-5p	001516	hsa-miR-425-5p	AAUGACACGAUCACUCCGUUGA
hsa-miR-429	001024	hsa-miR-429	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU
hsa-miR-431-5p	001979	hsa-miR-431	UGUCUUGCAGGCCGUCAUGCA
hsa-miR-433	001028	hsa-miR-433	AUCAUGAUGGGUCCUCGGUGU
hsa-miR-449a	001030	hsa-miR-449	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
hsa-miR-449b-5p	001608	hsa-miR-449b	AGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGC
hsa-miR-450a-5p	002303	hsa-miR-450a	UUUUGCGAUGUGUUCUAAUUAU
hsa-miR-450b-3p	002208	hsa-miR-450b-3p	UUGGGAUCAUUUUGCAUCCAUA
hsa-miR-450b-5p	002207	hsa-miR-450b-5p	UUUUGCAAUAUGUUCUGAAUA
hsa-miR-451a	001141	hsa-miR-451	AAACCGUUACCAUACUGAGUU
hsa-miR-452-5p	002329	hsa-miR-452	AACUGUUUGCAGAGGAAACUGA
hsa-miR-323b-5p	002318	hsa-miR-453	AGGUUGUCCGUGGUGAGUUCGCA
hsa-miR-454-3p	002323	hsa-miR-454	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU
hsa-miR-455-3p	002244	hsa-miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUUAACAC
hsa-miR-455-5p	001280	hsa-miR-455	UAUGUGCCUUUGGACUACAUCG
hsa-miR-483-5p	002338	hsa-miR-483-5p	AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG
hsa-miR-484	001821	hsa-miR-484	UCAGGCUCAGUCCCUCCCGAU
hsa-miR-485-3p	001277	hsa-miR-485-3p	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU
hsa-miR-485-5p	001036	hsa-miR-485-5p	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC
hsa-miR-486-3p	002093	hsa-miR-486-3p	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU
hsa-miR-486-5p	001278	hsa-miR-486	UCCUGUACUGAGCUGCCCGAG
hsa-miR-487a	001279	hsa-miR-487a	AAUCAUACAGGGACAUCCAGUU



miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-487b	001285	hsa-miR-487b	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU
hsa-miR-488-3p	002357	hsa-miR-488	UUGAAAGGCUAUUUUCUUGGUC
hsa-miR-489	002358	hsa-miR-489	GUGACAUCACAUUACGGCAGC
hsa-miR-490-3p	001037	hsa-miR-490	CAACCUUGGAGGACUCCAUGCUG
hsa-miR-491-3p	002360	hsa-miR-491-3p	CUUAUGCAAGAUUCCCUUCUAC
hsa-miR-491-5p	001630	hsa-miR-491	AGUGGGGAACCCUCCAUGAGG
hsa-miR-493-3p	002364	hsa-miR-493	UGAAGGUCUACUGUGGCCAGG
hsa-miR-494	002365	hsa-miR-494	UGAAACAUACACGGGAAACCUC
hsa-miR-495	001663	hsa-miR-495	AAACAAACAUGGUGCACUUCUU
hsa-miR-496	001953	hsa-miR-496	UGAGUAUUACAUGGCCAAUCUC
hsa-miR-499a-3p	002427	hsa-miR-499-3p	AACAUCACAGCAAGUCUGUGCU
hsa-miR-499a-5p	001352	hsa-miR-499-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU
hsa-miR-500a-5p	002428	hsa-miR-500	UAAUCCUUGCUCACCGGUGAGA
hsa-miR-501-3p	002435	hsa-miR-501-3p	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUCU
hsa-miR-501-5p	001047	hsa-miR-501	AAUCCUUUGUCCUGGGUGAGA
hsa-miR-502-3p	002083	hsa-miR-502-3p	AAUGCACCGGGCAAGGAUUCA
hsa-miR-502-5p	001109	hsa-miR-502	AUCCUUGCUAUCUGGGUGCUA
hsa-miR-503	001048	hsa-miR-503	UAGCAGCGGGAACAGUUCUGCAG
hsa-miR-504	002084	hsa-miR-504	AGACCCUGGUCUGCACUCUAUC
hsa-miR-505-3p	002089	hsa-miR-505	CGUCAACACUUGCUGGUUCCU
hsa-miR-507	001051	hsa-miR-507	UUUUGCACUUUUGGAGUGAA
hsa-miR-508-3p	001052	hsa-miR-508	UGAUUGUAGCCUUUUGGAGUAGA
hsa-miR-508-5p	002092	hsa-miR-508-5p	UACUCCAGAGGGGUCACUCAUG
hsa-miR-509-5p	002235	hsa-miR-509-5p	UACUGCAGACAGUGGCAAUCA
hsa-miR-510	002241	hsa-miR-510	UACUCAGGAGAGUGGCAAUCAC
hsa-miR-512-3p	001823	hsa-miR-512-3p	AAGUGCUGUCAUAGCUGAGGUC
hsa-miR-512-5p	001145	hsa-miR-512-5p	CACUCAGCCUUGAGGGCACUUUC
hsa-miR-513-5p	002090	hsa-miR-513-5p	UUCACAGGGAGGUGUCAU
hsa-miR-515-3p	002369	hsa-miR-515-3p	GAGUGCCUUCUUUUGGAGCGUU
hsa-miR-515-5p	001112	hsa-miR-515-5p	UUCUCCAAAAGAAAGCACUUUCUG
hsa-miR-516a-5p	002416	hsa-miR-516a-5p	UUCUCGAGGAAAGAAGCACUUUC
hsa-miR-516b-5p	001150	hsa-miR-516b	AUCUGGAGGUAAGAAGCACUUU
hsa-miR-517a-3p; hsa-miR-517b-3p	002402	hsa-miR-517a	AUCGUGCAUCCUUUAGAGUGU
hsa-miR-517c-3p	001153	hsa-miR-517c	AUCGUGCAUCCUUUAGAGUGU
hsa-miR-518a-3p	002397	hsa-miR-518a-3p	GAAAGCGCUUCCCUUUGCUGGA
hsa-miR-518a-5p; hsa-miR-527	002396	hsa-miR-518a-5p	CUGCAAAGGGAAGCCUUUC
hsa-miR-518b	001156	hsa-miR-518b	CAAAGCGCUCCCUUAGAGGU
hsa-miR-518c-3p	002401	hsa-miR-518c	CAAAGCGCUUCUCUUAGAGUGU

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-518d-3p	001159	hsa-miR-518d	CAAAGCGCUUCCCUUUGGAGC
hsa-miR-518d-5p; hsa-miR-520c-5p;hsa-miR-526a	002389	hsa-miR-518d-5p	CUCUAGAGGGAAGCACUUUCUG
hsa-miR-518e-3p	002395	hsa-miR-518e	AAAGCGCUUCCCUUCAGAGUG
hsa-miR-518f-3p	002388	hsa-miR-518f	GAAAGCGCUUCUCUUUAGAGG
hsa-miR-519a-3p	002415	hsa-miR-519a	AAAGUGCAUCCUUUAGAGUGU
hsa-miR-519d	002403	hsa-miR-519d	CAAAGUGCCUCCCUUAGAGUG
hsa-miR-519e-3p	002370	hsa-miR-519e	AAGUGCCUCCUUUAGAGUGUU
hsa-miR-520a-3p	001167	hsa-miR-520a	AAAGUGCUUCCCUUUGGACUGU
hsa-miR-520a-5p	001168	hsa-miR-520a#	CUCCAGAGGGAAGUACUUUCU
hsa-miR-520d-5p	002393	hsa-miR-520d-5p	CUACAAAGGGAAGCCUUUC
hsa-miR-520g	001121	hsa-miR-520g	ACAAAGUGCUUCCCUUAGAGUGU
hsa-miR-521	001122	hsa-miR-521	AACGCACUCCCUUAGAGUGU
hsa-miR-522-3p	002413	hsa-miR-522	AAAAUGGUUCCCUUAGAGUGU
hsa-miR-523-3p	002386	hsa-miR-523	GAACGCUCUCCCUUAGAGGGU
hsa-miR-524-5p	001982	hsa-miR-524-5p	CUACAAAGGGAAGCACUUUCUC
hsa-miR-525-3p	002385	hsa-miR-525-3p	GAAGGCGCUUCCCUUAGAGCG
hsa-miR-525-5p	001174	hsa-miR-525	CUCCAGAGGGAUGCACUUUCU
hsa-miR-526b-5p	002382	hsa-miR-526b	CUCUUGAGGGAAGCACUUUCUGU
hsa-miR-532-3p	002355	hsa-miR-532-3p	CCUCCACACCCAAGGCUUGCA
hsa-miR-532-5p	001518	hsa-miR-532	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU
hsa-miR-539-5p	001286	hsa-miR-539	GGAGAAAUUACCUUGGUGUGU
hsa-miR-541-3p	002201	hsa-miR-541	UGGUGGGCACAGAAUCUGGACU
hsa-miR-542-3p	001284	hsa-miR-542-3p	UGUGACAGAUUGAUACUGAAA
hsa-miR-542-5p	002240	hsa-miR-542-5p	UCGGGAUCAUCAUGUCACGAGA
hsa-miR-544a	002265	hsa-miR-544	AUUCUGCAUUUUAGCAAGUUC
hsa-miR-545-3p	002267	hsa-miR-545	UCAGCAAACAUUUUUGUGUGC
hsa-miR-548a-3p	001538	hsa-miR-548a	CAAACUGGCAAUUACUUUUGC
hsa-miR-548a-5p	002412	hsa-miR-548a-5p	AAAAGUAAUUGCGAGUUUACC
hsa-miR-548b-3p	001541	hsa-miR-548b	CAAGAACCUCAGUUGCUUUUGU
hsa-miR-548b-3p	002408	hsa-miR-548b-5p	AAAAGUAAUUGGUUUUUGGCC
hsa-miR-548c-3p	001590	hsa-miR-548c	CAAAAUCUCAAUUACUUUUGC
hsa-miR-548am-5p; hsa-miR-548c-5p; hsa-miR-548o-5p	002429	hsa-miR-548c-5p	AAAAGUAAUUGCGUUUUUGCC
hsa-miR-548d-3p	001605	hsa-miR-548d	CAAAAACCACAGUUCUUUUGC
hsa-miR-548d-5p	002237	hsa-miR-548d-5p	AAAAGUAAUUGGUUUUUGGCC
hsa-miR-551b-3p	001535	hsa-miR-551b	GCGACCCAUACUUGGUUCAG
hsa-miR-556-3p	002345	hsa-miR-556-3p	AUAUUACCAUAGCUCAUCUUU

miRBase ID_v18	LT <sup>†</sup> Assay ID	LT <sup>†</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-556-5p	002344	hsa-miR-556-5p	GAUGAGCUCAUUGUAAUUGAG
hsa-miR-561-3p	001528	hsa-miR-561	CAAAGUUUAAGAUCUUGAAGU
hsa-miR-570-3p	002347	hsa-miR-570	CGAAAACAGCAAUACUUUGC
hsa-miR-574-3p	002349	hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACCCACA
hsa-miR-576-3p	002349	hsa-miR-576-3p	AAGAUGUGGAAAAAUUGGAAUC
hsa-miR-576-5p	002350	hsa-miR-576-5p	AUUCUAAUUUCUCCACGUCUUU
hsa-miR-579	002398	hsa-miR-579	UUCAUUUGGUUAAAACCGCAUU
hsa-miR-582-3p	002399	hsa-miR-582-3p	UAACUGGUUGAACACUGAACCC
hsa-miR-582-5p	001983	hsa-miR-582-5p	UUACAGUUGUUAACAGUUACU
hsa-miR-589-5p	002409	hsa-miR-589	UGAGAACCACGUCGUCUGAG
hsa-miR-590-5p	001984	hsa-miR-590-5p	GAGCUUUAUCAAAAAGUGCAG
hsa-miR-597	001551	hsa-miR-597	UGUGUCACUCGAUGACCACUGU
hsa-miR-598	001988	hsa-miR-598	UACGUCAUCGUUGUCAUCGUCA
hsa-miR-615-3p	001960	mmu-miR-615	UCCGAGCCUGGGUCUCCUCUU
hsa-miR-615-5p	002353	hsa-miR-615-5p	GGGGGUCCCCGGUGUCGGAUC
hsa-miR-616-3p	002414	hsa-miR-616	AGUCAUUGGAGGGUUUGAGCAG
hsa-miR-618	001593	hsa-miR-618	AAACUCUACUUGUCCUUCUGAGU
hsa-miR-624-3p	002430	hsa-miR-624	CACAAGGUAAUUGGUUUUACCU
hsa-miR-625-5p	002431	hsa-miR-625	AGGGGAAAGUUCUAUAGUCC
hsa-miR-627	001560	hsa-miR-627	GUGAGUCUCUAGAAAAGAGGA
hsa-miR-628-5p	002433	hsa-miR-628-5p	AUGCUGACAUUUUACUAGAGG
hsa-miR-629-5p	002436	hsa-miR-629	UGGGUUUACGUUGGGAGAACU
hsa-miR-636	002088	hsa-miR-636	UGUGCUUGCUCGUCCGCCCGCA
hsa-miR-642a-5p	001592	hsa-miR-642	GUCCUCUCCAAUUGUGUCUUG
hsa-miR-651	001604	hsa-miR-651	UUUAGGAUAAGCUUGACUUUUG
hsa-miR-652-3p	002352	hsa-miR-652	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG
hsa-miR-653	002292	hsa-miR-653	GUGUUGAAACAAUCUCUACUG
hsa-miR-654-3p	002239	hsa-miR-654-3p	UAUGUCUGCUGACCAUCACCUU
hsa-miR-654-5p	001611	hsa-miR-654-5p	UGGUGGGCCGAGAACAUGUGC
hsa-miR-655	001612	hsa-miR-655	AUAAUACAUGGUUAACCUCUUU
hsa-miR-660-5p	001515	hsa-miR-660	UACCAUUGCAUAUCGGAGUUG
hsa-miR-671-3p	002322	hsa-miR-671-3p	UCCGGUUCUCAGGGCUCACC
hsa-miR-672 (v10)	002327	hsa-miR-672	UGAGGUUGGUGUACUGUGUGUA
hsa-miR-674 (v10)	002021	hsa-miR-674	GCACUGAGAUGGGAGUGGUGUA
hsa-miR-708-5p	002341	hsa-miR-708	AAGGAGCUUACAAUCUAGCUGGG
hsa-miR-744-5p	002324	hsa-miR-744	UGC GG GCUAGGGCUAACAGCA
hsa-miR-758	001990	hsa-miR-758	UUUGUGACCUGGUCCACUAACC
hsa-miR-871 (v10)	002354	hsa-miR-871	UAUUCAGAUUAGUGCAGUCAUG

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-872 (v10)	002264	hsa-miR-872	AAGGUUACUUGUUAGUUCAGG
hsa-miR-873-5p	002356	hsa-miR-873	GCAGGAACUUGUGAGUCUCCU
hsa-miR-874	002268	hsa-miR-874	CUGCCCUGGCCGAGGGACCGA
hsa-miR-875-3p	002204	hsa-miR-875-3p	CCUGGAAACACUGAGGUUGUG
hsa-miR-876-3p	002225	hsa-miR-876-3p	UGGUGGUUUACAAGUAAUUCA
hsa-miR-876-5p	002205	hsa-miR-876-5p	UGGAUUUCUUUGUGAAUCACCA
hsa-miR-885-3p	002372	hsa-miR-885-3p	AGGCAGCGGGUGUGAGUGGAUA
hsa-miR-885-5p	002296	hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
hsa-miR-886-3p (v15)	002194	hsa-miR-886-3p	CGCGGGUGCUUACUGACCCUU
hsa-miR-886-5p (v15)	002193	hsa-miR-886-5p	CGGGUCGGAGUUAGCUCAAGCGG
hsa-miR-887	002374	hsa-miR-887	GUGAACGGGCGCCAUCCCGAGG
hsa-miR-888-5p	002212	hsa-miR-888	UACUCAAAAAGCUGUCAGUCA
hsa-miR-889	002202	hsa-miR-889	UUAAUAUCGGACAACCAUUGU
hsa-miR-890	002209	hsa-miR-890	UACUUGGAAAGGCAUCAGUUG
hsa-miR-891a	002191	hsa-miR-891a	UGCAACGAACCUGAGCCACUGA
hsa-miR-891b	002210	hsa-miR-891b	UGCAACUJACCUGAGUCAUUGA
hsa-miR-892a	002195	hsa-miR-892a	CACUGUGUCCUUUCUGCGUAG
hsa-miR-147a	000469	hsa-miR-147	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGC
hsa-miR-208a	000511	hsa-miR-208	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU
hsa-miR-211-5p	000514	hsa-miR-211	UUCCUUUGUCAUCCUUCGCCU
hsa-miR-212-3p	000515	hsa-miR-212	UAACAGUCCAGUCACGGCC
hsa-miR-219-1-3p	002095	hsa-miR-219-1-3p	AGAGUUGAGUCUGGACGUCCCG
hsa-miR-219-2-3p	002390	hsa-miR-219-2-3p	AGAAUUGUGGCUGGACAUCUGU
hsa-miR-220a (v15)	000523	hsa-miR-220	CCACACCGUAUCUGACACUUU
hsa-miR-220b (v15)	002206	hsa-miR-220b	CCACCACCGUGUCUGACACUU
hsa-miR-220c (v15)	002211	hsa-miR-220c	ACACAGGGCUGUUGUGAAGACU
hsa-miR-298	002190	hsa-miR-298	AGCAGAAGCAGGGAGGUUCUCCCA
hsa-miR-325	000540	hsa-miR-325	CCUAGUAGGUGUCCAGUAAGUGU
hsa-miR-346	000553	hsa-miR-346	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU
hsa-miR-376c	002122	hsa-miR-376c	AACAUAGAGGAAAUUCCACGU
hsa-miR-384	000574	hsa-miR-384	AUUCUAGAAUUGUUCAUA
hsa-miR-412	001023	hsa-miR-412	ACUUCACCGUCCACUAGCCGU
hsa-miR-448	001029	hsa-miR-448	UUGCAUAUGUAGGAUGUCCAU
hsa-miR-492	001039	hsa-miR-492	AGGACCUGCGGGACAAGAUUCUU
hsa-miR-506-3p	001050	hsa-miR-506	UAAGGCACCCUUCUGAGUAGA
hsa-miR-509-3-5p	002155	hsa-miR-509-3-5p	UACUGCAGACGUGGCAAUCAUG
hsa-miR-511	001111	hsa-miR-511	GUGUCUUUUGCUCUGCAGUCA
hsa-miR-517b (v17)	001152	hsa-miR-517b	UCGUGCAUCCUUUAGAGUGUU
miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-519c-3p	001163	hsa-miR-519c-3p	AAAGUGCAUCUUUUAGAGGAU
hsa-miR-520b	001116	hsa-miR-520b	AAAGUGCUUCCUUUUAGAGGG
hsa-miR-520e	001119	hsa-miR-520e	AAAGUGCUUCCUUUUAGAGGG
hsa-miR-520f	001120	hsa-miR-520f	AAGUGCUUCCUUUAGAGGGUU

Anexo 2. Listado de los microARNs presentes en el pool B de Applied Biosystems utilizados para el análisis de los miniarrays.

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-7-5p	000268	dme-miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU
hsa-miR-548i	002909	hsa-miR-548i	AAAAGUAAUUGCGGAUUUUGCC
hsa-miR-30a-3p	000416	hsa-miR-30a-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
hsa-miR-30a-5p	000417	hsa-miR-30a-5p	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG
hsa-miR-30d-5p	000420	hsa-miR-30d	UGUAAACAUCGCCGACUGGAAG
hsa-miR-30e-3p	000422	hsa-miR-30e-3p	CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
hsa-miR-34b-5p	000427	hsa-miR-34b	UAGGCAGUGUCAUUGCUGAUUG
hsa-miR-126-5p	000451	hsa-miR-126#	CAUUUUUACUUUUGGUACGCG
hsa-miR-154-3p	000478	hsa-miR-154#	AAUCAUACACGGUUGACCUAUU
hsa-miR-182-3p	000483	hsa-miR-213	UGGUUCUAGACUUGCCAACUA
hsa-miR-181a-3p	000516	hsa-miR-181a#	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC
hsa-miR-302c-5p	000534	hsa-miR-302c#	UUUACAUGGGGUUACUGCUG
hsa-miR-302d-3p	000535	hsa-miR-302d	UAAGUGCUUCAUGUUUGAGUGU
hsa-miR-378a-5p	000567	hsa-miR-378	CUCCUGACUCCAGGUCCUGUGU
hsa-miR-380-5p	000570	hsa-miR-380-5p	UGGUUGACCAUGAACAUGCGC
hsa-miR-1257	002910	hsa-miR-1257	AGUGAAUGAUGGGUUCUGACC
hsa-miR-200a-5p	001011	hsa-miR-200a#	CAUCUUACCGGACAGUCUGGA
hsa-miR-432-5p	001026	hsa-miR-432	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG
hsa-miR-432-3p	001027	hsa-miR-432#	CUGGAUGGCUCCUCAUGUCU
hsa-miR-497-5p	001043	hsa-miR-497	CAGCAGCACACUGUGGUUUUGU
hsa-miR-500a-3p	001046	hsa-miR-500	AUGCACCUGGGAAGGAUUCUG
hsa-miR-1238	002927	hsa-miR-1238	CUUCCUCGUCUGUCGCCCC
hsa-miR-488-5p	001106	hsa-miR-488	CCCAGAUAAUGGCACUCUCAA
hsa-miR-517-5p	001113	hsa-miR-517#	CCUCUAGAUGGAAGCACUGUCU
hsa-miR-516a-3p; hsa-miR-516b-3p	001149	hsa-miR-516-3p	UGCUUCCUUUCAGAGGGU
hsa-miR-518c-5p	001158	hsa-miR-518c#	UCUCUGGAGGGGAAGCACUUUCUG
hsa-miR-519e-5p	001166	hsa-miR-519e#	UUCUCCAAAAGGGAGCACUUUC
hsa-miR-520h	001170	hsa-miR-520h	ACAAAGUGCUCCUUUAGAGU
hsa-miR-524-3p	001173	hsa-miR-524	GAAGGCGCUUCCUUUGGAGU
hsa-let-7d-3p	001178	mmu-let-7d#	CUAUACGACCUUGCUGCCUUUCU
hsa-miR-363-5p	001283	hsa-miR-363#	CGGGUGGAUCACGAUGCAAUUU
hsa-miR-7-1-3p	001338	rno-miR-7#	CAACAAAUCACAGUCGCCAUA
hsa-miR-656	001510	hsa-miR-656	AAUAUUUACAGUCAACCUCU

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-549	001511	hsa-miR-549	UGACAACUAUGGAUGAGCUCU
hsa-miR-657	001512	hsa-miR-657	GGCAGGUUCACCCUCUCUAGG
hsa-miR-658	001513	hsa-miR-658	GGCGGAGGAAGUAGGUCCGUUGGU
hsa-miR-659-3p	001514	hsa-miR-659	CUUGGUUCAGGGAGGUCCCA
hsa-miR-551a	001519	hsa-miR-551a	GCGACCCACUCUUGGUUUCCA
hsa-miR-552	001520	hsa-miR-552	AACAGGUGACUGGUUAGACAA
hsa-miR-553	001521	hsa-miR-553	AAAACGGUGAGAUUUUGUUUU
hsa-miR-554	001522	hsa-miR-554	GCUAGUCCUGACUCAGCCAGU
hsa-miR-555	001523	hsa-miR-555	AGGGUAAGCUGAACCCUCUGAU
hsa-miR-557	001525	hsa-miR-557	GUUUGCACGGGUGGGCCUUGUCU
hsa-miR-558	001526	hsa-miR-558	UGAGCUGCUGUACCAAAU
hsa-miR-559	001527	hsa-miR-559	UAAAGUAAAUAUGCACCAAAA
hsa-miR-562	001529	hsa-miR-562	AAAGUAGCUGUACCAUUUGC
hsa-miR-563	001530	hsa-miR-563	AGGUUGACAUACGUUUCCC
hsa-miR-564	001531	hsa-miR-564	AGGCACGGUGUCAGCAGGC
hsa-miR-566	001533	hsa-miR-566	GGGCGCCUGUGAUCCCAAC
hsa-miR-567	001534	hsa-miR-567	AGUAUGUUCUCCAGGACAGAAC
hsa-miR-569	001536	hsa-miR-569	AGUUAUUGAAUCCUGGAAAGU
hsa-miR-586	001539	hsa-miR-586	UAUGCAUUGUAUUUUUAGGUCC
hsa-miR-587	001540	hsa-miR-587	UUUCCAUAGGUGAUGAGUCAC
hsa-miR-588	001542	hsa-miR-588	UUGGCCACA AUGGGUJAGAAC
hsa-miR-589-3p	001543	hsa-miR-589	UCAGAACA AAUUGCCGGUUC CAGA
hsa-miR-550a-3p	001544	hsa-miR-550	UGUCUUACUCCUCAGGCACAU
hsa-miR-591	001545	hsa-miR-591	AGACCAUGGGUUCUCAUUGU
hsa-miR-592	001546	hsa-miR-592	UUGUGUCAAU AUGCGAUGAUGU
hsa-miR-593-5p	001547	hsa-miR-593	AGGCACCAGCCAGGCAUUGCUCAGC
hsa-miR-596	001550	hsa-miR-596	AAGCCUGCCCGGCUCCUCGGG
hsa-miR-622	001553	hsa-miR-622	ACAGUCUGCUGAGGUUGGAGC
hsa-miR-599	001554	hsa-miR-599	GUUGUGUCAGUUUAUCAAC
hsa-miR-623	001555	hsa-miR-623	AUCCCUUGCAGGGGCUUGGGU
hsa-miR-600	001556	hsa-miR-600	ACUUACAGACAAGAGCCUUGCUC
hsa-miR-624-5p	001557	hsa-miR-624	UAGUACCAGUACCUUGUGUUCA
hsa-miR-601	001558	hsa-miR-601	UGGUCUAGGAUUGUUGGAGGAG
hsa-miR-626	001559	hsa-miR-626	AGCUGUCUGAAAAUGUCUU
hsa-miR-629-3p	001562	hsa-miR-629	GUUCUCCCAACGUAAGCCCAGC
hsa-miR-630	001563	hsa-miR-630	AGUAUUCUGUACCAGGGAAGGU
hsa-miR-631	001564	hsa-miR-631	AGACCUGGCCAGACCUCAGC
hsa-miR-603	001566	hsa-miR-603	CACACACUGCAAUUACUUUUGC

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-604	001567	hsa-miR-604	AGGCUGCGGAAUUCAGGAC
hsa-miR-605	001568	hsa-miR-605	UAAAUCCCAUGGUGCCUUCUCCU
hsa-miR-606	001569	hsa-miR-606	AAACUACUGAAAAUCAAGAU
hsa-miR-607	001570	hsa-miR-607	GUUCAAAUCCAGAUCUAUAAC
hsa-miR-608	001571	hsa-miR-608	AGGGGUGGUGUUGGGACAGCUCCGU
hsa-miR-609	001573	hsa-miR-609	AGGGUGUUUCUCUCAUCUCU
hsa-miR-633	001574	hsa-miR-633	CUAAUAGUAUCUACCACAAUAAA
hsa-miR-634	001576	hsa-miR-634	AACCAGCACCCCAACUUUGGAC
hsa-miR-635	001578	hsa-miR-635	ACUUGGGCACUGAAACAAUGUCC
hsa-miR-637	001581	hsa-miR-637	ACUGGGGGCUUUCGGGCUCUGCGU
hsa-miR-638	001582	hsa-miR-638	AGGGAUCCGCGGGCGGUGGGCCU
hsa-miR-639	001583	hsa-miR-639	AUCGCUGCGGUUGCGAGCGCUGU
hsa-miR-640	001584	hsa-miR-640	AUGAUCCAGGAACCGCCUCU
hsa-miR-641	001585	hsa-miR-641	AAAGACAUAGGAUAGAGUCACCUC
hsa-miR-613	001586	hsa-miR-613	AGGAAUGUCCUUCUUUGCC
hsa-miR-614	001587	hsa-miR-614	GAACGCCUGUUCUUGCCAGGUGG
hsa-miR-616-5p	001589	hsa-miR-616	ACUCAAACCCUUCAGUGACUU
hsa-miR-617	001591	hsa-miR-617	AGACUCCCAUUUGAAGGUGGC
hsa-miR-643	001594	hsa-miR-643	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG
hsa-miR-644a	001596	hsa-miR-644	AGUGUGGCUUUCUUAGAGC
hsa-miR-645	001597	hsa-miR-645	UCUAGGCUGGUACUGCUGA
hsa-miR-621	001598	hsa-miR-621	GGCUAGCAACAGCGCUUACCU
hsa-miR-646	001599	hsa-miR-646	AAGCAGCUGCCUCUGAGGC
hsa-miR-647	001600	hsa-miR-647	GUGGCUGCACUCACUUCUUC
hsa-miR-648	001601	hsa-miR-648	AAGUGUGCAGGGCACUGGU
hsa-miR-649	001602	hsa-miR-649	AAACCUUGUUGUUAAGAGUC
hsa-miR-650	001603	hsa-miR-650	AGGAGGCAGCGCUCUCAGGAC
hsa-miR-661	001606	hsa-miR-661	UGCCUGGGUCUCUGGCCUGCGCU
hsa-miR-662	001607	hsa-miR-662	UCCACGUUGUGGCCAGCAG
hsa-miR-571	001613	hsa-miR-571	UGAGUUGGCCAUCUGAGUGAG
hsa-miR-572	001614	hsa-miR-572	GUCCGCUCGGCGGUGGCCCA
hsa-miR-573	001615	hsa-miR-573	CUGAAGUGAUGUGUAACUGAUCAG
hsa-miR-575	001617	hsa-miR-575	GAGCCAGUUGGACAGGAGC
hsa-miR-578	001619	hsa-miR-578	CUUCUUGUGCUCUAGGAUUGU
hsa-miR-580	001621	hsa-miR-580	UUGAGAAUGAUGAAUCAUUAGG
hsa-miR-581	001622	hsa-miR-581	UCUUGUGUUCUCUAGAUAGU
hsa-miR-583	001623	hsa-miR-583	CAAAGAGGAAGGUCCAUUAC
hsa-miR-584-5p	001624	hsa-miR-584	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-585	001625	hsa-miR-585	UGGGCGUAUCUGUAUGCUA
hsa-miR-29c-5p	001818	hsa-miR-29c#	UGACCGAUUUCUCCUGGUGUUC
hsa-miR-766-3p	001986	hsa-miR-766	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC
hsa-miR-595	001987	hsa-miR-595	GAAGUGUGCCGUGGUGUGUCU
hsa-miR-668	001992	hsa-miR-668	UGUCACUCGGCUCGGCCACUAC
hsa-miR-767-5p	001993	hsa-miR-767-5p	UGCACCAUGGUUGUCUGAGCAUG
hsa-miR-767-3p	001995	hsa-miR-767-3p	UCUGCUCAUACCCCAUGGUUUCU
hsa-miR-454-5p	001996	hsa-miR-454#	ACCCUAUCAAUUUGUCUCUGC
hsa-miR-769-5p	001998	hsa-miR-769-5p	UGAGACCUCUGGGUUCUGAGCU
hsa-miR-770-5p	002002	hsa-miR-770-5p	UCCAGUACCACGUGUCAGGGCCA
hsa-miR-769-3p	002003	hsa-miR-769-3p	CUGGGAUUCUCCGGGGUCUUGGUU
hsa-miR-802	002004	hsa-miR-802	CAGUAACAAAGAUUCAUCCUUGU
hsa-miR-675-5p	002005	hsa-miR-675	UGGUGCGGAGAGGGCCACAGUG
hsa-miR-505-5p	002087	hsa-miR-505#	GGGAGCCAGGAAGUUAUGAUGU
hsa-miR-218-1-3p	002094	hsa-miR-218-1#	AUGGUUCCGUAAGCACCAUGG
hsa-miR-221-5p	002096	hsa-miR-221#	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU
hsa-miR-222-5p	002097	hsa-miR-222#	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU
hsa-miR-223-5p	002098	hsa-miR-223#	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU
hsa-miR-136-3p	002100	hsa-miR-136#	CAUCAUCGUCUCAAUGAGUCU
hsa-miR-34b-3p	002102	hsa-miR-34b	CAAUCACUAACUCCACUGCCAU
hsa-miR-185-3p	002104	hsa-miR-185#	AGGGGCUGGCUUUCUUGGUC
hsa-miR-186-3p	002105	hsa-miR-186#	GCCCAAAGGUGAAUUUUUGGG
hsa-miR-195-3p	002107	hsa-miR-195#	CCAUAUUGGCUGUGCUGCUCC
hsa-miR-30c-1-3p	002108	hsa-miR-30c-1#	CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC
hsa-miR-30c-2-3p	002110	hsa-miR-30c-2#	CUGGGAGAAGGUGUUUACUCU
hsa-miR-32-3p	002111	hsa-miR-32#	CAUUUUAGUGUGUGAUUUU
hsa-miR-31-3p	002113	hsa-miR-31#	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU
hsa-miR-130b-5p	002114	hsa-miR-130b#	ACUCUUUCCUGUUGCACUAC
hsa-miR-26a-2-3p	002115	hsa-miR-26a-2#	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC
hsa-miR-361-3p	002116	hsa-miR-361-3p	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU
hsa-let-7g-3p	002118	hsa-let-7g#	CUGUACAGGCCACUGCCUUGC
hsa-miR-302b-5p	002119	hsa-miR-302b#	ACUUUAACAUGGAAGUGCUUUC
hsa-miR-302d-5p	002120	hsa-miR-302d#	ACUUUAACAUGGAGGCACUUGC
hsa-miR-367-5p	002121	hsa-miR-367#	ACUGUUGCUAUAUGCAACUCU
hsa-miR-374a-3p	002125	hsa-miR-374a#	CUUAUCAGAUUGUAUUGUAAUU
hsa-miR-23b-5p	002126	hsa-miR-23b#	UGGGUUCUGGCAUGCUGAUUU
hsa-miR-376a-5p	002127	hsa-miR-324-5p	GUAGAUUCUCCUUCUUGAGUA
hsa-miR-377-5p	002128	hsa-miR-377#	AGAGGUUGCCUUGGUGAAUUC



miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-30b-3p	002129	hsa-miR-30b#	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC
hsa-miR-122-3p	002130	hsa-miR-122#	AACGCCAUUAUCACACUAAAUA
hsa-miR-130a-5p	002131	hsa-miR-130a#	UUCACAUUGUGCUACUGUCUGC
hsa-miR-132-5p	002132	hsa-miR-132#	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU
hsa-miR-148a-5p	002134	hsa-miR-148a#	AAAGUUCUGAGACACUCCGACU
hsa-miR-33a-5p	002135	hsa-miR-33a	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA
hsa-miR-33a-3p	002136	hsa-miR-33a#	CAAUGUUUCCACAGUGCAUCAC
hsa-miR-92a-1-5p	002137	hsa-miR-92a-1#	AGGUUGGGAUCCGUUGCAAUGCU
hsa-miR-92a-2-5p	002138	hsa-miR-92a-2#	GGGUGGGGAUUUGUUGCAUUAC
hsa-miR-93-3p	002139	hsa-miR-93#	ACUGCUGAGCUAGCACUCCCG
hsa-miR-96-3p	002140	hsa-miR-96#	AAUCAUGUGCAGUCCAAUUAUG
hsa-miR-99a-3p	002141	hsa-miR-99a#	CAAGCUCGCUUCU AUGGGUCUG
hsa-miR-100-3p	002142	hsa-miR-100#	CAAGCUUGUAUCUUAUAGGUUAUG
hsa-miR-101-5p	002143	hsa-miR-101#	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGCU
hsa-miR-138-2-3p	002144	hsa-miR-138-2#	GCUAUUUACGACACCAGGGUU
hsa-miR-141-5p	002145	hsa-miR-141#	CAUCUCCAGUACAGUGUUGGA
hsa-miR-143-5p	002146	hsa-miR-143#	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGU
hsa-miR-144-5p	002148	hsa-miR-144#	GGAUUAUCAUUAUACUGUAAG
hsa-miR-145-3p	002149	hsa-miR-145#	GGAUUCCUGGAAUACUGUUCU
hsa-miR-920	002150	hsa-miR-920	GGGGAGCUGUGGAAGCAGUA
hsa-miR-921	002151	hsa-miR-921	CUAGUGAGGGACAGAACCAGGAUUC
hsa-miR-922	002152	hsa-miR-922	GCAGCAGAGAAUAGGACUACGUC
hsa-miR-924	002154	hsa-miR-924	AGAGUCUUGUGAUGUCUUGC
hsa-miR-337-3p	002157	hsa-miR-337-3p	CUCCUAUAUGAUGCCUUCUUC
hsa-miR-125b-2-3p	002158	hsa-miR-125b-2#	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC
hsa-miR-135b-3p	002159	hsa-miR-135b#	AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG
hsa-miR-148b-5p	002160	hsa-miR-148b#	AAGUUCUGUUAUACACUCAGGC
hsa-miR-146a-3p	002163	hsa-miR-146a#	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG
hsa-miR-149-3p	002164	hsa-miR-149#	AGGGAGGGACGGGGCUGUGC
hsa-miR-29b-1-5p	002165	hsa-miR-29b-1#	GCUGGUUUAUUAUGGUGGUUUA
hsa-miR-29b-2-5p	002166	hsa-miR-29b-2#	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG
hsa-miR-105-3p	002168	hsa-miR-105#	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA
hsa-miR-106a-3p	002170	hsa-miR-106a#	CUGCAAUGUAAGCACUUCUUC
hsa-miR-16-2-3p	002171	hsa-miR-16-2#	CCAUAUUAUCUGUGCUGCUUUA
hsa-let-7i-3p	002172	hsa-let-7i#	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU
hsa-miR-15b-3p	002173	hsa-miR-15b#	CGAAUCAUUAUUUGCUGCUCUA
hsa-miR-27b-5p	002174	hsa-miR-27b#	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC
hsa-miR-933	002176	hsa-miR-933	UGUGCGCAGGGAGACCUCUCCC

miRBase ID_v18	LT <sup>†</sup> Assay ID	LT <sup>†</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-934	002177	hsa-miR-934	UGUCUACUACUGGAGACACUGG
hsa-miR-935	002178	hsa-miR-935	CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC
hsa-miR-936	002179	hsa-miR-936	ACAGUAGAGGGAGGAAUCGCAG
hsa-miR-937	002180	hsa-miR-937	AUCCGGCUCUGACUCUCUGCC
hsa-miR-938	002181	hsa-miR-938	UGCCCUUAAGGUGAACCCAGU
hsa-miR-939	002182	hsa-miR-939	UGGGGAGCUGAGGCUCUGGGGGUG
hsa-miR-941	002183	hsa-miR-941	CACCCGGCUGUGGCACAUGUGC
hsa-miR-335-3p	002185	hsa-miR-335#	UUUUUCAUUAUUGCUCCUGACC
hsa-miR-942	002187	hsa-miR-942	UCUUCUCUGUUUUGGCCAUGUG
hsa-miR-943	002188	hsa-miR-943	CUGACUGUUGCCGUCCUCCAG
hsa-miR-944	002189	hsa-miR-944	AAAUUAUUGUACAUCGGAUGAG
hsa-miR-99b-3p	002196	hsa-miR-99b#	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCG
hsa-miR-124-5p	002197	hsa-miR-124#	CGUGUUCACAGCGGACCUUGAU
hsa-miR-541-5p	002200	hsa-miR-541#	AAAGGAUUCUGCUGUCGGUCCACU
hsa-miR-875-5p	002202	hsa-miR-875-5p	UAUACCUACAGUUUAUCAGGUG
hsa-miR-888-3p	002213	hsa-miR-888#	GACUGACACCUCUUUGGGUGAA
hsa-miR-892b	002214	hsa-miR-892b	CACUGGCUCUUUCUGGGUAGA
hsa-miR-9-3p	002231	hsa-miR-9#	AUAAAGCUAGAUACCGAAAGU
hsa-miR-411-3p	002243	hsa-miR-411#	UAUGUACACGGUCCACUAACC
hsa-miR-378a-3p	002233	hsa-miR-378	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG
hsa-miR-151a-3p	002254	hsa-miR-151a-3p	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG
hsa-miR-340-3p	002259	hsa-miR-340#	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC
hsa-miR-190b	002263	hsa-miR-190b	UGAUUAUGUUUGAUUUGGGUU
hsa-miR-545-5p	002266	hsa-miR-545#	UCAGUAAAUGUUUAUUGAUGA
hsa-miR-183-3p	002270	hsa-miR-183#	GUGAAUUACCGAAGGGCCAUA
hsa-miR-192-3p	002272	hsa-miR-192#	CUGCCAAUCCAUGGUCACAG
hsa-miR-200b-5p	002274	hsa-miR-200b#	CAUCUACUGGGCAGCAUUGGA
hsa-miR-200c-5p	002286	hsa-miR-200c#	CGUCUUACCCAGCAGUGUUUGG
hsa-miR-155-3p	002287	hsa-miR-155#	CUCCUACAUUUAGCAUUAACA
hsa-miR-10a-3p	002288	hsa-miR-10a#	CAAAUUCGUAUCUAGGGAAUA
hsa-miR-214-5p	002293	hsa-miR-214#	UGCCUGUCUACACUUGCUGUC
hsa-miR-218-2-3p	002294	hsa-miR-218-2#	CAUGGUUCUGUCAAGCACCGCG
hsa-miR-129-1-3p	002298	hsa-miR-129#	AAGCCUUACCCAAAAAGUAU
hsa-miR-22-5p	002301	hsa-miR-22#	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUA
hsa-miR-425-3p	002302	hsa-miR-425#	AUCGGGAAUGUCUGUCCGCC
hsa-miR-30d-3p	002305	hsa-miR-30d#	CUUUCAGUCAGAUUUUGCUGC
hsa-let-7a-3p	002307	hsa-let-7a#	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC
hsa-miR-424-3p	002309	hsa-miR-424#	CAAAACGUGAGGCGCUGCUAU

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-18b-3p	002310	hsa-miR-18b#	UGCCCUAAAUGCCCUUCUGGC
hsa-miR-20b-3p	002311	hsa-miR-20b#	ACUGUAGUAUGGGCACUCCAG
hsa-miR-431-3p	002312	hsa-miR-431#	CAGGUCGUCUUGCAGGGCUUCU
hsa-miR-7-2-3p	002314	hsa-miR-7-2#	CAACAAAUCCAGUCUACCUA
hsa-miR-10b-3p	002315	hsa-miR-10b#	ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAU
hsa-miR-34a-3p	002316	hsa-miR-34a#	CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU
hsa-miR-181a-2-3p	002317	hsa-miR-181a-2#	ACCACUGACCGUUGACUGUACC
hsa-miR-744-3p	002325	hsa-miR-744#	CUGUUGCCACUAACCUCAACCU
hsa-miR-452-3p	002330	hsa-miR-452#	CUCAUCUGCAAAGAAGUAAGUG
hsa-miR-409-3p	002332	hsa-miR-409-3p	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCU
hsa-miR-181c-3p	002333	hsa-miR-181c#	AACCAUCGACCGUUGAGUGGAC
hsa-miR-196a-3p	002336	hsa-miR-196a#	CGGCAACAAGAAACUGCCUGAG
hsa-miR-483-3p	002339	hsa-miR-483-3p	UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU
hsa-miR-708-3p	002342	hsa-miR-708#	CAACUAGACUGUGAGCUUCUAG
hsa-miR-92b-5p	002343	hsa-miR-92b#	AGGGACGGGACGGGUGCAGUG
hsa-miR-551b-5p	002346	hsa-miR-551b#	GAAAUCAAGCGUGGGUGAGACC
hsa-miR-202-5p	002362	hsa-miR-202#	UUCCUAUGCAUAUACUUCUUUG
hsa-miR-193b-5p	002366	hsa-miR-193b#	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA
hsa-miR-497-3p	002368	hsa-miR-497#	CAAACCACACUGUGGUGUUAGA
hsa-miR-518e-5p; hsa-miR-519a-5p; hsa-miR-519b-5p; hsa-miR-519c-5p; hsa-miR-522-5p; hsa-miR-523-5p	002371	hsa-miR-518e#	CUCUAGAGGGAAGCGCUUUCUG
hsa-miR-543	002376	hsa-miR-543	AAACAUUCGCGGUGCACUUCUU
hsa-miR-125b-1-3p	002378	hsa-miR-125b-1#	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU
hsa-miR-194-3p	002379	hsa-miR-194#	CCAGUGGGGUCGUGUUAUCUG
hsa-miR-106b-3p	002380	hsa-miR-106b#	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC
hsa-miR-302a-5p	002381	hsa-miR-302a#	ACUUAACGUGGAUGUACUUGCU
hsa-miR-519b-3p	002384	hsa-miR-519b-3p	AAAGUGCAUCCUUUAGAGGUU
hsa-miR-518f-5p	002387	hsa-miR-518f#	CUCUAGAGGGAAGCACUUCUC
hsa-miR-374b-3p	002391	hsa-miR-374b#	CUUAGCAGGUUGUAUUAUCAU
hsa-miR-520c-3p	002400	hsa-miR-520c-3p	AAAGUGCUUCCUUUAGAGGGU
hsa-let-7b-3p	002404	hsa-let-7b#	CUAUACAACCUACUGCCUUCCC
hsa-let-7c* (v16)	002405	hsa-let-7c#	UAGAGUUACACCCUGGGAGUUA
hsa-let-7e-3p	002407	hsa-let-7e#	CUAUACGGCCUCCUAGCUUCC
hsa-miR-550a-5p	002410	hsa-miR-550	AGUGCCUGAGGGAGUAAGAGCCC
hsa-miR-593-3p	002411	hsa-miR-593	UGUCUCUGCUGGGGUUCU
hsa-let-7f-1-3p	002417	hsa-let-7f-1#	CUAUACAAUCUAUUGCCUUCCC
hsa-let-7f-2-3p	002418	hsa-let-7f-2#	CUAUACAGUCUACUGUCUUCC

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-15a-3p	002419	hsa-miR-15a#	CAGGCCAUUUUGUGCUGCCUCA
hsa-miR-16-1-3p	002420	hsa-miR-16-1#	CCAGUAAUUAACUGUGCUGCUGA
hsa-miR-17-3p	002421	hsa-miR-17#	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG
hsa-miR-18a-3p	002423	hsa-miR-18a#	ACUGCCCUAAGUGCUCCUUCUGG
hsa-miR-19a-5p	002424	hsa-miR-19a#	AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA
hsa-miR-19b-1-5p	002425	hsa-miR-19b-1#	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC
hsa-miR-625-3p	002432	hsa-miR-625#	GACUUAAGAACUUUCCCCUCA
hsa-miR-628-3p	002434	hsa-miR-628-3p	UCUAGUAAGAGUGGCAGUCGA
hsa-miR-20a-3p	002437	hsa-miR-20a#	ACUGCAUUUAGAGCACUUAAG
hsa-miR-21-3p	002438	hsa-miR-21#	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
hsa-miR-23a-5p	002439	hsa-miR-23a#	GGGGUUCUGGGGAUGGGUUUU
hsa-miR-24-1-5p	002440	hsa-miR-24-1#	UGCCUACUGAGCUGAUUUCAGU
hsa-miR-24-2-5p	002441	hsa-miR-24-2#	UGCCUACUGAGCUGAAACACAG
hsa-miR-25-5p	002442	hsa-miR-25#	AGGCGGAGACUUGGGCAAUUG
hsa-miR-26a-1-3p	002443	hsa-miR-26a-1#	CCUAAUUCUUGGUUACUUGCACG
hsa-miR-26b-3p	002444	hsa-miR-26b#	CCUGUUCUCAAUACUUGGCUC
hsa-miR-27a-5p	002445	hsa-miR-27a#	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA
hsa-miR-29a-5p	002447	hsa-miR-29a#	ACUGAUUUUUUUGGUUUCAG
hsa-miR-151a-5p	002642	hsa-miR-151-5P	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU
hsa-miR-765	002643	hsa-miR-765	UGGAGGAGAAGGAAGGUGAUG
hsa-miR-338-5p	002658	hsa-miR-338-5P	AACAUAUCCUGGUGCUGAGUG
hsa-miR-620	002672	hsa-miR-620	AUGGAGAUAGAUUAGAAAU
hsa-miR-577	002675	hsa-miR-577	UAGAUAAAAUUAUUGGUACCUG
hsa-miR-144-3p	002676	hsa-miR-144	UACAGUAUAGAUGAUGUACU
hsa-miR-590-3p	002677	hsa-miR-590-3P	UAAUUUUUAGUUAAGCUAGU
hsa-miR-191-3p	002678	hsa-miR-191#	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCC
hsa-miR-665	002681	hsa-miR-665	ACCAGGAGCUGAGGCCCCU
hsa-miR-520d-3p	002743	hsa-miR-520D-3P	AAAGUGCUUCUCUUUGGUGGGU
hsa-miR-1224-3p	002752	hsa-miR-1224-3P	CCCCACCUCCUCUCUCCUCAG
hsa-miR-1305	002867	hsa-miR-1305	UUUUCAACUCUAAUUGGAGAGA
hsa-miR-513c-5p	002756	hsa-miR-513C	UUCUCAAGGAGGUGUCGUUUAU
hsa-miR-513b	002757	hsa-miR-513B	UUCACAAGGAGGUGUCAUUUUAU
hsa-miR-1226-5p	002758	hsa-miR-1226#	GUGAGGGCAUGCAGGCCUGGAUGGGG
hsa-miR-1236	002761	hsa-miR-1236	CCUCUCCCCUUGUCUCUCCAG
hsa-miR-1228-5p	002763	hsa-miR-1228#	GUGGGCGGGGCAGGUGUGUG
hsa-miR-1225-3p	002766	hsa-miR-1225-3P	UGAGCCCCUGUGCCGCCCCAG
hsa-miR-1233	002768	hsa-miR-1233	UGAGCCCUGUCCUCCCGCAG
hsa-miR-1227	002769	hsa-miR-1227	CGUGCCACCCUUUCCCCAG

miRBase ID_v18	LT <sup>+</sup> Assay ID	LT <sup>+</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-1286	002773	hsa-miR-1286	UGCAGGACCAAGAUGAGCCCU
hsa-miR-548m	002775	hsa-miR-548M	CAAAGGUUUUGUGGUUUUUUG
hsa-miR-1179	002776	hsa-miR-1179	AAGCAUUCUUUCAUUGGUUGG
hsa-miR-1178	002777	hsa-miR-1178	UUGCUCACUGUUCUCCCUAG
hsa-miR-1205	002778	hsa-miR-1205	UCUGCAGGGUUUGCUUUGAG
hsa-miR-1271-5p	002779	hsa-miR-1271	CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA
hsa-miR-1201 (v15)	002781	hsa-miR-1201	AGCCUGAUUAAACACAUGCUCUGA
hsa-miR-548j	002783	hsa-miR-548J	AAAAGUAAUUGCGGUCUUUGGU
hsa-miR-1263	002784	hsa-miR-1263	AUGGUACCCUGGCAUACUGAGU
hsa-miR-1294	002785	hsa-miR-1294	UGUGAGGUUGGCAUUGUUGUCU
hsa-miR-1269a	002789	hsa-miR-1269	CUGGACUGAGCCGUGCUACUGG
hsa-miR-1265	002790	hsa-miR-1265	CAGGAUGUGGUC AAGUGUUGUU
hsa-miR-1244	002791	hsa-miR-1244	AAGUAGUUGGUUUUGUAGAGAUGGUU
hsa-miR-1303	002792	hsa-miR-1303	UUUAGAGACGGGUCUUGUCUCU
hsa-miR-1259 (v15)	002796	hsa-miR-1259	AUAUAUGAUGACUUGACUUUU
hsa-miR-548p	002798	hsa-miR-548P	UAGCAAAAACUGCAGUUACUUU
hsa-miR-1244	002799	hsa-miR-1244	CAAGUCUUAUUUGAGCACCUGUU
hsa-miR-1255b-5p	002801	hsa-miR-1255B	CGGAUGAGCAAAGAAAGUGGUU
hsa-miR-1282	002803	hsa-miR-1282	UCGUUUUGCCUUUUUCUGCUU
hsa-miR-1255a	002805	hsa-miR-1255A	AGGAUGAGCAAAGAAAGUAGAUU
hsa-miR-1270	002807	hsa-miR-1270	CUGGAGAU AUGGAAGAGCUGUGU
hsa-miR-1197	002810	hsa-miR-1197	UAGGACACAUGGUCUACUUCU
hsa-miR-1324	002815	hsa-miR-1324	CCAGACAGAAUUCUAUGCACUUUC
hsa-miR-548h-5p	002816	hsa-miR-548H	AAAAGUAAUCGCGGUUUUUGUC
hsa-miR-1254	002818	hsa-miR-1254	AGCCUGGAAGCUGGAGCCUGCAGU
hsa-miR-548k	002819	hsa-miR-548K	AAAAGUACUUGCGGAUUUUGCU
hsa-miR-1251	002820	hsa-miR-1251	ACUCUAGCUGCCAAGGCGCU
hsa-miR-1285-3p	002822	hsa-miR-1285	UCUGGGCAACAAGUGAGACCU
hsa-miR-1245a	002823	hsa-miR-1245	AAGUGAUCUAAAGGCCUACAU
hsa-miR-1292	002824	hsa-miR-1292	UGGGAACGGGUUCCGGCAGACGCUG
hsa-miR-1301	002827	hsa-miR-1301	UUGCAGCUGCCUGGGAGUGACUUC
hsa-miR-1200	002829	hsa-miR-1200	CUCCUGAGCCAUUCUGAGCCUC
hsa-miR-1182	002830	hsa-miR-1182	GAGGGUCUUGGGAGGGUUGUGAC
hsa-miR-1288	002832	hsa-miR-1288	UGGACUGCCCUGAUUCUGGAGA
hsa-miR-1291	002838	hsa-miR-1291	UGGCCUGACUGAAGACCAGCAGU
hsa-miR-1275	002840	hsa-miR-1275	GUGGGGGAGAGGCGUC
hsa-miR-1183	002841	hsa-miR-1183	CACUGUAGGUGAUGGUGAGAGUGGGCA
hsa-miR-1184	002842	hsa-miR-1184	CCUGCAGCGACUUGAUGGCUUCC

miRBase ID_v18	LT <sup>†</sup> Assay ID	LT <sup>†</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-1276	002843	hsa-miR-1276	UAAAGAGCCUGUGGAGACA
hsa-miR-320b	002844	hsa-miR-320B	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA
hsa-miR-1272	002845	hsa-miR-1272	GAUGAUGAUGGCAGCAAUUCUGAAA
hshsa-miR-1180	002847	hshsa-miR-1180	UUUCCGGCUCGCGUGGGUGUGU
hsa-miR-1256	002850	hsa-miR-1256	AGGCAUUGACUUCUCACUAGCU
hsa-miR-1278	002851	hsa-miR-1278	UAGUACUGUGCAUUAUCAUCUUAU
hsa-miR-1262	002852	hsa-miR-1262	AUGGGUGAAUUUGUAGAAGGAU
hsa-miR-1243	002854	hsa-miR-1243	AACUGGAUCAUUUAUAGGAGUG
hsa-miR-663b	002857	hsa-miR-663B	GGUGGCCCGCCGUGCCUGAGG
hsa-miR-1252	002860	hsa-miR-1252	AGAAGGAAAUUGAAUUAUUUA
hsa-miR-1298	002861	hsa-miR-1298	UUCAUUCGGCUGUCCAGAUGUA
hsa-miR-1290	002863	hsa-miR-1290	UGGAUUUUUGGAUCAGGGA
hsa-miR-1249	002868	hsa-miR-1249	ACGCCUUCUUUUUUUUUUA
hsa-miR-1248	002870	hsa-miR-1248	ACCUUCUUGUAUAAGCACUGUGCUIAAA
hsa-miR-1289	002871	hsa-miR-1289	UGGAGUCCAGGAUUCUGCAUUUU
hsa-miR-1204	002872	hsa-miR-1204	UCGUGGCCUGGUCUCCAUUAU
hsa-miR-1826 (v15)	002873	hsa-miR-1826	AUUGAUCUAGCACUUCGAAACGCAAU
hsa-miR-1304-5p	002874	hsa-miR-1304	UUUGAGGCUACAGUGAGAUGUG
hsa-miR-1203	002877	hsa-miR-1203	CCCGGAGCCAGGAUGCAGCUC
hsa-miR-1206	002878	hsa-miR-1206	UGUUAUGUAGAUGUUUAAGC
hsa-miR-548g-3p	002879	hsa-miR-548G	AAAACUGAAUUACUUUUUGUAC
hsa-miR-1208	002880	hsa-miR-1208	UCACUGUUCAGACAGGCGGA
hsa-miR-548e	002881	hsa-miR-548E	AAAAACUGAGACUACUUUUUGCA
hsa-miR-1274a (v16)	002883	hsa-miR-1274A	GUCCUGUUCAGGCGCCA
hsa-miR-1274b (v16)	002884	hsa-miR-1274B	UCCUGUUCGGGCGCCA
hsa-miR-1267	002885	hsa-miR-1267	CCUGUUGAAGUGUAAUCCCA
hsa-miR-1250	002887	hsa-miR-1250	ACGGUGCUGGAUGUGCCUUU
hsa-miR-548n	002888	hsa-miR-548N	CAAAAGUAAUUGUGGAUUUUUGU
hsa-miR-1283	002890	hsa-miR-1283	UCUACAAAGGAAAGCGCUUUCU
hsa-miR-1247-5p	002893	hsa-miR-1247	ACCCGUCUCCGUCGUCUCCCGGA
hsa-miR-1253	002894	hsa-miR-1253	AGAGAAGAAGAUAGCCUGCA
hsa-miR-720	002895	hsa-miR-720	UCUCGUGGGGCCUCCA
hsa-miR-1260a	002896	hsa-miR-1260	AUCCACCUCUGCCACCA
hsa-miR-664-3p	002897	hsa-miR-664	UAUUAUUUAUCCCAAGCCUACA
hsa-miR-1302	002901	hsa-miR-1302	UUGGGACAUACUUAUGCUAAA
hsa-miR-1300 (v13)	002902	hsa-miR-1300	UUGAGAAGGAGGCGUCUG
hsa-miR-1284	002903	hsa-miR-1284	UCUAUACAGACCCUGGCUUUUC
hsa-miR-548l	002904	hsa-miR-548L	AAAAGUAAUUUGCGGGUUUUUGUC
miRBase ID_v18	LT <sup>†</sup> Assay ID	LT <sup>†</sup> Assay Name	Target Sequence
hsa-miR-1293	002905	hsa-miR-1293	UGGGUGGUCUGGAGAUUUUGUC
hsa-miR-1825	002907	hsa-miR-1825	UCCAGUGCCUCCUCCUCC
hsa-miR-1296	002908	hsa-miR-1296	UUAGGGCCUGGCUCCAUCUCC
hsa-miR-206	000510	hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG

† Life Technologies

Anexo 3. Listado de publicaciones

*Do Epigenetic Marks Govern Bone Mass and Homeostasis?*

Jesús Delgado-Calle, Pablo Garmilla and José A. Riancho

Current Genomics, 2012, 13 (3), 252-263

[DOI: 10.2174/138920212800543129](https://doi.org/10.2174/138920212800543129)