



Departamento de Fisiología
Programa de Doctorado en Fisiología

**REGULACIÓN EPIGENETICA DE LA ESCLEROSTINA Y LA
RUTA WNT/B-CATENINA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
BIOMARCADORES DE FRAGILIDAD ÓSEA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

CAROLINA DE LA CALVA CEINOS

Dirigida por:

Dra. Teresa Bas Hermida

Dr. José Luis García Giménez

Dr. Francisco Baixauli García

Tutor:

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Valencia, enero de 2024



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA [ò 人]
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Fisiología

Programa de Doctorado en Fisiología

REGULACIÓN EPIGENETICA DE LA ESCLEROSTINA Y LA RUTA WNT/B-CATENINA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE FRAGILIDAD ÓSEA

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

CAROLINA DE LA CALVA CEINOS

Dirigida por:

Dra. Teresa Bas Hermida

Dr. José Luis García Giménez

Dr. Francisco Baixauli García

Tutor:

Dr. Federico V. Pallardó Calatayud

Valencia, enero de 2024

Dña. Teresa Bas Hermida, Jefa de la Unidad de Raquis del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, **D. José Luis García Giménez**, Profesor Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València y **D. Francisco Baixauli García**, Jefe del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital La Fe de Valencia,

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada *“REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA ESCLEROSTINA Y LA RUTA DE LA WNT/BETA-CATENINA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE CALIDAD ÓSEA”*, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por Dña. Carolina de la Calva Ceinos, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 4/01/2024.

TERESA|
BAS|
HERMIDA|
Firmado digitalmente por
TERESA|BAS|
HERMIDA
Fecha: 2024.01.08
07:53:44 +01'00'
Fdo.: Teresa Bas Hermida
Directora


Firmado digitalmente por
GARCIA GIMENEZ
JOSE LUIS -
20441299A

Fdo.: José Luis García Giménez
Director

FRANCISCO
FERNANDO|
BAIXAULI|
GARCIA|
Firmado digitalmente
por FRANCISCO
FERNANDO|BAIXAULI|
GARCIA
Fecha: 2024.01.08
07:49:45 +01'00'

Fdo.: Francisco Baixauli García
Director

Durante la realización de esta tesis doctoral, Dña. Carolina de la Calva Ceinos y el proyecto de Tesis que se presenta en este manuscrito ha disfrutado de las siguientes becas y ayudas:

- Beca de Acciones preparativas VLC-Bioclinics IIS La Fe 2016 para realizar el estudio de screening de biomarcadores de calidad de la Osteoporosis basados en miRNAs, titulado “Regulación epigenética de la esclerostina y la ruta wnt/B-catenina para la identificación de biomarcadores de fragilidad ósea”.
- Beca del grupo de estudio de enfermedades del raquis (GEER 2016) para realizar el estudio de screening de biomarcadores de calidad de la Osteoporosis basados en miRNAs, con el título “Regulación epigenética de la esclerostina y la ruta Wnt/B-catenina para la identificación de biomarcadores de fragilidad ósea”.

El trabajo se ha llevado a cabo en el grupo U733 del CIBERER, en el Dept. de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València. La parte clínica de la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en la Unidad de Raquis del Hospital Universitario y Politécnico La Fe

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores, el Dr. José Luis García Giménez, la Dra. Teresa Bas Hermida y el Dr. Francisco Baixauli García, ya que sin su iniciativa, motivación y supervisión no habría sido posible la realización de este proyecto. Gracias por apostar por la unión del laboratorio y la clínica, y ser capaces de ver en esta asociación el camino fundamental para solucionar muchos de los problemas de nuestros pacientes.

A mi familia, mis padres Goyi y Santiago, por transmitirme la necesidad de sentir pasión por tu profesión y la importancia de ayudar a las personas. A mi compañero de vida Marc y a mis hijos Matilda y Elliot, por ser el núcleo de mi vida y mi apoyo fundamental.

A mis compañeros de la Unidad de Sarcomas y Tumores Musculoesqueléticos del Hospital La Fe, por creer en mí, darme la oportunidad de dedicarme a esta patología y celebrar cada uno de mis logros.

Finalmente me gustaría dar las gracias a la Unidad de Raquis del Hospital La Fe, liderada por la Dra. Teresa Bas Hermida, directora de la tesis, que sin dedicarme a la patología de columna me dieron la oportunidad de desarrollar este trabajo.

Abreviaturas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AMPK: adenosín monofosfato/proteína kinasa A
- APC: poliposis adenomatosa coli [*Adenomatous Polyposis Coli*]
- ARN: ácido ribonucleico
- beta-CTX: beta del telopéptido carboxi-terminal del colágeno I
- BMD: Densidad minera ósea [*Bone Mineral Density*]
- BMP: proteína morfogenética ósea [*Bone Morphogenetic Protein*]
- cADN: ADN complementario
- Complejo RISC: complejo de silenciamiento inducido por ARN [*RNA-induced silencing complex*]
- CpG: citosina-fosfato-guanina
- Cpm: conteo por millón
- CV: coeficiente de variación
- DALYs: años de vida ajustados por discapacidad [*Disability Adjusted Life Years*]
- dCMP: desoxicitidina monofosfato
- dNTP: desoxinucleótido trifosfato
- DEXA: absorciometría de rayos X de energía dual [*Dual-energy X-ray absorptiometry*]
- DMO: densidad mineral ósea
- DM: diabetes mellitus
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DMR: regiones de metilación diferencial [*differentially methylated region*]
- Dnmts: DNA metil-transferasas
- DS: desviación estándar
- Dvl: fosfoproteínas *Dishvelled*
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético [*acidul etilendiaminotetraacetic*]
- ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima [*enzyme-linked immunosorbent assay*]
- ENCODE: Enciclopedia de Elementos de ADN [*Encyclopedia Of DNA Elements*]

- **EPOC**: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- **FA**: fosfatasa alcalina
- **Factor de transcripción TCF/LEF**: factor de transcripción de las células T/factor potenciador linfoide [*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*]
- **FDR**: tasa de detección falsa [*false detection ratio*]
- **FFPE**: fijado con formalina, embebido con parafina [*formalin-fixed, paraffin-embedded*]
- **FGF**: factor de crecimiento de fibroblastos [*fibroblast growth factor*]
- **FRAX**: herramienta de evaluación de riesgo de fractura [*Fracture Risk assessment tool*]
- **FSH**: hormona foliculoestimulante [*follicle stimulation hormone*]
- **GEER**: Grupo de Estudio de las Enfermedades del Raquis
- **GSK3B**: glicógeno sintasa quinasa 3B
- **HAT**: histona acetiltransferasa
- **HDAC**: histona deacetilasa
- **HRQOL**: calidad de vida relacionada con la salud [*Health-related quality of life*]
- **HRP**: peroxidasa de rábano [*horseradish peroxidase*]
- **HS**: heparán sulfato
- **IFCC**: Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio [*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*]
- **IGF**: factor de crecimiento similar a la insulina [*insulin-like growth factor*]
- **IIS La Fe**: Instituto de Investigación Sanitaria La Fe
- **IMC**: índice de masa corporal
- **IOF**: Fundación Internacional de la Osteoporosis [*International Osteoporosis Foundation*]
- **ISCD**: Sociedad Internacional de Densitometría clínica [*International Society of Clinical Densitometry*]
- **KDM**: histona lisina desmetilasa
- **KEGG**: Enciclopedia Kioto de Genes y Genomas [*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*]
- **KMT**: histona metiltransferasa

- **LDL**: lipoproteína de baja densidad [*low density lipoprotein*]
- **lncARNs**: ARN de cadena larga no codificante [*Long non-coding ARN*]
- **LRP6**: proteína 6 relacionada con el receptor de la lipoproteína de baja densidad [*Low density lipoprotein receptor related protein 6*]
- **MALDI-TOF**: desorción/ionización láser asistida por matriz [*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*]
- **miARN**: microARN
- **NFATc1**: factor nuclear de activación de células T1 [*Nuclear Factor Of Activated T Cells 1*]
- **NGS**: secuenciación de próxima generación [*Next Generation Sequency*]
- **NHANES**: Encuesta de Salud Nacional y Examen de Nutrición [*National Health and Nutrition Examination Survey*]
- **NIH**: Insitituto Nacional de Salud [*National Institute of Health*]
- **NOF**: Fundación Nacional de la Osteoporosis [*National Osteoporosis Foundation*]
- **OMIM**: herencia mendeliana online en el hombre [*Online Mendelian Inheritance in Man*]
- **OMS**: Organización Mundial de la Salud
- **OPG**: osteoprotegerina
- **OPPG**: osteoporosis-pseudoglioma
- **ORA**: análisis sobrerrepresentación genética [*over representation analysis*]
- **Osx**: Osterix
- **P1NP**: propéptido aminoterminal del colágeno tipo 1
- **PBMC**: células mononucleares de sangre periférica [*peripheral blood mononuclear cells*]
- **PBS**: búfer de fosfato salino [*phosphate buffered saline*]
- **PCR**: reacción en cadena de la polimerasa [*polymerase chain reaction*]
- **PI3K**: fosfoinositol 3-kinasa [*phosphoinositide 3-kinasa*]
- **PTH**: hormona paratiroidea [*parathyroid hormone*]
- **PTM**: mofificació post-transduccionales [*Post-translational modification*]
- **QUALEFFO**: Cuestionario de Calidad de Vida de la Fundación Europea de la Osteoporosis [*Questionnaire for Quality of Life by the European Foundation for Osteoporosis*]
- **RANK**: receptor activador del factor nuclear k Beta
- **RANKL**: RANK-ligando
- **RT-qPCR**: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa [*Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*]

- **Runx**: factor de transcripción relacionado con Runt [*Runx –related transcription factor*]
- **SAP**: fofatasa alcalina de camarón [*shrimp alkaline phosphatase*]
- **SAM**: S-adenosil metionina
- **SERM**: moduladores selectivos de los receptores de estrógenos [*selective estrogen receptors modulators*]
- **SIRT1**: sirtuina 1
- **Small RNA-seq**: secuenciación de ARN pequeño [*Small RNA sequencing*]
- **SMC**: célula de músculo liso [*smooth muscle cell*]
- **SNP**: polimorfismos de un solo nucleótido [*single nucleotid polymorphism*]
- **Std**: estándar [*standard*]
- **T**: timina
- **TET**: translocación diez-once [*ten-eleven translocation*]
- **TGF-beta**: factor de crecimiento transformante beta [*transforming growth factor beta*]
- **TLE**: potenciador tipo transductina [*Transducin-like enhancer*]
- **TNF-alfa**: factor de necrosis tumoral alfa [*tumoral necrosis factor alfa*]
- **TWEAK**: débil inductor de apoptosis relacionado con TNF [*TNF- related weak inducer of apoptosis*]
- **TZD**: tiazolidinediona
- **U**: uracilo
- **UCIM**: Unidad Central de Investigación de Medicina
- **UCSC**: Universidad de California Santa Cruz
- **VitD**: vitamina D
- **VBCH**: enfermedad de van Buchem [*van Buchem disease*]
- **Yrs**: años [*Years*]
- **5mC**: 5-metilcitosina

Índice

Tabla de contenido

<i>Agradecimientos</i>	9
<i>Abreviaturas</i>	11
<i>Índice</i>	15
<i>Tabla de contenido</i>	15
<i>RESUMEN / ABSTRACT</i>	29
1.INTRODUCCIÓN	35
1.1. Fragilidad ósea y osteoporosis	35
1.1.1. Descripción general	35
1.1.2. Epidemiología.....	36
1.1.3. Impacto económico	38
1.1.4. Fracturas osteoporóticas.....	39
1.1.5. Comorbilidades asociadas.....	40
1.1.6. Fisiopatología	41
1.2. Métodos diagnósticos	42
1.2.1. Densitometría ósea	42
1.2.2. Cuestionarios para calcular el riesgo de fractura	46
1.2.3. Marcadores bioquímicos	48
1.3. Osteoporosis y escoliosis degenerativa	49
1.4. Epigenética	51
1.4.1. Definición.....	51
1.4.2. Mecanismos epigenéticos.....	52
1.4.3. Aplicaciones de los biomarcadores epigenéticos	56
1.5. Metabolismo óseo	57
1.5.1. Esclerostina	62
1.5.2. Regulación epigenética de los genes relacionados con el metabolismo óseo	64
2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
3.MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1. Tipo de estudio y metodología	77

3.2. Selección de pacientes	77
3.3. Recogida de datos clínicos	79
3.3.1. Determinación de densitometría ósea	80
3.3.2. Análisis de los resultados y correlaciones estadísticas.....	83
3.4. Fase de laboratorio	84
3.4.1. Medidas de esclerostina.....	84
3.4.2. Estudio de la metilación del gen SOST mediante tecnología Sequenom (EpiTYPER®)	86
3.4.3. Estudio de expresión diferencial de miARNs por secuenciación masiva smallRNA-seq	92
3.4.4. Obtención de los miARNs de plasma de pacientes.	92
3.4.5. Análisis de validación de los miARNs por RT-qPCR.....	95
4.RESULTADOS.....	103
4.1. Análisis de las medidas de esclerostina y la metilación del gen SOST.....	103
4.1.1. Descripción de la muestra.	103
4.1.2. Descripción clínica.	103
4.1.3. Descripción de los datos analíticos sobre parámetros del metabolismo óseo.....	104
4.1.4. Descripción de los datos sobre la densitometría ósea.	107
4.1.5. Medidas de esclerostina por inmunoensayo	111
4.1.6. Correlación entre esclerostina y vitamina D.	112
4.1.7. Estudio de la metilación del gen SOST mediante tecnología Sequenom (EpiTYPER®)	113
4.2. Expresión diferencial de los miARNs circulantes por secuenciación masiva entre los grupos de osteoporosis, escoliosis degenerativa y controles	118
4.2.1. Descripción de la muestra.	118
4.2.2. Descripción clínica.	118
4.2.3. Descripción de los datos analíticos sobre parámetros del metabolismo óseo.....	120
4.2.4. Descripción de los datos sobre la densitometría ósea.	123
4.3. Análisis de expresión diferencial de miARNs circulantes en plasma	127
4.3.1. Estudio funcional de los miARNs identificados en nuestro estudio miRNA-seq.....	132
4.3.2. Descripción individual del miR-99 y miR-122 identificados en el estudio de miRNA-seq.....	138
4.4. Validación de los microARNs con expresión diferencial entre los distintos grupos de estudio	139
4.4.1. Descripción de la muestra	139
4.4.2. Descripción clínica	139

4.4.3.	Descripción de los datos analíticos sobre parámetros del metabolismo óseo.	141
4.4.4.	Descripción de los datos sobre la densitometría ósea.	143
4.4.5.	Resultados de validación de miARNs por RT-qPCR.....	147
5.DISCUSIÓN.....		163
5.1.	Datos analíticos y valores de densitometría ósea.	163
5.2.	Niveles y regulación de la esclerostina en los pacientes con osteoporosis y con escoliosis degenerativa.	166
5.2.2.	Metilación gen SOST	173
5.3.	microARNs en fracturas osteoporóticas y escoliosis degenerativa.	175
5.4.	Limitaciones del estudio	183
BIBLIOGRAFÍA		189
ANEXOS.....		213

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

- **Tabla 1.** Principales miARN relacionados con la formación y actividad de los osteoclastos.
- **Tabla 2.** Principales miARN relacionados con la actividad y función de los osteoblastos.
- **Tabla 3.** Cebadores, tamaño de las regiones amplificadas y sitios CpG para la amplificación de las regiones SOST-17 y SOST-18.
- **Tabla 4.** Diferentes componentes utilizados y sus cantidades en la retrotranscripción de los miARN a ADNc.
- **Tabla 5.** miARNs seleccionados para la validación de miARNs circulantes en grupo de pacientes con fractura de baja energía, y en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa.
- **Tabla 6.** Compuestos y cantidades utilizadas en la medición de la expresión génica por PCR en tiempo real.
- **Tabla 7.** Datos clínicos sobre la edad, antropométricos, de localización de la fractura y el diagnóstico de DM2 en los pacientes estudiados.
- **Tabla 8.** Datos analíticos sobre los parámetros del metabolismo óseo analizados en sangre periférica.
- **Tabla 9.** Resultados de las pruebas de densitometría ósea.
- **Tabla 10.** Análisis estadístico de los datos clínicos recogidos.

- **Tabla 11.** Test ANOVA, Kruskal-Wallis, Kruskal-Wallis con ajuste posthoc de Neyemeni y Kruskal-Wallis con ajuste posthoc de Dunn con ajustados mediante Bonferroni para valorar el grado de metilación de los grupo CpG.
- **Tabla 12.** Datos clínicos sobre la edad, antropométricos, de localización de la fractura y el diagnóstico de DM2 en los pacientes estudiados.
- **Tabla 13.** Datos analíticos sobre los parámetros del metabolismo óseo analizados en sangre periférica.
- **Tabla 14.** Resultados de las pruebas de densitometría ósea.
- **Tabla 15.** Análisis estadístico de los datos clínicos recogidos.
- **Tabla 16.** Rutas de señalización en las que participan los miARNs desregulados en el grupo de pacientes con osteoporosis y el número de genes que regulan.
- **Tabla 17.** Rutas de señalización en las que participan los miARNs desregulados en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa y el número de genes que regulan.
- **Tabla 18.** Rutas de señalización en las que participan los miARNs comparando el grupo de pacientes con osteoporosis con el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa, así como el número de genes que regulan.
- **Tabla 19.** Panel de miARNs, genes y rutas implicadas en la homeostasia ósea desregulados en el grupo de pacientes con osteoporosis y en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa (mirTarbase <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>).

- **Tabla 20.** Datos clínicos sobre la edad, antropométricos, de localización de la fractura y el diagnóstico de DM2 en los pacientes estudiados.
- **Tabla 21.** Datos analíticos sobre los parámetros del metabolismo óseo analizados en sangre periférica.
- **Tabla 22.** Resultados de las pruebas de densitometría ósea.
- **Tabla 23.** Análisis estadístico de los datos clínicos recogidos.
- **Tabla 24.** Valores de sensibilidad y especificidad según los diferentes *cut-off values* para evaluar la capacidad discriminativa de los valores de miR-99 en plasma entre el grupo de pacientes con fractura patológica y el grupo control.
- **Tabla 25.** Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la cohorte de pacientes de validación con IMC aumentado según el miR-99 y la densitometría ósea en localización lumbar y fémur proximal.
- **Tabla 26.** Datos sobre tipo de estudio, muestra poblacional y kit de análisis de esclerostina utilizado en los estudios publicados en pacientes con fracturas osteoporóticas y controles.
- **Tabla 27.** Datos sobre número de pacientes, edad, tipo de fractura, valores de esclerostina y conclusiones en los estudios publicados sobre fracturas osteoporóticas y controles.

Figuras

- **Figura 1.** Proyecciones en número de pacientes (en millones) para la osteoporosis y baja masa ósea.
- **Figura 2.** Patrones de pérdida de masa ósea relacionados con la edad en hombres y mujeres.
- **Figura 3.** Mecanismos de regulación epigenética. a) Metilación del ADN. A través de este proceso mediado por la ADN metiltransferasa en la región promotora, se bloquea la transcripción de los genes que son hipermetilados. b) Modificación de histonas. La histonametiltransferasa (KMTs) produce la metilación de las mismas produciendo la compactación de la cromatina y la inhibición de la transcripción. Por el contrario, la histonaacetiltransferasa (HATs) previene esta compactación favoreciendo la expresión de los genes. c) Mecanismos de regulación post-transcripcional mediados por los miARNs. Participan bloqueando la translocación del ARN mensajero o induciendo su degradación.
- **Figura 4.** Vías y factores de transcripción relacionados con la diferenciación de los osteoblastos. Los osteoblastos y los condrocitos derivan de manera común de las células mesenquimales pluripotenciales. Runx2 a través de Osx participa en la diferenciación hacia osteoblastos y son regulados por numerosas moléculas que actúan potenciando o inhibiendo este proceso. Las rutas Wnt/beta-catenina e Ihn también son claves en este proceso
- **Figura 5.** Proceso de diferenciación de los osteoclastos ¹⁰⁶. Estas células tienen su origen en la línea hematopoyética y necesitan para su diferenciación estímulos externos como M-CSF o RANKL entre otros.
- **Figura 6.** Esquematización de las proteínas y factores que participan en la ruta de la Wnt/beta-catenina. La participación de Wnt con los receptores transmembrana provoca la acumulación de la beta-catenina en el núcleo,

favoreciendo la transcripción. En ausencia de beta-catenina, la persistencia del grupo Groucho/TLE inhibe la transcripción.

- **Figura 7.** Análisis de la metilación por escisión específica de bases y espectrometría de masas MALDI-TOF. El ADN genómico es tratado con bisulfito y amplificado por PCR utilizando cebadores que incluyen la secuencia promotora T7. El tratamiento con la fosfatasa SAP neutraliza los nucleótidos no incorporados. El producto de PCR es transcrito y escindido específicamente en las bases U por la RNasa A. Los fragmentos resultantes son analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF para calcular su grado de metilación (%) (<http://www.sequenom.com>).
- **Figura 8.** Diseños de los cebadores obtenidos con el software epidesigner para la región de estudio del gen de la esclerostina (SOST) Los cebadores seleccionados fueron los correspondientes a los cebadores 17 y 28 que son los que más información dieron sobre los sitios CpG de la cadena reversa.
- **Figura 9.** Esquema representativo de una reacción de RT-qPCR basado en la química basada en “stem-loop” para la retrotranscripción de los miARNs. Tras la retrotranscripción del miARN específico y su conversión a cADN, es posible realizar una reacción de PCR usando un par de cebadores específicos (reverse and forward) y una sonda TaqMan para cuantificar de forma relativa la expresión de un miARN específico.
- **Figura 10.** Niveles de esclerostina (pg/ml) en plasma de los sujetos de los tres grupos analizados. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los mismos.
- **Figura 11.** Diagrama de cajas representando el porcentaje de metilación de las muestras de pacientes de osteoporosis (OSTEO), controles (OSTEOC) y de pacientes con osteoporosis y escoliosis degenerativa (OSTEOE) para el amplicón SOST17 en los sitios CpG **A)** CpG_1, CpG_2 y CpG_3; **B)** CpG_4; **C)** CpG_5; **D)** CpG_7, CpG_8; **E)** CpG_9; **F)** CpG_10. * Existen diferencias estadísticamente significativas entre OSTEOC y OSTEOE ($p < 0.05$).

- **Figura 12.** Diagrama de cajas representando el porcentaje de metilación de las muestras de pacientes de osteoporosis (OSTEO), controles (OSTEOC) y de pacientes con osteoporosis y escoliosis degenerativa (OSTEOE) para el amplicón SOST28 en los sitios CpG **A)** CpG_1; **B)** CpG_2; **C)** CpG_4; **D)** CpG_5.; **E)** CpG_6; **F)** CpG_7. * Existen diferencias estadísticamente significativas con OSTEOC ($p < 0.05$). # Existen diferencias estadísticamente significativas con OSTEO ($p < 0.05$).
- **Figura 13.** *Heatmap* con los niveles de expresión de los 9 miARNs significativos a través de las muestras de pacientes con osteoporosis (barra roja superior) y controles (barra verde superior). Según la selección de los 9 miARNs con expresión diferencial ambos grupos quedaron separados de forma adecuada con la excepción del OSTEOC1 cuyo perfil se asemejó más al grupo osteoporosis. Esta figura sirve para ilustrar que la firma de miARNs establecidas parece diferenciar a los pacientes con osteoporosis de los sujetos sanos.
- **Figura 14.** *Heatmap* con los niveles de expresión de los 8 miARNs significativos a través de las muestras de pacientes con escoliosis degenerativa (barra roja superior) y controles (barra verde superior). Según la selección de los 8 miARNs con expresión diferencial ambos grupos quedaron separados de forma adecuada. Esta figura sirve para ilustrar que la firma de miARNs establecidas puede diferenciar a los pacientes con escoliosis degenerativa de los sujetos sanos.
- **Figura 15.** *Heatmap* con los niveles de expresión de los 13 miARNs significativos a través de las muestras de pacientes con escoliosis degenerativa (barra roja superior) y pacientes con osteoporosis (barra verde superior). Según la selección de los 13 miARNs con expresión diferencial ambos grupos quedaron separados de forma adecuada. Esta figura sirve para ilustrar que la firma de miARNs establecidas puede diferenciar a los pacientes con escoliosis degenerativa de los pacientes con osteoporosis.

- **Figura 16.** Expresión diferencial de miRs en el grupo de pacientes con osteoporosis y escoliosis degenerativa respecto al grupo control y comparados entre sí. miRs relacionados con remodelación ósea u osteoporosis (rojo), miRs relacionados con otras patologías óseas (verde)¹⁷², miRs relacionados con otras patologías (azul), miRs no asociados a patología en la literatura (negro).
- **Figura 17.** Diagrama de Venn donde se esquematiza el número de rutas desreguladas en el grupo de pacientes con osteoporosis y en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa respecto a las rutas desreguladas en el grupo de controles y comparados entre si.
- **Figura 18.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en el grupo control, grupo con fractura osteoporótica y grupo con escoliosis degenerativa. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.
- **Figura 19.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con DM2. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.
- **Figura 20.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes sin DM2. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.
- **Figura 21.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes sin DM2. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.
- **Figura 22.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con IMC normal o disminuido. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.

- **Figura 23.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con IMC aumentado. Se observan diferencias estadísticamente significativas para miR-99 entre el grupo de pacientes con fractura osteoporótica y el grupo control. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante las pruebas U de Mann-Whitney. El valor de P se indica mediante: * $p < 0.05$.
- **Figura 24.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con IMC normal o disminuido. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.
- **Figura 25.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con IMC aumentado. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.
- **Figura 26.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con niveles de vitamina D normales o insuficientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.
- **Figura 27.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con niveles de vitamina D deficientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.
- **Figura 28.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con niveles de vitamina D normales o insuficientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.
- **Figura 29.** Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con niveles de vitamina D deficientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.

- **Figura 30.** Curva ROC para el miR-99 en pacientes con IMC aumentado para discriminar entre pacientes de grupo de casos, y pacientes del grupo control.

RESUMEN / ABSTRACT

La fragilidad ósea supone un importante problema de salud con un elevadocoste económico. Además, se ha descrito la relación de esta entidad con la escoliosis degenerativa del adulto y el aumento de la incidencia de ambas patologías con la edad.

El objetivo de nuestro estudio fue la identificación de biomarcadores moleculares, con especial énfasis en marcadores epigenéticos basados en metilación del ADN y microARNs circulantes, que nos permitan la determinación de una mala calidad ósea con una mayor fiabilidad que la densitometría ósea utilizada en la actualidad en la osteoporosis. Para esta finalidad, hemos diseñado un estudio descriptivo de casos y controles en el que comparamos los niveles de esclerostina y la metilación del gen SOST que codifica para la esclerostina, en mujeres postmenopáusicas con fractura de baja energía, escoliosis degenerativa y un grupo control. Además, también se evaluaron los niveles de miARNs circulantes en sangre en estas cohortes, para intentar identificar marcadores diagnósticos para estas patologías.

Como hallazgos más importantes, se han identificado zonas en el gen que codifica para la esclerostina, concretamente en el amplicón SOST 17 y SOST 18 con variaciones en la metilación entre los grupos de estudio, sin embargo, el grado de metilación de estas regiones del gen no se asoció a variaciones en los niveles de esclerostina. En el análisis por secuenciación masiva de ARNs pequeños no codificantes, se identificaron el miR-122 y el miR-99 como candidatos para la caracterización de estas enfermedades. El miR-122 está relacionado con WNT1 y BMP4, impidiendo la activación de la vía WNT/ β -catenina y la diferenciación osteoblástica, El miR-99 participa en las rutas TGF β , WNT, MAPK y AKT/mTOR también relacionadas con el metabolismo óseo. Se observó una tendencia a la subexpresión del miR-122 y el miR-99 en plasma, en el grupo con fractura osteoporótica y el grupo con escoliosis degenerativa respecto al grupo control, sin ser estadísticamente significativas. En el subgrupo con IMC elevado se observó una subexpresión del miR-99 en pacientes con fractura osteoporótica respecto al grupo control con diferencias estadísticamente significativas, presentando una sensibilidad del 83.34% y especificidad del 11.76%. En las cohortes analizadas la densitometría ósea presenta una sensibilidad entre 0 y 50%, con una especificidad entre 92.3 y 100%. Así pues, la combinación de estas dos pruebas podría ser de

gran utilidad para la identificación de mala calidad ósea en mujeres con un IMC elevado.

Por lo tanto, aunque serían necesarios estudios con un mayor número de pacientes, los marcadores epigenéticos pueden suponer una herramienta útil para identificar casos con fragilidad ósea. Además, este trabajo supone el primer análisis mediante secuenciación y posterior validación de los miRNA asociados con la escoliosis degenerativa del adulto.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fragilidad ósea y osteoporosis

1.1.1. Descripción general

La fragilidad ósea se trata de un estado del hueso que predispone a un mayor riesgo de sufrir fracturas; este concepto queda englobado en la definición de osteoporosis que hace referencia a un incremento de la fragilidad ósea y la susceptibilidad del desarrollo de fracturas debido a esta patología sistémica caracterizada por una baja masa ósea y un deterioro de la micro-arquitectura del tejido óseo ¹.

Esta situación conlleva una disminución de la resistencia ósea, es decir, de la fuerza necesaria para desencadenar, bajo unas condiciones específicas de carga, el fracaso biomecánico del hueso ². Se considera que este factor depende predominantemente de dos variables: la cantidad y la calidad ósea ³. Mientras que la cantidad es responsable, *in vitro*, del 60-80% de la resistencia biomecánica, la calidad, como variable en general explicaría el 20-40% restante ⁴. Así pues, la cantidad de hueso dependería directamente de la densidad mineral ósea (DMO), y la calidad de la estructura o disposición espacial de los elementos y de la composición química, dependiendo a su vez estos elementos del remodelado óseo ⁵.

La osteoporosis supone una de las patologías más comunes que afecta a la población de manera generalizada, representando un importante problema de salud pública ¹. Se trata de una enfermedad silenciosa hasta que se complica con episodios de fracturas, las cuales pueden ocurrir tras mínimos traumatismos, o incluso sin traumatismo aparente. El criterio diagnóstico más aceptado y utilizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la detección cuantitativa

mediante densitometría ósea de un T-score menor o igual a -2.5DS en fémur proximal o columna lumbar ⁶.

1.1.2. Epidemiología

La prevalencia de la osteoporosis en Estados Unidos en mayores de 50 años no institucionalizados, mediante determinación de densitometría ósea en fémur proximal y lumbar en 2010, fue de 10.3% con afectación de 10.2 millones de personas. Si nos referimos a la baja masa ósea, tiene un prevalencia del 43.9% afectando a 43.4 millones de personas ⁷. Probablemente si tuviésemos datos de pacientes institucionalizados, estos datos serían mayores. En el mismo trabajo se determinó una mayor afectación en el género femenino con una determinación tanto de osteoporosis (8.2 millones de mujeres vs. 2 millones de hombres) como de baja masa ósea (27.3 millones de mujeres vs. 16.1 millones de hombres)⁷. En la Unión Europea, se estimó en 2010 que 22 millones de mujeres y 5.5 millones de hombres sufrían esta enfermedad, diagnosticados también según los criterios de la OMS ⁸.

Si buscamos datos sobre la población española encontramos qué basándonos en densitometrías óseas compatibles con el diagnóstico de osteoporosis en mujeres mayores de 70 años, la prevalencia sería del 24% si la prueba es realizada en la cadera, y del 40 % si es realizada en la columna lumbar. Si nos basamos en densitometrías óseas con diagnóstico de osteopenia en mujeres mayores de 70 años, las cifras aumentan hasta el 80% en ambas localizaciones ⁹. Las cifras en varones en la población española también son significativamente menores. En personas mayores de 50 años los datos de densitometrías patológicas de osteoporosis serían el 4.8% en raquis lumbar y el 4.4% en cadera. Si comparamos estos datos con la misma franja de edad en mujeres estaríamos en un 26% ^{9,10}.

Aproximadamente una de cada dos mujeres caucásicas experimentarán una fractura relacionada con la osteoporosis a lo largo de su vida, con una proporción de uno de cada cinco individuos cuando nos referimos al género masculino ¹¹.

Wright y colaboradores también ajustan la prevalencia estimada de osteoporosis y baja masa ósea en la encuesta NHANES 2005-2010 en Estados Unidos, con la proyección del censo poblacional en el 2020 y el 2030, estimando un aumento de 10.4 millones (19%) en el 2020, y de 17.2 millones (32%) en el 2030 ⁷ (Fig.1).

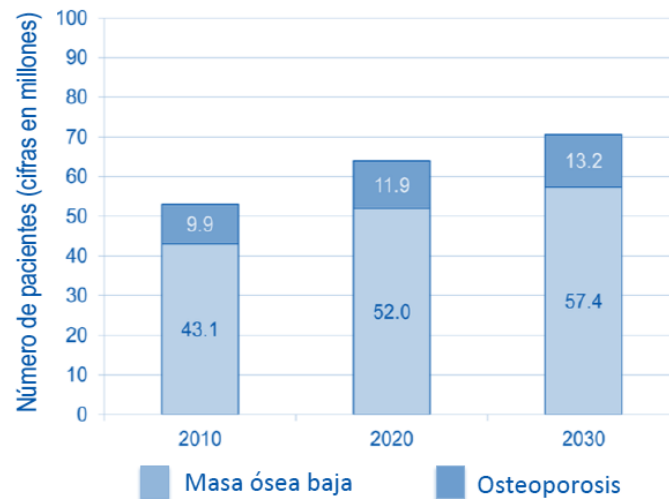


Figura 1. Proyecciones en número de pacientes (en millones) para la osteoporosis y baja masa ósea ⁷.

En cuanto a las diferencias según el grupo racial, se ha detectado una menor prevalencia de osteoporosis en la población de raza negra. A pesar de esta menor prevalencia, aquellos pacientes de raza negra con osteoporosis presentan el mismo riesgo a desarrollar una fractura que los caucásicos ¹².

La localización más frecuente de la fractura osteoporótica es la vertebral, a pesar de que muchas de ellas pueden ser asintomáticas. A continuación, encontraríamos las fracturas de cadera, que a pesar de estar en el segundo puesto en orden de frecuencia tienen asociadas más comorbilidades que las primeras. En tercer lugar, encontraríamos las fracturas de radio distal. Otras localizaciones de fracturas de baja energía serían la del húmero proximal, la pelvis o las fracturas costales ¹³.

En cuanto a la distribución geográfica, el mayor número de fracturas osteoporóticas tiene lugar en Europa, seguido de la región oeste del Pacífico, el

Sudeste asiático y el continente americano. En estos territorios se sitúan el 97% de las mismas, estando este dato influenciado por el hecho de que la población con mayor edad se concentra en estas zonas, probablemente este dato también se encuentre influenciado porque existan mejores registros demográficos en estas localizaciones ¹⁴.

1.1.3. Impacto económico

Es ampliamente conocido el impacto económico que suponen las fracturas osteoporóticas en nuestro entorno debido a su elevada frecuencia y las consecuencias que conlleva esta patología.

En Estados Unidos ocurren unos dos millones de fracturas osteoporóticas al año, las cuales causan 432.000 ingresos, 2,5 millones de visitas médicas y 180.000 servicios de hospitalización domiciliaria, lo que supone unos costes sanitarios de unos 19 billones de dólares. En 2025, donde se estima una población de edad más avanzada que la actual, se espera un gasto directamente asociado a esta patología de 25,3 billones de dólares ¹⁵.

En cuanto a los datos económicos europeos, la osteoporosis supuso 2 millones de DALYs (disability adjusted life years) y un gasto de 37 billones de euros en 2010 ¹⁶.

Si analizamos estudios sobre coste de fracturas osteoporóticas en población española, encontramos que una fractura cadera supone un gasto de 10.246 euros, una fractura vertebral 4.923 euros y una fractura de radio distal 2.457 euros ¹⁷. El informe más reciente realizado por la Fundación Internacional de Osteoporosis publicado en 2022 documentó la carga económica de la osteoporosis en 29 países europeos y señala que en España se produjeron 289.000 fracturas por fragilidad en 2019, lo que supone aproximadamente el 3,8% del coste sanitario, unos 4.300 millones de euros¹⁸. Por otra parte, deberemos considerar que además de los gastos relacionados directamente con la fractura aguda, habría que considerar aquellos derivados de la convalecencia, rehabilitación, y gastos indirectos como personal cuidador en domicilio o ingresos en residencias geriátricas, lo que por ejemplo, representa un 43% del coste global del tratamiento ¹⁵.

1.1.4. Fracturas osteoporóticas

El trastorno clínico y funcional más importante que supone la osteoporosis son las fracturas osteoporóticas, consideradas aquellas ocurridas tras un mecanismo de baja energía como una caída desde su propia altura o aquellas que aparecerían sin traumatismo aparente ¹⁹. Suponen un problema de salud de gran magnitud por las consecuencias asistenciales, socio-sanitarias y económicas que acarrearán, debido al envejecimiento de la población ²⁰.

La fractura osteoporótica se producirá cuando exista una sobrecarga sobre el hueso, a veces por caídas de baja energía o incluso por actividades de la vida diaria ²¹. La probabilidad de tener una fractura de baja energía a lo largo de su vida en la edad de instauración de la menopausia, excede el del cáncer de mama (un 12% aproximadamente), y se establece en alrededor de 40% en Europa occidental, una cifra similar a la probabilidad de patología cardíaca coronaria ²².

Las fracturas más frecuentes son las vertebrales, las de fémur proximal y las de radio distal. Otras localizaciones frecuentes son la pelvis y el húmero proximal. Ante cualquier fractura reciente en un adulto mayor de 50 años localizada en un sitio principal del esqueleto, deberemos considerar el diagnóstico y tratamiento de esta patología ²¹. Localizaciones que pueden ser una excepción al respecto serían las falanges de las manos y los pies, el esqueleto facial y el craneal, que se relacionan con mayor frecuencia con la energía del impacto que con una baja masa ósea ²³.

La distribución de la frecuencia de localizaciones varía según la edad, ya que las fracturas de radio distal serían más comunes en pacientes más jóvenes con edades sobre los 65 años, mientras que las fracturas de cadera sucederían en personas mayores de 75 años ¹⁶.

El sexo también supondrá un factor diferencial a la hora de la localización de las fracturas, ya que a pesar de tener un riesgo más elevado de sufrir una fractura en general el sexo femenino, éste es cuatro veces mayor en las fracturas de radio distal, pero sólo el doble en las fracturas vertebrales, posiblemente por una pérdida diferente de calidad ósea según localizaciones tras la menopausia ¹⁶.

1.1.5. Comorbilidades asociadas

La consecuencia clínica principal de esta patología es la fractura osteoporótica, cuyas consecuencias incluyen el dolor crónico, la discapacidad o incluso la muerte.

Un aspecto importante es la morbilidad y el empeoramiento en la calidad de vida asociado a las fracturas osteoporóticas, y con la finalidad de cuantificar este hecho se crearon cuestionarios específicos como el *Health-related quality of life* (HRQOL) o el QUALEFFO. En el estudio de Halberg *et al.* pudieron demostrar en una cohorte de 600 mujeres consecutivas con fracturas osteoporóticas de 55-75 años, que sufrían un empeoramiento de su calidad de vida medida mediante HRQOL a los dos años de la fractura ²⁴.

Las fracturas vertebrales son las fracturas osteoporóticas más frecuentes ¹³, suponiendo un importante incremento de la morbilidad y mortalidad en los pacientes afectados, así como un incremento en las fracturas de cadera ^{25,26}.

El riesgo relativo ajustado por edad de fallecer tras sufrir una fractura vertebral clínica es de 8.64 ²⁷. A pesar de que la mayoría de las fracturas vertebrales son inicialmente asintomáticas, frecuentemente están asociadas a dolor, discapacidad, deformidad y mortalidad ²³. Los cambios posturales asociados a una cifosis residual pueden suponer una limitación en las actividades de su vida diaria. Las fracturas múltiples torácicas pueden desencadenar o empeorar una patología restrictiva torácica y las fracturas lumbares pueden suponer un cambio en la anatomía abdominal favoreciendo clínica como distensión abdominal, pérdida de apetito, o disminución de la motilidad intestinal ¹⁶.

Las fracturas de cadera están asociadas con un incremento de la mortalidad entre el 8 y el 36% el primer año, con una mortalidad más alta en hombres que en mujeres ²⁸. Por otro lado incrementan 2.5 veces el riesgo de futuras fracturas ²⁹. Aproximadamente un 20% de los pacientes con fractura de cadera necesitan cuidados de enfermería a domicilio prolongados en el tiempo, y sólo el 40% de los pacientes alcanzan el nivel de independencia que tenían antes de la fractura ¹¹.

Las fracturas de radio distal son menos discapacitantes, pero tanto ellas como sus secuelas pueden interferir en las actividades de la vida diaria de los pacientes tanto o más que las anteriores ²¹.

También señalar que los datos epidemiológicos aportados para las fracturas de cadera son más fiables que en otras localizaciones, ya que todos los episodios en las mismas suponen un ingreso del paciente, por el contrario, las fracturas vertebrales muchas veces son asintomáticas y las de radio distal y húmero proximal se suelen tratar de manera ambulatoria.

El riesgo de muerte se está incrementado en pacientes con fracturas osteoporóticas y el riesgo más alto se encuentra inmediatamente después del episodio de fractura ³⁰. En este aspecto también existen diferencias entre ambos sexos, ya que a pesar de ser más frecuentes en mujeres, presentan una mayor mortalidad relacionada con la fractura los hombres, además de unos índices más altos de comorbilidades ^{25,31}.

1.1.6. Fisiopatología

La masa ósea en adultos de edad avanzada es el pico de masa ósea adquirido a la edad de 18-25 años, menos la cantidad de ósea perdida a lo largo del tiempo. Ese pico de masa ósea está determinado por factores genéticos, la nutrición, el estado endocrino, la actividad física, el estado de salud, entre otros durante el crecimiento ³².

El remodelado óseo constituye un proceso por el cual el esqueleto se mantiene en buenas condiciones, retirando el hueso con propiedades deterioradas y substituyéndolo por hueso de formación nueva. La pérdida ósea ocurre cuando este balance está alterado, reabsorbiéndose más hueso del que se forma. Este hecho ocurre en la menopausia y en la edad avanzada ³². Con el inicio de la menopausia aumenta el remodelado óseo, magnificándose el impacto de la pérdida de equilibrio entre la formación y la reabsorción, esto conducirá a un mayor riesgo de fractura (Fig.2).

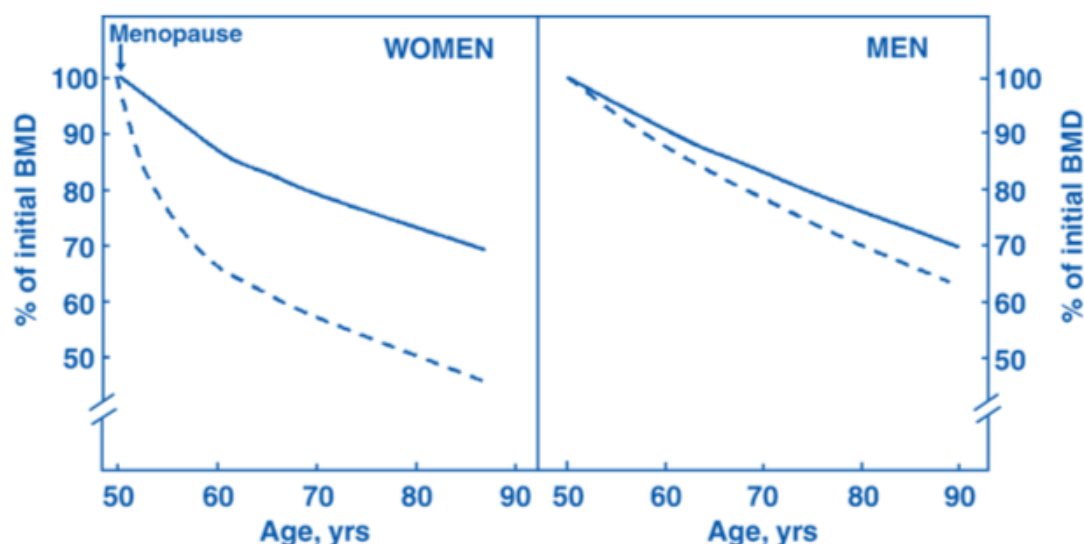


Figura 2. Patrones de pérdida de masa ósea relacionados con la edad en hombres y mujeres ³².

Así pues, numerosos estudios sugieren que un rápido remodelado óseo (que podremos medir con los marcadores bioquímicos de formación y reabsorción ósea) aumenta la fragilidad ósea y el riesgo de fractura ⁸.

Por otra parte, existen una serie de factores que incrementarán independientemente el riesgo de fractura, como el déficit de hormonas sexuales, o el uso de corticoides³³.

La densidad de masa ósea es la cantidad de masa expresada por unidad de volumen (densidad volumétrica) o por área (densidad de área), siendo esta última más comúnmente usada, y las técnicas más utilizadas para su determinación son las de densitometría. La más aceptada es la basada en la medición de la absorción de rayos X por energía dual (DEXA) ⁶.

1.2. Métodos diagnósticos

1.2.1. Densitometría ósea

En la actualidad se define *osteoporosis* según los criterios de la Organización Mundial de la Salud, como la determinación cuantitativa de la densidad mineral ósea (BMO, *bone mineral density*), mediante medición de la

absorción central dual de energía de rayos X (DXA), como un T-score menor o igual a -2.5 DS en fémur proximal o columna lumbar, según los criterios de la Organización Mundial de la Salud. Se define *baja densidad ósea* como un T-score entre -1 DS y -2.5 DS en cualquier localización del esqueleto ⁶. Esta baja masa ósea conocida como osteopenia no se considera una categoría patológica ⁸.

Como podemos observar en la definición, la unidad en la que se expresa esta prueba es la desviación estándar (DS). También deberemos diferenciar en esta determinación el T-score y Z-score. El T-score, como medida más utilizada, hace referencia al número de DS de la densidad ósea de un individuo que difiere del esperado en individuos jóvenes sanos. El Z-score haría referencia al número de DS de un individuo que difiere de uno de su misma edad y sexo.

El *grupo de referencia* recomendado por la Organización Mundial de la Salud para calcular los scores en fémur proximal son mujeres de entre 20 y 29 años, raza blanca, no hispanas de la tercera encuesta NHANES III (1988-1994) (National Health and Nutrition Examination Survey) ³⁴. Aunque no existe una recomendación internacional para las determinaciones en columna lumbar, se utiliza la base de datos de densitometrías realizadas a mujeres de 30 años de raza blanca. Estos grupo de referencia se usan para calcular la T-score en cualquier grupo racial para ambos sexos, y no sería útil su uso en niños y adolescentes ³⁵. Para este grupo de población es de mayor utilidad la utilización del Z-score.

La *localización de la determinación de la densidad mineral ósea* ha sido motivo de debate. La Fundación Nacional de la Osteoporosis (NOF) recomienda considerar la densidad mineral ósea en el cuello femoral y la columna lumbar (L1-L4) para definir el término osteoporosis y baja masa mineral ósea ²¹. Por otra parte, grupos como la Sociedad Europea de Aspectos Clínicos y Económicos para la Osteoporosis y Osteoartritis y la Organización Mundial de la Salud han recomendado la utilización exclusiva del cuello femoral ^{36,37}.

En el trabajo de Wright y colaboradores del 2014, comparando las determinaciones en cuello femoral y columna lumbar, determinaron qué si sólo toman las determinaciones del cuello femoral, se produce una reducción del diagnóstico de osteoporosis del 54% y de la determinación de baja masa ósea del

10%. Estas diferencias podrían ser explicadas por las diferencias de composición entre el tejido óseo de la columna lumbar, más trabecular y con una microarquitectura más propensa al adelgazamiento y a los cambios osteoporóticos que la región de la cadera que es más rica en hueso cortical ⁷. Ante esta variabilidad de opiniones, la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD) indica que tanto el cuello femoral, como la columna lumbar y la articulación de cadera en su totalidad pueden ser utilizadas para diagnosticar la osteoporosis y la densidad mineral baja ³⁸.

Por otro lado, en personas ancianas la determinación de la densidad ósea lumbar puede llevar a errores de medición debido a deformidades vertebrales como la escoliosis, osteofitos o calcificaciones vertebrales y en estos casos deberíamos plantearnos la utilización de otra localización como la del cuello femoral ³⁹.

1.2.1.1. Limitaciones de la densitometría

Según las principales guías clínicas, la prueba diagnóstica para la determinación de la osteoporosis es la densitometría ósea, ya que se ha observado su relación con las fracturas de baja energía, duplicándose el riesgo de fractura al producirse una desviación estándar en la misma, o que aquellos pacientes con una T-score patológica para la osteoporosis suponían una población con alto riesgo de sufrir uno de estos episodios ⁴⁰. No obstante, existen diversos trabajos que ponen de manifiesto una población de pacientes que sufren fracturas de baja energía con densitometrías normales ⁴¹⁻⁴⁴.

Por lo que se refleja en la literatura, al presentar esta prueba una alta especificidad, pero una baja sensibilidad para la determinación de fracturas de baja energía, produciéndose la mayoría de las fracturas osteoporóticas en pacientes con densitometrías normales, no se recomienda su realización como método de cribado.

También han sido descritas una serie de limitaciones técnicas relacionadas con la posición del paciente o con la dificultad de determinación de la masa ósea

en determinadas patologías como la osteomalacia, la artrosis, la escoliosis y las fracturas vertebrales previas ⁴⁵.

Otra manifestación que encontramos en las principales guías de la labilidad de esta prueba es que a pesar de ser considerada la prueba diagnóstica principal, recomiendan iniciar el tratamiento para esta patología ante la presencia de una fractura de baja energía independientemente del resultado obtenido en la densitometría, incluso sin la realización de esta prueba ^{16,21,46}.

Para mejorar la determinación de la predicción del riesgo de fractura, la Organización Mundial de la Salud ha desarrollado un índice de determinación del riesgo de fractura (país específico) que utiliza nueve factores clínicos añadidos a la determinación de masa ósea mediante densitometría ^{21,47}. Así pues, en la guía nacional de osteoporosis del Reino Unido dan mayor importancia al FRAX que a la densitometría ósea, a pesar de no ser ésta tampoco una herramienta perfecta que nos permita una adecuada fiabilidad ⁶.

No obstante y a pesar de las limitaciones descritas en este apartado, la última guía europea publicada en octubre del 2018, en su resumen de principales recomendaciones en cuanto al diagnóstico de esta patología, sigue reflejando la densitometría ósea como prueba diagnóstica principal ⁸.

1.2.1.2. Fractura osteoporótica

Las fracturas osteoporóticas o de baja energía (sin traumatismo o con caída desde su propia altura) supone la manifestación clínica de la patología osteoporótica, más allá de los resultados encontrados en la densitometría ósea ¹⁹. Así pues, la osteoporosis severa se describiría como la presencia de una o más fracturas por fragilidad ³⁶.

Además se ha observado en varios trabajos publicados, que el sufrir una fractura osteoporótica supone un factor de riesgo importante para volver a sufrir una fractura de baja energía en el futuro ^{48,49}. Este hecho está aún más claro y estudiado en la literatura en referencia a las fracturas vertebrales, donde se ha visto que a pesar de ser muchas veces asintomáticas suponen un factor de riesgo

importante para sufrir otra fractura osteoporótica tanto a nivel del raquis como de otra localización ^{50,51}. Al tratarse de lesiones muchas veces asintomáticas, en ciertos casos debemos plantearnos realizar pruebas de imagen para descartar la presencia de las mismas. Estos casos serían mujeres postmenopáusicas con historia de pérdida de altura mayor o igual a 4 cm, cifosis, tratamiento reciente o frecuente con corticoides, una densitometría ósea con un T-score menor o igual a -2.5DS o tener antecedentes de fractura de baja energía en una localización diferente al raquis ⁵².

1.2.2. Cuestionarios para calcular el riesgo de fractura

Estas herramientas surgen de las limitaciones observadas por la densitometría para calcular el riesgo de sufrir este proceso patológico consecuencia de la mala calidad ósea. Algunos de estos serían la calculadora de riesgo de fractura Garvan o el QFracture, aunque el más aceptado y utilizado es el cuestionario FRAX.

FRAX

Supone un algoritmo informático desarrollado por la OMS que está en funcionamiento desde 2008. Esta herramienta calcula en hombres y mujeres la probabilidad a los diez años de tener una fractura mayor osteoporótica (cadera, vertebral, húmero, radio distal) y una fractura de cadera⁵³.

Los factores de riesgo que utiliza para realizar este cálculo estadístico son los siguientes, de los cuales excepto la edad, la altura y el peso, el resto serán estudiadas de manera dicotómica ⁵³:

- Edad
- Sexo
- Peso
- Altura
- Antecedente de fractura previa
- Antecedente familiar de fractura de cadera
- Fumador

- Tratamiento con corticoides
- Historia de artritis reumatoide
- Historia de causas de osteoporosis secundaria
- Ingesta de alcohol

Densitometría ósea de localización femoral (sería un valor a añadir optativo, aunque se ha visto que junto con el dato de la edad podría mejorar la predicción del riesgo de fractura sin afectar a la especificidad ⁵⁴).

Los cuestionarios FRAX tienen modelos específicos para cada país con unas estadísticas de fractura y mortalidad ajustadas a los datos de los mismos.

Este sistema calcula la probabilidad de fractura teniendo en cuenta el riesgo de fractura y de mortalidad, lo cual lo diferencia del resto de algoritmos. Este hecho es importante ya que algunos factores implicados en la mortalidad, estarían también relacionados con el riesgo de fractura ⁵³.

Sus usos más establecidos son la posible indicación de densitometría o la determinación de inicio de tratamiento, aunque los resultados obtenidos tienen una utilidad incierta como ocurría en el caso de la densitometría ósea ⁸.

Las principales limitaciones descritas para esta herramienta son que, en cuanto a los antecedentes de fracturas, no tiene en cuenta ni su número, ni la localización, ni el momento en el que ocurrieron. También se critica que no se contemplan las dosis de parámetros importantes como el uso de corticoides, de consumo diario de tabaco o de alcohol en los pacientes. Por otra parte, tampoco tiene en cuenta los antecedentes de caídas ⁵⁵.

Además, varios estudios que han aplicado este cuestionario a población española, concluyen con sus resultados, que la herramienta infraestima el riesgo de fractura mayor osteoporótica en los estudios realizados en nuestro país ⁵⁶⁻⁵⁸.

1.2.3. Marcadores bioquímicos

Los marcadores del metabolismo óseo son moléculas detectables en la circulación que podemos dividir en *marcadores de formación*, los cuales serían aquellos que son productos de la actividad de los osteoblastos o que derivan del metabolismo del procolágeno, y *marcadores de degradación*, como aquellos resultantes del metabolismo de los osteoclastos o como productos de degradación del colágeno ⁵⁹. Se ha observado que podrían tener una importancia como marcadores bioquímicos para intentar dar información sobre el estado del metabolismo óseo y la predicción del riesgo de fractura ⁶⁰.

La International Osteoporosis Foundation (IOF) y la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) recomiendan la utilización del análisis en suero del propéptido aminoterminal del colágeno tipo 1 (P1NP) como marcador de formación ósea y del isómero beta del telopéptido carboxi-terminal del colágeno I (beta-CTX) como marcador de degradación ósea ⁸.

El procolágeno es la molécula precursora del colágeno tipo 1 y presenta extensiones amino- y carboxi-terminal que serán eliminados mediante procedimientos enzimáticos extracelulares para dar lugar al colágeno tipo 1. Como consecuencia de esta acción se libera el propéptido amino-terminal de procolágeno tipo 1 (P1NP) y el propéptido carboxi-terminal procolágeno tipo 1 (P1CP). Las moléculas producto de esta degradación se producen sobre todo en el hueso, pero una pequeña cantidad de las mismas podría tener su origen en otras zonas que también tienen colágeno tipo 1 como la piel, el tendón o el cartílago. Ambas pueden ser medidas en suero pero está más estudiado y aceptado en la literatura la utilización del análisis del P1NP en este tipo de muestra biológica⁶¹.

En los telopéptidos del colágeno tipo 1 podemos distinguir los N-telopéptidos y los C-telopéptidos. Los C-telopéptidos estarían relacionados con el envejecimiento del hueso, ya que al producirse éste, el ácido aspártico del mismo sufriría una isomerización dando lugar al ya nombrado ácido beta-aspártico (beta-CTX). Este telopéptido isomerizado sería específico del hueso y se liberaría al fluido extracelular durante la reabsorción ósea. Estas moléculas pueden ser

determinadas en suero y en orina, aunque su análisis más aceptado en la literatura es en suero ⁶¹.

Estos parámetros no están exentos de limitaciones en los estudios que se refieren a los mismos, como la necesidad de unificación de las unidades utilizadas para poder comparar estudios, la importancia de establecer valores de referencia en función de la localización geográfica o las dificultades para la estandarización de la toma de muestras ⁶², además de presentar una variabilidad asociada a la edad ⁶³. En esta línea se han podido establecer como unidades de referencia para el P1NP y para el beta-CTX los nanogramos por litro. Los intervalos de referencia establecidos en España en una muestra de 1080 mujeres sanas postmenopáusicas son de 19-100 ng/ml para el P1NP y de 0.11-1010 ng/ml para el beta-CTX con un intervalo de confianza del 95%. Las medias determinadas en este estudio fueron de 47.7 ± 19.9 ng/ml para el P1NP y 0.38 ± 0.19 ng/ml para el beta-CTX ⁶⁴.

Hallazgos recientes reflejan el posible potencial de ciertos marcadores bioquímicos para intentar predecir del riesgo de fractura osteoporótica, pero no hay suficientes datos en la literatura para recomendar su uso en la práctica clínica habitual ^{60,65}. Estos parámetros en el momento actual no están incluidos en ninguno de los cuestionarios para la determinación de riesgo de fractura como el FRAX.

1.3. Osteoporosis y escoliosis degenerativa

La escoliosis en el adulto se define como una deformidad en un raquis de un paciente esqueléticamente maduro con un ángulo de Cobb mayor de 10° en el plano coronal ⁶⁶.

Podemos clasificar esta patología en tres tipos ⁶⁶:

- Tipo I: escoliosis degenerativa de *novo*. Es consecuencia de una degeneración asimétrica de discos y facetas con mínimas deformidades vertebrales. Sobre todo, se localiza en la zona lumbar.

- Tipo II: escoliosis idiopática del adulto. Aquella que se forma antes de la madurez ósea y que produce sintomatología en la edad adulta. Puede afectar también al raquis cervical y torácico.
- Tipo III. Escoliosis degenerativa secundaria. En este apartado encontramos dos subtipos, el primero relacionado con patologías estructurales como la disimetría o patología de cadera, y el segundo subtipo relacionado con patologías metabólicas, mayoritariamente la osteoporosis que causaría una deformidad por las fracturas y deformidades causadas por una mala calidad ósea junto con procesos degenerativos.

Así pues, deberemos distinguir entre aquella escoliosis del adulto iniciada en la adolescencia y aquella secundaria a diversos procesos etiológicos que aparece y se desarrolla en la edad adulta.

Existen estudios que han intentado relacionar la escoliosis idiopática del adolescente con osteoporosis, aunque con las siguientes limitaciones metodológicas. Algunos de ellos se tratan de estudios de casos y controles en los que simplemente, comparan la masa ósea de los dos grupos y afirman que existen diferencias estadísticamente significativas ^{67,68}. En otra serie de estudios sí que tienen en cuenta valores de referencia, pero al ser pacientes jóvenes utilizan el Z-score encontrando resultados dispares entre los mismos ⁶⁹⁻⁷¹. Es importante señalar que la definición aceptada para el diagnóstico de la osteoporosis utiliza el T-score y no el Z-score por lo que careceríamos de criterios diagnósticos adecuados en este grupo de pacientes. Otros trabajos hablan de un aumento de los marcadores del metabolismo óseo en este grupo, pero sin utilización unificada de los más aceptados y sin ser éstos tampoco criterios diagnósticos ^{67,72}. El grupo de Tanabe *et al.* realizó un estudio histomorfométrico con biopsias que sí que nos puede hacer pensar que nos encontramos ante una peor calidad ósea en estas pacientes y que debemos encontrar métodos y criterios para caracterizarla ⁷².

En cuanto a la osteoporosis degenerativa, ésta y la osteoporosis son dos patologías relacionadas entre ellas, cuya incidencia aumenta con la edad. Así pues, se ha observado un aumento de fracturas osteoporóticas en estos pacientes como causa y consecuencia de esta enfermedad y que pueden suponer un

agravamiento de la misma y de las consecuencias clínicas respectivas ⁷³. El diagnóstico basado en la densitometría tiene limitaciones características de esta situación. En primer lugar, se ha observado mediante estudios en cadáveres que la rotación vertebral disminuye la medición de la masa ósea ⁷⁴. Estudios clínicos en los que utilizan la densitometría ósea para caracterizar la osteoporosis, han encontrado importantes discordancias en los valores determinados en raquis lumbar y fémur proximal, siendo los valores más bajos en este últimos. El lado de la curva donde se determinase también influiría en la medida de la masa ósea, ya que se han observado valores más altos en el lado cóncavo que en el convexo ⁷⁵⁻⁷⁷.

Así pues, queda reflejado en la bibliografía las dificultades añadidas que supone la escoliosis para las determinaciones mediante densitometría ósea, siendo ésta una técnica que presenta numerosas limitaciones.

1.4. Epigenética

1.4.1. Definición

La regulación epigenética hace referencia a los cambios heredables y no heredables en la expresión de los genes que viene definida por el material genético, y que no viene determinada por cambios en la secuencia de nucleótidos y que influye en el fenotipo ⁷⁸. Más recientemente, el consorcio del NIH Roadmap Epigenomics Project define la epigenética como los cambios heredables en la función y la expresión de los genes (tanto en células como en individuos) que son estables, así como también los cambios que alteran el perfil transcriptómico sin ser por ello heredables (Roadmap Epigenomics Project “Overview” 2010. <http://www.roadmapepigenomics.org>). La epigenética explica la conexión entre el ambiente, el estilo de vida y la genética para justificar por qué con la misma dotación genética se puede tener un fenotipo diferente ⁷⁹. Sería el mecanismo común con el que factores externos e internos, tales como la dieta, el envejecimiento, las hormonas, la actividad física, las enfermedades y los procesos

patológicos e incluso los tratamientos aplicados, entre otros, podrían influir en la expresión del material genético ⁸⁰.

Existen varios mecanismos mediante los que se lleva a cabo la regulación epigenética, entre ellos la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales (PTMs) de las histonas, las variantes de histonas, la organización tridimensional de la cromatina, y a nivel post-transcripcional la regulación que ejercen algunos ARNs no codificantes como los microARNs (miARNs) o los ARNs no codificantes largos (lncARNs). Sin embargo, los más estudiados y mejor caracterizados actualmente son la metilación del ADN, el código de las histonas (o PTMs de las histonas) y los microARNs (Fig.3).

1.4.2. Mecanismos epigenéticos

1.4.2.1. Metilación del ADN

Es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados y mejor caracterizados. Se trata de la transferencia de un grupo metilo (-CH₃) desde la molécula de S-adeosil metionina (SAM) hasta el carbono 5 del anillo de pirimidina de un residuo de citosina en el dinucleótido citosina-fosfato-guanina (CpG) en la región promotora de los respectivos genes, para formar la 5-metilcitosina (5mC) ⁸¹. Este proceso estaría catalizado por la familia de las proteínas ADN metil-transferasas (Dnmts) que utilizan el SAM para producir la metilación de las citosinas en la cadena del ADN. De forma general, la consecuencia de la metilación de las citosinas es la activación de la heterocromatinización y por lo tanto la compactación de la cromatina impidiendo la unión de los factores de transcripción a la región génica donde deberían unirse, produciendo una inhibición de la transcripción ⁸¹. El proceso de desmetilación puede llevarse a cabo de manera pasiva, inhibiendo la metilación y durante la replicación, o de manera activa con la conversión de la 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina en la participan proteínas de la familia TET (*Ten eleven translocases*) ^{82 83}. La regulación epigenética es esencial en el establecimiento del patrón epigenético y por

lo tanto del perfil transcriptómico específico de cada estirpe celular que compone un tejido y constituye un organismo.

Varios estudios han relacionado estos procesos de metilación con la diferenciación de células mesenquimales hacia la línea osteogénica. Por ejemplo, se ha observado que la hipometilación de la región promotora de los genes *RUNX2*, osteocalcina, *DLX5*, y del correceptor *ROR2* favorece la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos^{84–86}. También se ha observado que variaciones epigenéticas en la ruta Wnt están relacionadas con cambios en la función ósea.

La esclerostina es un inhibidor de la ruta Wnt que actúa disminuyendo la formación ósea. Las variaciones epigenéticas en cuanto a la metilación del promotor de su gen *SOST* se han relacionado también la diferenciación celular, encontrando una hipermetilación en los osteocitos e hipometilación en los osteoblastos⁸⁰.

1.4.2.2. Modificaciones post-traduccionales de las histonas

El nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina, donde se organiza el ADN y está formado por un octámero de proteínas llamadas histonas (H2A, H2B, H3 y H4), donde el octámero se compone de pares de cada una de estas histonas. La función del nucleosoma es la de estabilizar, proteger y condensar este material. Estas proteínas modificarían la estructura de la cromatina para favorecer o inhibir la transcripción de los genes que se localizan en esa región⁸⁰. Existen multitud de modificaciones post-traduccionales (PTMs) de las histonas mediante los cuales las histonas realizan su función, entre ellas la fosforilación, la ubiquitinación o la ADN-ribosilación, aunque las PTMs más estudiadas son la acetilación y la metilación⁸⁷. La acetilación de las histonas está relacionada con la activación de la transcripción de los genes, ya que de forma general neutralizaría las cargas positivas de las histonas previniendo la compactación de la cromatina. La desacetilación de la cromatina produciría el efecto contrario. Estos mecanismos estarían mediados por las enzimas histona acetiltransferasa (HATs) para introducir los grupos acetilo en los

residuos de lisina de las histonas y las histona deacetilasas (HDACs) que los eliminan ⁸⁸. Otro mecanismo de modificación de las histonas sería la metilación, llevada a cabo por las histonas metiltransferasas (KMTs) que ocurre sobre los residuos de lisina y arginina. La introducción de estas PTMs, de forma general, provocaría la compactación de la cromatina produciendo el bloqueo del acceso de la maquinaria de transcripción y, en consecuencia, inhibiendo la actividad génica. La retirada de estos grupos de metilación de los residuos de lisina estaría llevada a cabo por las enzimas histona lisina desmetilasas (KDMs) ⁸⁸.

1.4.2.3. MicroARNs (miARNs)

Sólo el 1-2% de ARN tiene información para la formación de material proteico, el resto se trata de ARN no codificante ⁸⁹. Uno de los ARN no codificantes más importantes son los microARNs (miARNs), los cuales se tratan de ARN no codificante de unas 20-22 bases de longitud que influye sobre la regulación epigenética postranscripcional ⁹⁰. La biosíntesis de estos ARNs no codificantes se inicia en el núcleo, mediado por la enzima ribonucleasa Drosha, que transforma el miARN primario (pri-miARN) en miARN precursor (pre-miARN). A continuación, la enzima Dicer se encargará de convertir este miARN precursor en miARN maduro ⁹¹. En la base de datos miRBase se pueden encontrar referenciadas hasta 38.589 miARNs (<http://www.mirbase.org/release>, octubre 2018). Los mecanismos mediados por los miARNs llegan a ser bastante complejos ya que cada miARN puede actuar sobre varias dianas de ARN mensajero (ARNm), y donde distintos miARN pueden actuar sobre un mismo mARN ⁹². Los mecanismos de actuación mediados por los miARNs serían tres: en primer lugar la unión a la zona 3' del ARN mensajero que lleva a su degradación mediante el complejo RISC (RNA-induced silencing complex), formado por mARNs y proteínas de escisión; el segundo mecanismo estaría llevado a cabo por sistemas de degradación del ARN sin proteínas de escisión, y en tercer lugar, mediante la disminución de la eficiencia de la traducción por parte de los ribosomas ⁹³. Se ha podido observar que estas moléculas

pueden tener la capacidad de actuar como biomarcadores circulantes en fluidos biológicos (i.e. plasma, suero, orina, lágrimas, saliva, semen, etc.) que son detectables y que nos pueden ayudar en el manejo clínico de diferentes patologías ⁹⁴.

Como ejemplo podemos citar uno de los trabajos de nuestro grupo de investigación basado en el uso de los miARNs circulantes en plasma como método en el diagnóstico de la escoliosis idiopática del adolescente. En este trabajo, se identificó una firma de 5 miARNs (miR-27a, miR-223, miR-122, miR-671 y miR-1306) que permite identificar a los adolescentes diagnosticados con escoliosis idiopática ⁹⁵.

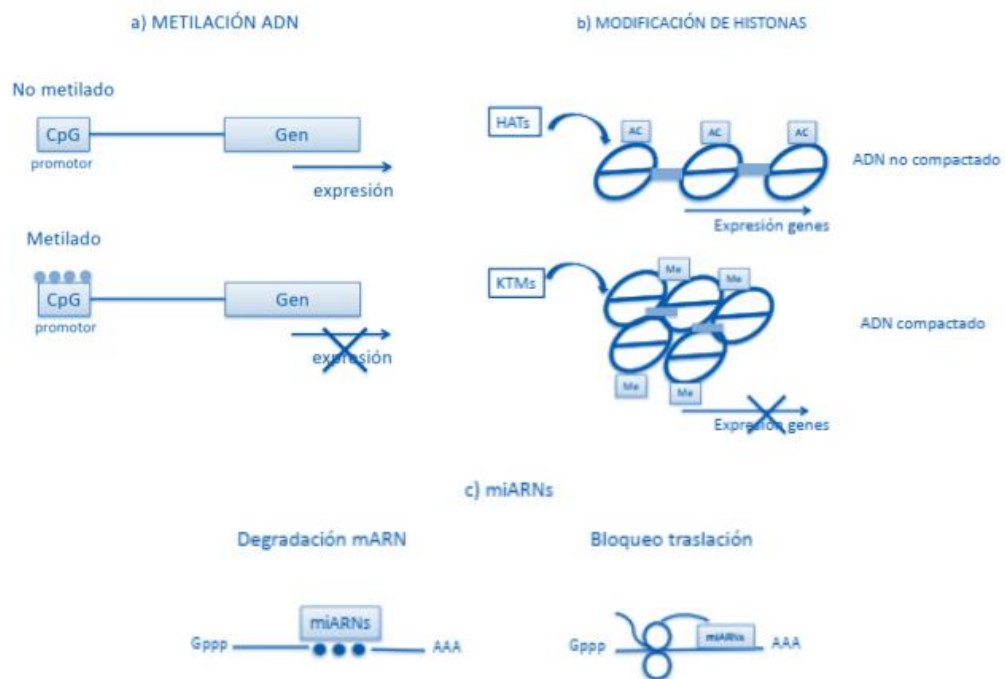


Figura 3. Mecanismos de regulación epigenética. a) Metilación del ADN. A través de este proceso mediado por la ADN metiltransferasa en la región promotora, se bloquea la transcripción de los genes que son hipermetilados. b) Modificación de histonas. La histonametiltransferasa (KMTs) produce la metilación de las mismas produciendo la compactación de la cromatina y la inhibición de la transcripción. Por el contrario, la histonaacetiltransferasa (HATs) previene esta compactación favoreciendo la expresión de los genes. c) Mecanismos de regulación post-transcripcional mediados por los miARNs. Participan bloqueando la translocación del ARN mensajero o induciendo su degradación

⁹⁶.

1.4.3. Aplicaciones de los biomarcadores epigenéticos

La epigenética puede mejorar la forma en la que se practica el diagnóstico clínico, ya que introduce a la información genética otras variables que pueden modificar el fenotipo de la enfermedad ⁷⁹. Además, la comprensión de los mecanismos que regulan la expresión génica sin estar relacionados directamente con una mutación va a permitir conocer los mecanismos de regulación transcripcional que pueden dar lugar a un determinado fenotipo patológico. Todas estas ventajas hacen interesante el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en el estudio de biomarcadores epigenéticos ⁹⁴. Se han desarrollado una serie de herramientas de uso público como la Enciclopedia de Elementos de ADN (Encyclopedia Of DNA Elements, ENCODE) o el Epigenomics Roadmap, como métodos para intentar desarrollar un mapa epigenético dentro de la secuenciación del genoma humano y al alcance de clínicos e investigadores ^{97,98}.

Los avances en la investigación epigenética están permitiendo la generación de nuevas pruebas para el diagnóstico temprano, el pronóstico y la monitorización del efecto y la idoneidad de las terapias. En particular la epigenética está revolucionando la forma de comprender los mecanismos patológicos y en consecuencia contribuyendo a la mejora del diagnóstico clínico y al desarrollo de la medicina de precisión al aportar biomarcadores con nuevas características de especial relevancia para el manejo clínico de las enfermedades. Por lo tanto la aplicación de la epigenética y en concreto el uso de los biomarcadores epigenéticos permitirán el diagnóstico, monitorización y tratamiento de multitud de enfermedades ⁷⁹.

Un biomarcador epigenético se define como cualquier marca epigenética o alteración de mecanismo epigenético que es estable durante la toma y el procesamiento de la muestra biológica, ya sea fluido biológico o preparaciones de tejido fresco, congelado o fijado como muestras de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina (FFPE, formalin-fixed, paraffin-embedded) y que idealmente debería cumplir los siguientes requisitos: (i) reproducible en cualquier técnica analítica de determinación, (ii) define una enfermedad (diagnóstico), (iii) incluso antes de la aparición de los primeros síntomas (diagnóstico precoz); (iv) revela información sobre la historia natural de una enfermedad; (v) predice la

progresión y el desenlace de una enfermedad (pronóstico); (vi) responde a la terapia (predictivo); (vii) permite el seguimiento de las respuestas a la terapia (monitorización de terapias), y (viii) permite el establecimiento de una terapia dirigida adecuada en función del diagnóstico (teragnosis) ^{99,100}.

En este sentido, varios trabajos describen la correlación de los hallazgos epigenéticos en sangre periférica con lo determinado en diferentes tejidos, lo que simplificaría la aplicación de estos procesos, ya que una simple extracción de sangre nos daría mucha información sobre lo sucedido en los diferentes órganos ^{101–103}. Además, también existen trabajos que apoyan la estabilidad de estos elementos en su participación como biomarcadores al no mostrar variabilidad en cuanto al sexo del paciente o la fecha de recogida de la muestra ^{104,105}.

1.5. Metabolismo óseo

El equilibrio de la masa ósea está basado en la relación entre la formación ósea llevada a cabo por los osteoblastos, y la degradación de la misma de la cual se encargan los osteoclastos, para mantener este equilibrio, el control de la diferenciación de estas células desde sus precursores es fundamental ^{33,96}. El origen de estos dos tipos celulares es diferente, ya que los osteoblastos derivan de las células mesenquimales, y los osteoclastos de la línea hematopoyética ⁸⁰. Cuando este equilibrio se rompe y prevalece la degradación ósea podemos tener consecuencias patológicas como la osteoporosis.

La diferenciación de los osteoblastos está regulada por factores transcripcionales como el Runx2 (Runt –related transcription factor 2) y Osx (Osterix), así como vías de señalización que incluyen la ruta de la Wnt/B-catenina, entre otras. Una vez estas células han madurado y se encuentran rodeadas de la matriz ósea, pasan a llamarse osteocitos, y continúan produciendo sustancias que controlan la diferenciación tanto de los osteoblastos como de los osteoclastos ¹⁰⁶ (Fig.4).

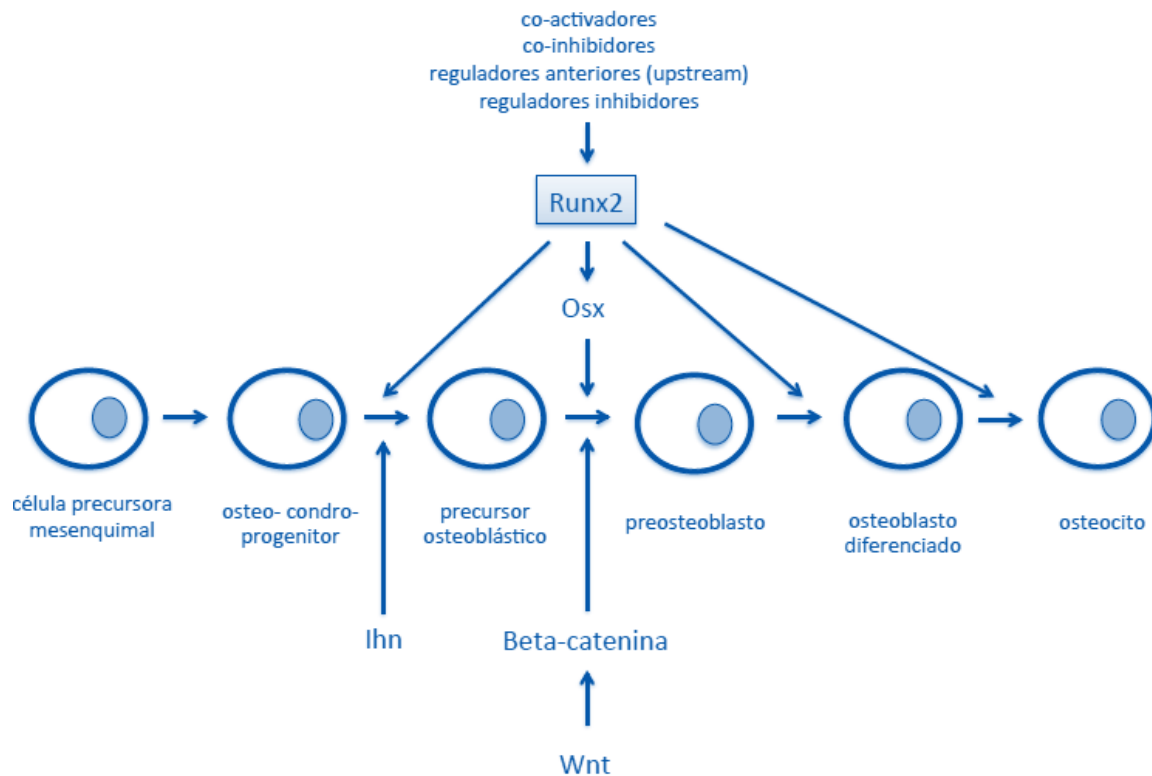


Figura 4. Vías y factores de transcripción relacionados con la diferenciación de los osteoblastos ¹⁰⁶. Los osteoblastos y los condrocitos derivan de manera común de las células mesenquimales pluripotenciales. Runx2 a través de Osx participa en la diferenciación hacia osteoblastos y son regulados por numerosas moléculas que actúan potenciando o inhibiendo este proceso. Las rutas Wnt/beta-catenina e Ihn también son claves en este proceso.

La actividad de los osteoclastos está regulada por el sistema RANK/RANKL/OPG (receptor activador del factor nuclear κ Beta/RANK-ligando/osteoprotegerina). El ligando RANKL es producido por los osteoblastos, linfocitos T activados y osteocitos y se une a los receptores RANK en la superficie de los osteoclastos para activar el factor de transcripción NFATc1 promoviendo la diferenciación de éstos ¹⁰⁷. Por otra parte, la osteoprotegerina (OPG) también

secretada por el osteoblasto, se une al RANKL para inhibir la función de reabsorción ósea ¹⁰⁶ (Fig.5).

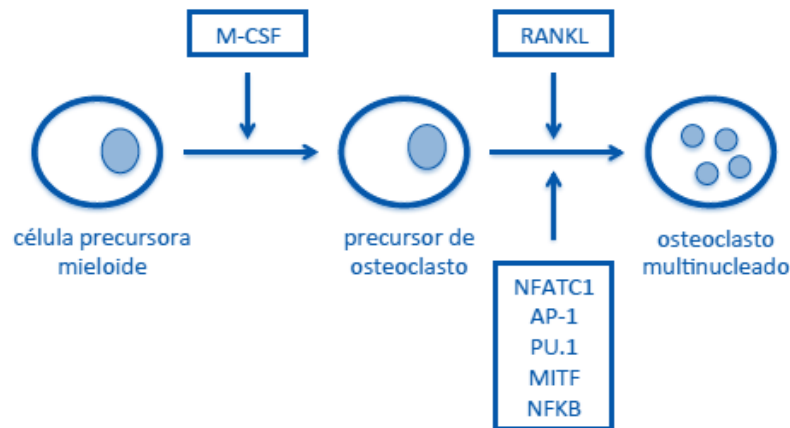


Figura 5. Proceso de diferenciación de los osteoclastos ¹⁰⁶. Estas células tienen su origen en la línea hematopoyética y necesitan para su diferenciación estímulos externos como M-CSF o RANKL entre otros.

Estas vías de diferenciación celular, aparte de estar reguladas por múltiples factores de transcripción que crean un sistema de alta complejidad, también se ha visto en los últimos años que puedan estar reguladas por mecanismos epigenéticos ^{108,109}.

Las *rutras de señalización WNT* son un grupo de vías de transducción que se encargan de la transmisión de señales desde fuera hasta dentro de la célula mediante la interacción de glicoproteínas. Éstas rutras suponen un mecanismo importante de regulación celular que se han ido transmitiendo evolutivamente ¹¹⁰. Las proteínas Wnt suponen un grupo de glicoproteínas extracelulares que interaccionan con el dominio N-terminal extracelular rico en cisteína de los receptores *Frizzled* ¹¹¹. Estas estructuras son proteínas transmembrana con una topología similar a los receptores acoplados a proteínas G ¹¹². Esta unión desencadena una transducción citoplasmática llevada a cabo por las fosfoproteínas *Dishvelled* (Dsh/Dvl) y serán estas las encargadas de desencadenar uno de los tres mecanismos mediados por esta vía ¹¹³. Podemos dividir las entre la vía canónica o dependiente de la ruta *Wnt/beta-catenina* y la vía

no canónica o beta-catenina independiente que a su vez se puede dividir en la ruta de polaridad celular planar y la ruta de *Wnt/calcio* ¹¹⁴.

En la *ruta de Wnt/beta-catenina* el reclutamiento de las fosfoproteínas Dishvelled produce una fosforilación y activación de LRP6 y el reclutamiento de los complejos Axin a los receptores. Estos procesos producirían una estabilización de la beta-catenina mediante la inhibición de la fosforilación mediada por los complejos Axin de la beta-catenina. Ésta se acumularía y viajaría hasta el núcleo celular para activar los genes de esta vía mediante la formación de complejos con los factores de transcripción TCF/LEF (Fig.6) ²⁰. En ausencia de niveles elevados de beta-catenina, estas moléculas se tratan de factores de transcripción de ADN que realizan su función mediante la interacción con el complejo Groucho/TLE reprimiendo la expresión génica mediante la desacetilación de las histonas y la compactación de la cromatina. El aumento de la concentración en el núcleo de beta-catenina, desplazaría el complejo Groucho/TLE favoreciendo la expresión de los genes de esta vía *Wnt/beta-catenina* (Fig.6) ¹¹⁵.

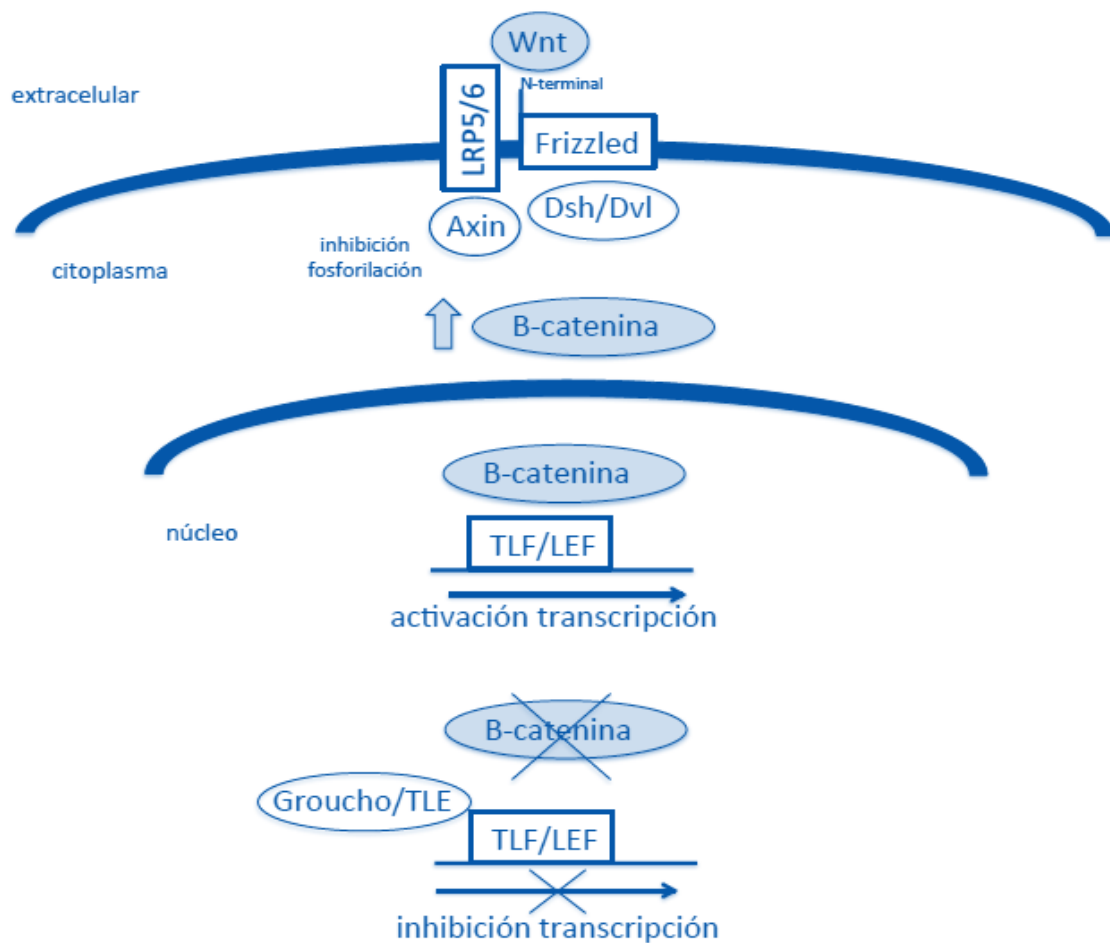


Figura 6. Esquematación de las proteínas y factores que participan en la ruta de la Wnt/beta-catenina ²⁰. La participación de Wnt con los receptores transmembrana provoca la acumulación de la beta-catenina en el núcleo, favoreciendo la transcripción. En ausencia de beta-catenina, la persistencia del grupo Groucho/TLE inhibe la transcripción.

La unión entre las proteínas Wnt y los receptores Frizzled puede precisar de moléculas que favorezcan su función como los co-receptores LRP5/6 (proteínas 5/6 relacionadas con LDL). También existen moléculas que antagonizan la función de esta vía como la esclerostina¹¹⁰.

La desregulación de estas vías está relacionada con multitud de procesos patológicos, algunos de ellos relacionados con el metabolismo óseo ¹¹⁶. Por ejemplo, mutaciones del receptor LRP5 causan su pérdida de función, creando el fenotipo de la patología conocida como Síndrome Osteoporosis-Pseudoglioma (OPPG; OMIM # 259770) que cursa con disminución de la masa ósea, fracturas patológicas y deformidades óseas ¹¹⁷. Otras alteraciones del material genético de

esta proteína pueden cursar con fenotipos que incluyen densidades óseas elevadas¹¹⁸. Mutaciones en el gen de *WNT3* también causarían su pérdida de función, dando lugar a un cuadro conocido como tetra-amelia, donde hay una ausencia en el desarrollo de los cuatro miembros ¹¹⁹.

1.5.1. Esclerostina

La esclerostina es una glicoproteína producida por los osteocitos, codificada en el gen *SOST*, con un efecto paracrino en la función de los osteoblastos ¹²⁰. Mediante su unión a los receptores de superficie LRP5/6 de los osteoblastos realiza su función de inhibición de la formación ósea, impidiendo la función de los osteoblastos, e inhibiendo la vía de la *Wnt/beta-catenina*, y por tanto la formación ósea, además de inducir la apoptosis de los osteoblastos ^{121,122}. También se ha visto que la esclerostina podría tener un papel activador de la actividad de los osteoclastos, mediante la acción sobre la vía RANKL ¹²³.

Se han descrito en la literatura numerosos factores que influirían y modularían la actividad de la esclerostina como: 1) Proteínas morfogenéticas óseas (bone morphogenetic proteins – BMP). Estas moléculas regulan de manera negativa en los osteoblastos la masa ósea y la ruta de la *Wnt/beta-catenina* mediante la regulación de la actividad del gen *SOST* y *DKK1* ¹²⁴; 2) Hormona paratiroidea (PTH). Actuaría inhibiendo la expresión del gen *SOST* ¹²⁵; 3) Hipoxia. La disminución de oxígeno se ha observado que inhibe la transcripción de la esclerostina. El mecanismo por el que se produce, también estaría relacionado con el efecto antagonista que producen las proteínas morfogenéticas ¹²⁶; 4) Prostaglandina E21. Supone un factor que disminuiría la expresión de la esclerostina en los osteoblastos, creando un efecto supresor mediado por la ruta cíclica AMPK (adenosín monofosfato/proteína kinasa A) ¹²⁷; 5) TNF-alfa y TWEAK (TNF- related weak inducer of apoptosis). TWEAK sólo o junto al TNF regularía la acción de los osteoblastos induciendo la expresión de la esclerostina ¹²⁸; 6) Fuerzas mecánicas, con una acción mediada por la proteína de matriz extracelular periostina, disminuiría la expresión del gen *SOST* ¹²⁹; 7) Época del año, se ha observado una variabilidad a lo largo del año en los niveles de esclerostina ¹³⁰; 7)

Histona deacetilasa SIRT1. Se ha identificado como un promotor de la formación ósea mediante la inhibición de la expresión de la esclerostina ¹³¹; 8) Moduladores de los receptores de estrógenos, RUNX2, Osterix (SP7). Estos factores de transcripción tienen un sitio de unión en la región promotora del gen *SOST* desde donde modularían su transcripción ^{132,133}; 9) Polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (single nucleotide polymorphism) en la región promotora del gen *SOST* se han visto relacionados con alteraciones en la densitometría ósea y aumento en el riesgo de fractura ^{134,135} y 10) Metilación del gen *SOST*.

En relación al último mecanismo de regulación de la esclerostina, recientemente se ha descrito la regulación epigenética de la esclerostina mediada por la metilación de este gen y su promotor ¹³⁶. El grupo de Reppe ha demostrado que los niveles de esclerostina en suero se correlacionan fuertemente con el riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas, y además con los niveles de metilación del promotor del gen *SOST* ¹³⁴. Por otra parte, Shan *et al.* explican que esto podría ser explicado por la inhibición de la unión de factores de transcripción a la región promotora del gen *SOST* causada por la metilación ¹³⁷. Papathanasiou *et al.* demostraron diferencias en la metilación del gen *SOST* entre condrocitos afectados de osteoartritis y sujetos sanos, proponiendo que esta regulación podría estar mediada por la proteína BMP-2 y los cambios de afinidad que la metilación podría causar en la unión del factor Smad 1/5/8 a la región rica en CpGs del promotor del gen *SOST* ¹³⁸.

Alteraciones en el gen o en la expresión de su producto proteico, se han relacionado con enfermedades que alteran el metabolismo óseo de baja frecuencia, como la esclerostosis o la enfermedad de van Buchen (VBCH; OMIM # 239100) ¹³⁹. Se ha observado que la delección de este gen en ratones aumenta la formación y resistencia ósea ¹⁴⁰.

Así pues, lo esperable sería que los niveles de esclerostina estuviesen aumentados en pacientes con mala calidad ósea, pero los resultados que encontramos en la bibliografía son contradictorios. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos que consideran la osteoporosis según la definición de la OMS, basada en los valores de la densitometría ósea, encontramos una correlación positiva entre los valores de esclerostina y la densitometría ósea ^{141–149}. No obstante, en

dos trabajos se encontraron valores más bajos en los pacientes con valores de densitometría diagnósticos de osteoporosis^{150,151} y en otros no se encontraron diferencias^{152,153}.

Si tenemos en cuenta los estudios que consideran los pacientes con una mala calidad ósea a aquellos con fractura de baja energía, también encontramos discrepancia en los resultados. El trabajo de Ardawi *et al.* encontró valores más elevados de esclerostina en pacientes con fractura de baja energía respecto al control¹⁵⁴, mientras que en el estudio de Lim *et al.* Encontró los valores de esclerostina disminuidos¹⁵⁵. En el resto de estudios no se encontraron diferencias estadísticamente significativas^{156–158}.

Además, debemos de tener en cuenta que la esclerostina no se produce únicamente en el tejido óseo, y que se ha descrito en otras localizaciones como el hígado, el riñón, el corazón o el tejido mamario entre otros¹⁵⁹.

1.5.2. Regulación epigenética de los genes relacionados con el metabolismo óseo

En los últimos años, son numerosos los estudios que relacionan los mecanismos epigenéticos con las rutas celulares relacionadas con la homeostasis del tejido óseo.

En referencia a los mecanismos de metilación, el gen *SOST* que codifica para la esclerostina es uno de los más estudiados. Son varios los trabajos que relacionan un aumento de la metilación en este gen con una disminución en la expresión de esta proteína^{136,138}. Wang *et al.*, también coincidía con esta correlación en un estudio de los genes *RANK* y de *OPG*, que codifica para la osteoprotegerina¹⁶⁰. Por otra parte, el grupo de Reppe ha identificado cuatro genes cuya expresión variaría con la metilación (*MEPE*, *SOST*, *WIF1*, *DKK1*). Todos estos genes participarían en mecanismos de inhibición de la formación ósea¹⁰¹.

Las investigaciones iniciales sobre los miARNs, han relacionado estos modificadores epigenéticos con patologías como el cáncer, el Alzheimer o alteraciones cardiovasculares, pero en los últimos años se han descubierto miARNs que regulan el metabolismo óseo, siendo definidos como ‘osteomiRs’⁹¹. Así pues, trabajos previos, han relacionado estas moléculas con los procesos de diferenciación celular de osteoblastos y osteoclastos, así como la posibilidad de que afecten al desarrollo de sus funciones.

No obstante, a pesar del notable número de miARNs descritos y relacionados con el proceso de osteogénesis, los mecanismos exactos a través de los cuales estas moléculas regularían la actividad de las distintas líneas celulares aún no se conocen en profundidad.

En las tablas 1 y 2 podemos observar una relación de los miRNAs descritos en la literatura que actúan en el desarrollo y función de los osteoblastos y osteoclastos^{91,95,161,162}.

Tabla 1. Principales miARNs relacionados con la formación y actividad de los osteoclastos.

OSTEOCLASTOS			
AUMENTAN LA DIFERENCIACIÓN Y/O FUNCIÓN		DISMINUYEN LA DIFERENCIACIÓN Y/O FUNCIÓN	
miARN	Gen diana	miARN	Gen diana
miR-21	<i>FASL, PDCD4</i>	miR-7b	<i>DC-STAMP</i>
miR-29 family	<i>SRGAP2, CD93, GPR85, NFIA, CALCR, CDC42</i>	miR-26a	<i>CTGF/CCN2</i>
miR-148a	<i>MAFB</i>	miR-29b	<i>C-FOS, MMP2</i>
miR-183	<i>HO-1</i>	miR-31	<i>RhoA</i>
miR-214	<i>PTEN</i>	miR-34a	<i>TGIF</i>
miR-223	<i>C/EBP-beta, IKK-alfa, NFIA, FGFR2</i>	miR-124	<i>NFATC1, RHOA, RAC1</i>
miR-9718	<i>PIAS3</i>	miR-125a	<i>TRAF6</i>
		miR-146a	<i>TRAF6, STAT1</i>
		miR-155	<i>MIF, SOCS1</i>
		miR-218	<i>NFATC1</i>
		miR-503	<i>RANK</i>

Tabla 2. Principales miARNs relacionados con la actividad y función de los osteoblastos.

OSTEOBLASTOS			
AUMENTAN LA DIFERENCIACIÓN Y/O FUNCIÓN		DISMINUYEN LA DIFERENCIACIÓN Y/O FUNCIÓN	
miARN	Gen diana	miARN	Gen diana
miR-20a	<i>PPAR-gamma, BAMBI, CRIMI</i>	miR-23a	<i>RUNX2</i>
miR-21	<i>SPRY1, SMAD7</i>	miR-24	<i>RUNX2</i>
miR-27a	<i>APC, MF2C</i>	miR-27a	<i>BMPRI/II</i>
miR-23a-27a- 24-2 cluster	<i>RUNX2</i>	miR-31	<i>OSX, RUNX2, SATB2</i>
miR-29a	<i>DKK1, Kremen2, sFRP2, HDAC4, SPARC</i>	miR-34a	<i>JAG1, cyclin D1, CDK4, CDK6, E2F3, CDC25A</i>
miR-17-29 cluster	<i>BIM, POSTN</i>	miR-100	<i>RUNX2</i>
miR-2861	<i>HDAC5</i>	miR-103a	<i>RUNX2</i>
		miR-122	<i>BMP4</i>
		miR-133	<i>RUNX2</i>
		miR-135	<i>SMAD5</i>
		miR-138	<i>FAK, ERK</i>
		miR-188	<i>HDAC9, RICTOR</i>
		miR-204	<i>RUNX2, TNSALP, SOST</i>
		miR-206	<i>CX43</i>
		miR-210	<i>TCF712</i>
		miR-214	<i>ATF4</i>
		miR-637	<i>OSX</i>
		miR-671	<i>BMPR2, SMAD2/3</i>

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La existencia de una mala calidad ósea resulta un hecho fisiopatológicamente asintomático, hasta que ocurre el evento consecuente que desencadena las manifestaciones clínicas de este estado, que serían las fracturas osteoporóticas de baja energía. Estas lesiones conllevan una considerable morbilidad y mortalidad, por lo que el desarrollo de métodos de estudio que nos permitan mejorar el diagnóstico y la predicción de fracturas en esta patología es de gran importancia.

El origen de la fragilidad ósea es multifactorial y no depende sólo de la cantidad de masa ósea que es el aspecto fundamental que recoge la prueba utilizada como *golden standard* actual para intentar caracterizar la osteoporosis, la densitometría ósea, sino que también depende de la calidad de este tejido que estaría relacionada con la composición ósea y la regulación metabólica de la misma.

En la actualidad, debido a las limitaciones demostradas de la densitometría ósea, carecemos de una prueba de fiabilidad para poder caracterizar esta patología y predecir adecuadamente el riesgo de fractura de baja energía. La investigación de los mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación del metabolismo óseo, pueden ser una de las claves para mejorar la comprensión de esta patología que nos permita encontrar métodos diagnósticos más fiables que los utilizados hasta la actualidad, y así poder predecir de manera más eficaz el riesgo de fractura.

La esclerostina, como molécula relacionada con el metabolismo óseo y la ruta de la Wnt/beta-catenina, y su regulación epigenética, podrían servir como marcador de diagnóstico para la determinación de la calidad ósea, así como los niveles de metilación del gen de la esclerostina. Por otra parte, mediante la determinación de los microRNAs circulantes en plasma, podríamos identificar

firmas epigenéticas que nos permitirán diagnosticar la fragilidad ósea con mayor precisión que las técnicas diagnósticas convencionales.

Como se ha comentado con anterioridad, existe una posible relación entre la patología relacionada con la escoliosis y la osteoporosis, y en particular nos referimos a la escoliosis degenerativa del adulto, pudiendo agravar las fracturas osteoporóticas la deformidad causada por esta enfermedad. Por tanto, las determinaciones epigenéticas podrían servir de conexión entre estas dos patologías y ayudarnos a predeterminar que pacientes podrían ser más susceptibles de sufrir una escoliosis degenerativa, así como aquellos que podrían presentar la misma agravada por fracturas de baja energía y una peor calidad ósea. Estos nuevos biomarcadores epigenéticos nos serían de utilidad para intentar establecer un diagnóstico precoz, plantear seguimientos y tratamientos adecuados y podernos adelantar a un planteamiento quirúrgico con una calidad ósea deficitaria en las posibles intervenciones que puedan necesitar este tipo de pacientes.

El objetivo de este estudio es demostrar como los niveles de esclerostina en suero, así como los mecanismos de regulación epigenética, mediante la metilación del gen SOST podrían servir como marcadores de fragilidad ósea y establecerse como prueba diagnóstica y predictiva de fracturas osteoporóticas con mayor fiabilidad que la densitometría, utilizada actualmente como *golden standar*. Así pues, se intentarán analizar con el mismo fin los niveles de miARNs analizados por técnicas de secuenciación masiva y que podrían estar implicados en el metabolismo óseo.

Por tanto, los objetivos principales del estudio son:

- Determinar si existen diferencias en los niveles de esclerostina entre los pacientes con fragilidad ósea por un lado, y con escoliosis degenerativa por otro, respecto a la población general, y entre ambos grupos.
- Determinar si existe una correlación entre los niveles de esclerostina y vitamina D.
- Determinar si existen diferencias en la metilación del SOST responsable de la producción de la esclerostina entre los pacientes con fragilidad ósea por

un lado, y con escoliosis degenerativa por otro, respecto a la población general, y entre ambos grupos.

- Determinar si los miARNs analizados por secuenciación masiva son capaces de identificar pacientes con fragilidad ósea por un lado, y con escoliosis degenerativa por otro, respecto a la población general, y entre ambos grupos.
- Determinar si los miARNs analizados son capaces de identificar a los pacientes con fragilidad ósea con mayor sensibilidad y especificidad que la densitometría considerada como *golden standar*.
- Determinar si la densitometría ósea es una prueba válida para identificar a los pacientes con fragilidad ósea.

Además de los anteriores, serían objetivos secundarios los siguientes:

- Crear una colección de muestras de sangre y hueso de mujeres osteoporóticas dentro del Biobanco IIS La Fe que estén disponibles para la comunidad científica y contribuya a desarrollar futuros proyectos de investigación.
- Identificar biomarcadores epigenéticos de fragilidad ósea para determinar moduladores epigenéticos implicados en la fisiopatología de la osteoporosis y la escoliosis degenerativa.
- Identificar biomarcadores de detección de calidad ósea que nos permita predecir la resistencia del tejido óseo que nos encontraremos en cada cirugía, para así poder elegir la técnica quirúrgica más adecuada y preparar el material necesario con antelación.
- Mejorar el conocimiento e identificar de manera precoz los pacientes que van a desarrollar una escoliosis degenerativa del adulto.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Tipo de estudio y metodología

Se ha diseñado un estudio descriptivo de casos y controles clínico-molecular en el que comparamos los niveles de esclerostina y la metilación del gen *SOST* (que codifica para la esclerostina), así como la medida de los miARNs circulantes en sangre en mujeres postmenopáusicas con y sin fractura de baja energía, para intentar identificar marcadores de fragilidad ósea. Se estudiará también un tercer grupo con pacientes con escoliosis degenerativa con la finalidad de determinar marcadores epigenéticos basados en microARNs y establecer una relación de esta patología con la osteoporosis.

3.2. Selección de pacientes

El ámbito geográfico del estudio se sitúa en el área de pacientes que cubre el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, el cual es el centro de referencia del Departamento de Salud Valencia La Fe, responsable de la atención médica de 300.000 habitantes.

El grupo de estudio seleccionado para la investigación son mujeres entre 50 y 80 años en etapa postmenopáusica. Para confirmar este estado, todas las pacientes deberían presentar un período de al menos 12 meses de amenorrea y contar con una analítica con unos valores de hormona folículoestimulante (FSH) mayores de $m10\text{ U/L}^{163}$.

A partir de este punto se establecerán tres grupos de estudio:

- *Grupo 1 control:* pacientes con las características descritas y sin fractura de baja energía que acudan a consultas o se sometan a intervenciones programadas de carácter ortopédico. Así pues, la información y captación para el estudio de este grupo de pacientes se llevó a cabo tanto en consultas externas, como en la sección de hospitalización en las pacientes que fueron intervenidas. Este grupo de pacientes se siguió prospectivamente durante 5 años, para corroborar que no habían sufrido una fractura de baja de energía en este período y poder asumir que se trataba de pacientes a considerar con una buena calidad ósea. La paciente OSTEO_C3 sufrió una fractura de baja energía en fémur proximal, por lo que fue excluida del estudio al tratarse de un evento que podría suponer una baja calidad ósea no diagnosticada en el momento de su inclusión.
- *Grupo 2 casos:* pacientes con las características descritas y fractura de baja energía ingresadas para tratamiento quirúrgico de las mismas. Así pues, la información y captación para el estudio de este grupo de pacientes se llevó a cabo en la sección de hospitalización en el momento de la intervención, o del ajuste del tratamiento con corsé en el caso de las fracturas vertebrales tratadas de manera ortopédica.
- *Grupo 3 escoliosis degenerativa del adulto:* pacientes con las características descritas diagnosticadas de escoliosis degenerativa del adulto. Para realizar este diagnóstico la paciente debía contar con un radiografía 30 x 90 de raquis completo con una desviación del eje coronal mayor de 10°, y esta deformidad haberse desarrollado en la edad adulta. La información y captación de este grupo de pacientes se lleva a cabo en consultas externas de la Unidad de Raquis durante la valoración de las mismas.

Como *criterios de exclusión* indicamos situaciones patológicas que pueden alterar el metabolismo óseo :

- a) Haber sufrido en los últimos 6 meses una fractura de alta energía o patológica, ya que alteraría los parámetros del metabolismo óseo.

c) Patologías que alteren la función esquelética: Insuficiencia renal estadio IV o V, patología crónica hepática, patología neurológica severa, patología cardiovascular inestable, patología tumoral, patología crónica gastrointestinal, hipo/hiperparatiroidismo, acromegalia, cushing, hipopituitarismo, EPOC severo, alcoholismo, DM tipo I.

d) Pacientes que tomen medicación que pueda alterar el metabolismo óseo: Fármacos que alteren la coagulación, corticoides (más de 3 meses en cualquier momento o más de 10 días en el último año), terapia anticonvulsionante en el año anterior, hormonas tiroideas, inhibidores de la aromatasa, calcitonina, suplementos de calcio > 1200 mg/d (últimos 3 meses), bifosfonatos, SERM (moduladores de los receptores de estrógenos en el último año), PTH, teriparatida, triazodinedionas (TZD), omeprazol durante más de 10 años.

3.3. Recogida de datos clínicos

En la localización descrita según el grupo, se entrega al paciente y los familiares la “Hoja de información al paciente” donde aparece todo el contenido de la investigación y se resuelven las posibles dudas al respecto, para la correcta comprensión del mismo. El paciente o su representante legal en caso necesario, firman el consentimiento informado aceptado por el Comité Científico y de Ética del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Fe el 10 de marzo del 2016 (Nº 0189).

Se le comunica al paciente que los resultados relevantes de las pruebas realizadas se le comunicarán en visitas posteriores o se contactará telefónicamente con el paciente en caso necesario.

Los datos recogidos son los siguientes:

Datos clínicos

Obtenidos mediante una entrevista. exploración al paciente y revisión de su historia clínica:

- Edad
- Sexo
- Altura expresada en centímetros
- Peso expresado en kilogramos
- Índice de masa corporal (IMC) según la clasificación de la OMS¹⁶⁴.
Se considerará bajo peso valores de IMC por debajo de 18.5 kg/m², normal entre 18.5 y 24.9 kg/m², sobrepeso entre 25 y 29.9 kg/m², obesidad tipo I entre 30 y 34.9 kg/m², obesidad tipo II entre 35 y 39.9 kg/m² y obesidad tipo III valores mayores de 40 kg/m².
- Localización de la fractura de baja energía

3.3.1. Determinación de densitometría ósea

Se realiza la solicitud en el momento de la entrevista inicial al paciente para la realización de la técnica DEXA determinando tanto los datos del T- score como del Z-score en la localización de columna lumbar y fémur proximal. Se considerarán valores de osteoporosis aquellos menores de -2.5DS, de osteopenia aquellos entre -1DS y -2.5 DS y valores normales los superiores a -1 DS ⁶. Además, se agruparán las pacientes como densitometría patológica, si sus valores son compatibles con osteoporosis, y densitometría no patológica si sus valores son normales o compatibles con osteopenia⁸.

La densidad mineral ósea se evaluó mediante absorciometría dual por rayos X (DXA), empleando para ello el equipo modelo Hologic Horizon W. El aparato se calibra a diario con fantoma, no permitiendo la realización de pruebas hasta que no se realiza este proceso.

Este densitómetro utiliza radiografías digitales cuantitativas para medir de forma exacta y rápida el área en cm^2 , el contenido mineral óseo (CMO) en gramos y la DMO en gr/cm^2 . En nuestro estudio hicimos mediciones en columna lumbar (vértebras L1 a L4) y fémur proximal (cuello, trocánter y triángulo de Ward). La precisión de la medida fue superior al 1% (CV = 1,0% con DMO = 1,0 gr/cm^2). El tiempo de realización de la prueba es de 41 segundos en columna lumbar y 60 segundos en fémur proximal.

Datos analíticos

Se extrae una muestra de sangre periférica que se envía para estudio bioquímico al laboratorio del hospital para la determinación de:

- CTX-I (Telopectidos C-terminal de colágeno tipo I) (valores referencia <0.70 nanogramos/mL)
- P1NP (Propéptido amino-terminal de procolágeno tipo I) (valores de referencia: 27-127,60 nanogramos/mL)
- Fosfatasa alcalina (valores de referencia: 35-104 U/L)
- 25(OH) vitamina D (valores de referencia¹⁶⁵: deficiencia si valores menores de 20 ng/ml, insuficiencia si valores entre 20-29.9 ng/ml y suficiencia si valores iguales o superiores a 30 ng/ml)
- Hormona paratiroidea (PTH) (valores de referencia 15-65 picogramos/mL)
- Hormona folículoestimulante (FSH) (valores de referencia menopausia 12-135 mU/mL)

Datos de laboratorio

Una muestra del contenido de sangre periférica extraído para el estudio bioquímico se remite al Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, para su almacenamiento y posterior utilización para la determinación de parámetros epigenéticos.

En esta institución se realizó la apertura de la colección ``RAQUIS`` con la subcolección ``OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA CON FRACTURA PATOLÓGICA``, donde se almacenan muestras de casos control, casos con

fractura patológica, así como otro tipo de patologías relacionadas como la escoliosis degenerativa.

Durante la visita inicial, al paciente se le informará sobre el procedimiento de almacenamiento en Biobanco, con entrega y explicación de una hoja informativa, y el paciente, testigo o representante legal firmarán tres copias del consentimiento informado sobre este almacenamiento, una será para el Biobanco, otra para el paciente y la última quedará en la historia clínica hospitalaria.

Así pues, se enviarán al Biobanco 4 tubos de EDTA con sangre periférica de cada paciente, de los cuales dos de ellos se destinarán para la obtención de plasma y ADN y dos para el aislamiento de PBMCs (peripheral blood mononuclear cells/células mononucleares de sangre periférica).

Para el procesamiento del plasma, se realizará un doble centrifugado de dos tubos de EDTA a 1800g durante 10 min a 20-25°C y 2000g durante 5 minutos a 20-25°C. Se guardarán 4 alícuotas de 500 microlitros del sobrenadante de plasma obtenido de estas centrifugaciones a -80°C.

Al contenido restante tras la obtención del plasma se le añadirán 10mL de tampón de lisis de eritrocitos. Se agitará, se dejará incubar 10 min y se centrifugará a 1800g durante 10 minutos a 20-25°C. Tras este procedimiento se desechará el sobrenadante y se resuspenderá el pellet celular en unos 200microlitros de PBS para la extracción del ADN y su conservación en dos alícuotas.

Los dos tubos de EDTA con sangre periférica restantes se utilizarán para la obtención de los linfocitos y las células PBMCs como hemos indicado anteriormente. Tras la homogenización del contenido de los mismos, estos se verterán en un tubo LeucosepR®, preparado previamente y destinado a esta finalidad. Se realizará una centrifugación a 600g durante 15 minutos a 18°C y sin frenos. Se aspira con cuidado el contenido celular y se vierte en un tubo tipo FALCON R donde se añadirá PBS hasta la línea de 10mL, y se homogenizará su contenido cuidadosamente para su posterior centrifugación a 300g durante 10 minutos a 20-25°C con frenos. Se eliminará el sobrenadante resultante y se añadirán 200 microlitros de PBS para la disolución del botón celular.

El contenido resultante de linfocitos y PBMCs se distribuirá en dos criotubos con 100 microlitos de este material en cada uno. A este contenido se le añadirá una disolución formada por 900 microlitros de MC y 100 microlitros de DMSO. Estos criotubos resultantes se conservarán a -80°C en contenedor de isopropanol durante 24h, tras este tiempo de almacenamiento se cambiarán los tubos de suspensión celular en un tanque de nitrógeno líquido para su conservación a -196°C.

Así pues, siguiendo este procedimiento quedará almacenado plasma, ADN y PBMC de cada paciente para su posterior utilización para esta u otras investigaciones u otros procesos diagnósticos en los que pueda ser de utilidad.

3.3.2. *Análisis de los resultados y correlaciones estadísticas*

Para el análisis de los datos clínicos cuantitativos se ha realizado un análisis descriptivo en el cual se ha calculado la media y la desviación típica, y el rango.

A continuación, se analizará si hay diferencias significativas de alguna de las variables anteriores, tanto cuantitativas como cualitativas, entre los diferentes grupos. Para poder saber que test estadístico hay que utilizar, lo primero que se realizará será hacer test de normalidad para cada variable, para este análisis de utilizó el test de Shapiro-Wilk al ser una $n < 50$. Todas las variables (menos la 25OH-VitD) se distribuyen normalmente. Por lo tanto, usaremos la t de student para las variables cuantitativas paramétricas y para la VITD usaremos la U de Mann Whitney. Para las variables cuantitativas usaremos la χ^2 o el test de Fisher. Se considerarán diferencias estadísticamente significativas con un p valor de 0.05.

3.4. Fase de laboratorio

3.4.1. Medidas de esclerostina

3.4.1.1. Generalidades del ensayo basado en la técnica ELISA

Para la realización de la medición de la esclerostina mediante el uso de kits comerciales, Sclerostin (SOST) ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante.

Para este análisis se seleccionaron las siguientes muestras depositadas en el Biobanco del IIS La Fe:

- 10 pacientes del grupo de casos: OSTEO_1, OSTEO_2, OSTEO_3, OSTEO_4, OSTEO_5, OSTEO_6, OSTEO_7, OSTEO_8, OSTEO_9, OSTEO_10.
- 5 pacientes del grupo de escoliosis degenerativa: OSTEO_E2, OSTEO_E3, OSTEO_E4, OSTEO_E5, OSTEO_E6.
- 11 pacientes del grupo de controles: OSTEO_C1, OSTEO_C2, OSTEO_C4, OSTEO_C5, OSTEO_C7, OSTEO_C8, OSTEO_C9, OSTEO_C10, OSTEO_C11, OSTEO_C12, OSTEO_C13.
-

3.4.1.2. Análisis de los niveles mediante el inmunoensayo SOST ELISA kit

La medida de esta proteína en suero y en las biopsias óseas se realizará con el Sclerostin (SOST) ELISA Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS, USA), según las instrucciones del fabricante. El análisis consiste en un ensayo ELISA tipo sándwich en el que se utiliza una placa que lleva impreso el anticuerpo primario de captura de la esclerostina a la placa (Human Sclerostin Antibody Coated Wells), junto con un anticuerpo que reconoce otro epítipo de la esclerostina (Human Sclerostin Biotin Conjugate) y que está ligado a una molécula de biotina que posteriormente es reconocida por una estreptavidina conjugada a la peróxidasa HRP.

Brevemente, el plasma se ha de descongelar en hielo y a continuación proceder a la dilución 1/5 del plasma con Assay diluent 1X.

La preparación de los estándares que permitirán realizar un calibrado se realiza añadiendo 400 µl del Assay *diluent* 1X al vial liofilizado para preparar una solución estándar de 50 ng/ml. Tras disolver el polvo mezclando suavemente, se agregaron 100 µL de estándar SOST del vial reconstituido a un tubo con 400 µL Assay *diluent* 1X para preparar una solución estándar de 10,000 pg/mL. A continuación, se procede a realizar disoluciones seriadas para obtener distintas diluciones en el calibrado consistentes en Std1 10000 pg/mL; Std2 4000 pg/mL; Std3 1600 pg/mL; Std4 640 pg/mL; Std5 256 pg/mL; Std6 102.4 pg/mL; Std7; 40.96 pg/mL Blank 0 pg/m. Se usó el Assay *diluent* 1X como el estándar cero (0 pg/mL).

Por otro lado, se ha de preparar la disolución de streptavidina-HRP mediante la dilución de Streptavidin-HRP 500-fold con 1X Assay *Diluent*.

Una vez preparadas las disoluciones se procede a añadir 100 µl de los estándares y de las muestras en la placa ELISA y se deja a 4 °C toda la noche. Al día siguiente se procedió al lavado de la placa con 1X Wash Buffer, cuatro veces. A continuación, se añadieron 100 µl del preparado del conjugado de biotina y se dejó en agitación durante 1 h. Tras descartar el sobrenadante, la placa se incubó con 100 µl de la disolución de streptavidin-HRP y se dejó incubar por otros 45 min a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se procedió al lavado por triplicado con 300 µl de 1X Wash Buffer. Finalmente se añadieron a la placa 100 µl de solución de reactivo TMB y se incubó en oscuridad por 30 min. Tras este tiempo de incubación con el reactivo de color se procedió a parar la reacción con la *Stop Solution* para leer a continuación la absorbancia de la placa ELISA a la longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro SpectraMAX Plus 384 (Medical Devices, Malmö, Sweden).

3.4.1.3. Análisis de los resultados y correlaciones estadísticas

A continuación, se procedió a registrar los valores de Absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro SpectraMAX Plus 384 (Medical Devices, Malmö, Sweden) y se descargaron los datos en formato Excel. Se construyó una curva de Abs (450 nm) vs. concentración de esclerostina Std (pg/mL) y se procedió a la obtención de la recta mediante ajuste lineal. Los valores de absorbancia para las muestras de

plasma de los sujetos de estudio se interpoló en la recta de calibrado para obtener las concentraciones correspondientes en pg/mL.

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre grupos se realizó un test ANOVA, considerando que existían las mismas si presentaban un p valor menor a 0,05. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando GraphPad Software v9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

3.4.2. Estudio de la metilación del gen SOST mediante tecnología Sequenom (EpiTYPER®)

3.4.2.1. Solicitud de muestras de ADN a biobanco. Generalidades del procedimiento de purificación del ADN

Se realizó una solicitud de muestras de ADN al biobanco del IIS La Fe de la colección ``RAQUIS`` con la subcolección ``OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA CON FRACTURA PATOLÓGICA``. El ADN se resuspendió en tampón TE LOW EDTA, 10mM TRIS y 0,1mM EDTA-Ref. 75793 (USB®).

3.4.2.2. Generalidades del ensayo EpiTyper MassArray (Sequenom)

La tecnología MassARRAY EpiTYPER (Sequenom, Inc.) combina la escisión específica de bases con el análisis por espectrometría de masas mediante la tecnología de MALDI-TOF (Fig.7). La determinación de la metilación del ADN mediante la técnica EpiTyper MassArray comienza con el tratamiento del ADN genómico con bisulfito sódico, seguido de una amplificación por PCR en la cual se ha introducido una diana del promotor de la polimerasa T7. Posteriormente, este promotor se utiliza para realizar una transcripción *in vitro* a ARN sobre la cadena reversa que produce la incorporación del nucleótido desoxicitidina monofosfato, dCMP. El ARN que se obtiene de la transcripción es tratado a continuación con RNasa A (específica de pirimidinas que corta la secuencia diana específicamente en la base de uracilo (U) ya que durante la transcripción ha incorporado dCMP en

el ARN producto de la transcripción. Los productos generados durante escisión con RNasa A, que contienen uno o más sitios CpG, se denominan unidades analíticas CpG. Estos fragmentos difieren en tamaño y en masa debido a su composición en nucleótidos, generando un patrón de señales para el DNA metilado y el no metilado que es analizado y cuantificado con el sistema MassARRAY. Las diferencias en el perfil de metilación del ADN se deben a los cambios en la secuencia de nucleótidos después del tratamiento con bisulfito, ya que si la citosina no está metilada se producirá una desaminación que dará lugar a un U y que tras la reacción de PCR generará una timina (T), pero si la citosina está metilada (5-metilcitosina, 5-mC), el bisulfito no puede actuar y por lo tanto esta base se mantiene como C tras la reacción de PCR. En consecuencia, darán diferentes masas en los fragmentos. La abundancia de cada fragmento (nivel de señal/ruido en el espectro) es indicativa de la cantidad de metilación del ADN en la secuencia analizada.

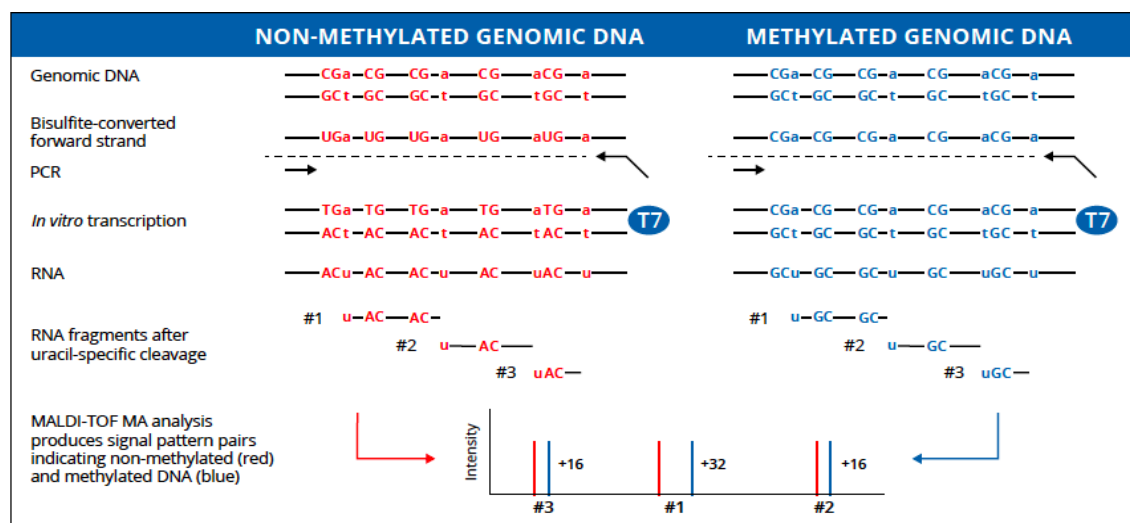


Figura 7. Análisis de la metilación por escisión específica de bases y espectrometría de masas MALDI-TOF. El ADN genómico es tratado con bisulfito y amplificado por PCR utilizando cebadores que incluyen la secuencia promotora T7. El tratamiento con la fosfatasa SAP neutraliza los nucleótidos no incorporados. El producto de PCR es transcrito y escindido específicamente en las bases U por la RNasa A. Los fragmentos resultantes son analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF para calcular su grado de metilación (%) (<http://www.sequenom.com>).

3.4.2.3. Diseño de amplicones para el estudio de metilación

Los cebadores utilizados se diseñaron con el software SEQUENOM® EpiDesigner BETA (www.epidesigner.com). Los cebadores reversos tienen incorporada la secuencia del promotor de la polimerasa T7 [5' CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCT-3'] y los cebadores directos una secuencia de 10 nucleótidos para equilibrar la PCR [AGGAAGAGAG]. Estos cebadores son independientes del estado de metilación del ADN a analizar (Fig. 8).

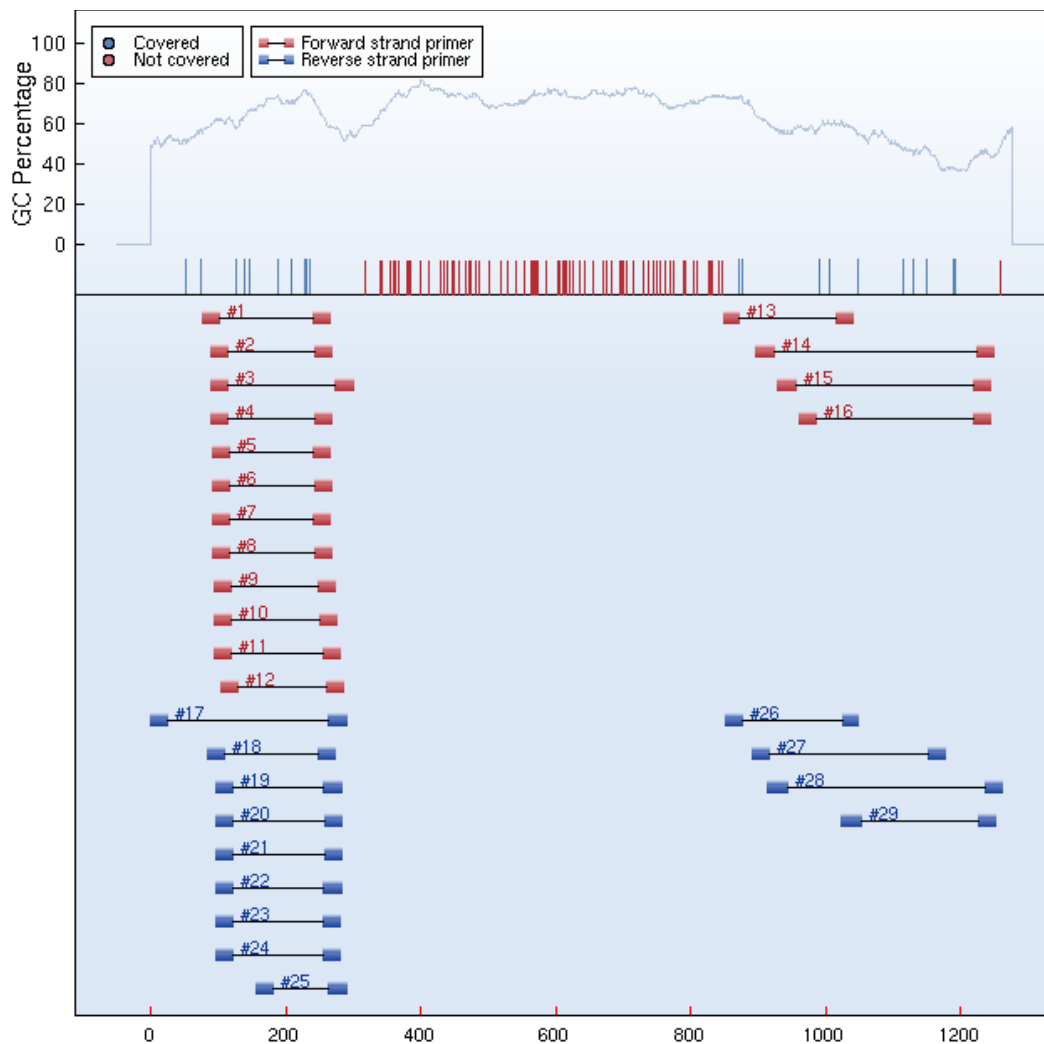


Figura 8. Diseños de los cebadores obtenidos con el software epidesigner para la región de estudio del gen de la esclerostina (SOST) Los cebadores seleccionados fueron los correspondientes a los cebadores 17 y 28 que son los que más información dieron sobre los sitios CpG de la cadena reversa.

Para el gen SOST se amplificaron las regiones SOST-17 y SOST-28. Los cebadores utilizados, el tamaño de las regiones amplificadas y los sitios CpG que comprenden se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cebadores, tamaño de las regiones amplificadas y sitios CpG para la amplificación de las regiones SOST-17 y SOST-18.

	Primer	Start	Size	Tm	GC%	C's	Sequence
☐	17 LEFT PRIMER	292	25	59.82	36	7	AAATGTTTGTAAATTTAGGGTAGGGG
	RIGHT PRIMER	1	28	60.06	25	4	AAAAAATCTTATCCAACCTTCTTAACCA
	PRODUCT Size: 292, No of CpG's : 10, Coverage : 9						
☐	28 LEFT PRIMER	1262	30	57.36	27	4	GGTATAAGTGTGGTTTAAATTATAAGAAGA
	RIGHT PRIMER	916	25	60.14	36	5	TCTCCAAAACTTTTACCCCTAAAC
	PRODUCT Size: 347, No of CpG's : 8, Coverage : 7						

3.4.2.4. Tratamiento de las muestras con Bisulfito

Para este análisis se seleccionaron las siguientes muestras depositadas en el Biobanco del IIS La Fe:

- 10 pacientes del grupo de casos: OSTEО_1, OSTEО_2, OSTEО_3, OSTEО_4, OSTEО_5, OSTEО_6, OSTEО_7, OSTEО_8, OSTEО_9, OSTEО_10.
- 5 pacientes del grupo de escoliosis degenerativa: OSTEО_E2, OSTEО_E3, OSTEО_E4, OSTEО_E5, OSTEО_E6.
- 11 pacientes del grupo de controles: OSTEО_C1, OSTEО_C2, OSTEО_C4, OSTEО_C5, OSTEО_C7, OSTEО_C8, OSTEО_C9, OSTEО_C10, OSTEО_C11, OSTEО_C12, OSTEО_C13.

El análisis se inició tratando 500 ng de ADN genómico purificado de los leucocitos con bisulfito sódico, utilizando EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research), según las instrucciones del fabricante.

3.4.2.5. Amplificación por PCR y transcripción *in vitro*

La reacción de amplificación por PCR se realizó en placas de 96 pocillos, con un volumen final en cada uno de 15 µl conteniendo 20 ng de ADN modificado con bisulfito, 1 X FastStart PCR Master (Roche) y 0,4 µM de cada cebador. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización (95°C durante 10 min), 5 ciclos de amplificación (95°C durante 10 s, temperatura de apareamiento de cebadores 1 durante 30 s y 72°C durante 2 min); 35 ciclos adicionales de amplificación (95°C durante 10 s, temperatura de apareamiento de cebadores 2 durante 30 s, y 72°C durante 1 min 30s) y 1 ciclo de extensión final (72°C durante 7 min). Para la región WDR3-1, la temperatura de apareamiento de cebadores 1 fue 54°C y la temperatura de apareamiento de cebadores 2, 58°C. Para las regiones WDR3-2 y TBX15-1 las temperaturas de apareamiento de cebadores 1 y 2 fueron 58°C y 62°C, respectivamente. Para reducir la variabilidad de la cuantificación de la metilación debida a la PCR ¹⁶⁶ se realizaron dos réplicas de amplificación para cada una de las muestras. La amplificación fue comprobada en gel de agarosa 1% utilizando la tinción GelRed™ (Biotium).

El producto de la PCR es a continuación fue sometido a una reacción de desfosforilación. Para ello, se agregaron 2 µl de la enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) cada 5 µl del producto de amplificación para desfosforilar los dNTPs no incorporados durante la reacción de PCR. En este proceso, las muestras se incubaron a 37°C durante 20 min, seguidos de 5 min a 85°C.

Tras la reacción de desfosforilación, se procedió a la reacción de transcripción *in vitro* y escisión con RNasa A. Para ello, se preparó una mezcla de producto de transcripción/RNasa A para una placa de 384 pocillos con un volumen final de 5 µl por pocillo. La mezcla de reacción contiene 0,64X de buffer de polimerasa T7; 3,14 mM de DTT; 22 unidades de polimerasa T7 y 0,09 mg/ml de RNasa A. En una nueva placa se colocaron 2 µl de las muestras PCR/SAP y se agregaron 5 µl de la mezcla transcripción/RNasa A, se centrifugó la placa de PCR durante 1 min y a continuación se incubó a 37°C durante 3 h.

Tras el proceso de incubación se procedió al acondicionamiento de las muestras para el análisis con el MassArray. Se agregaron 20 µl de H₂O libre de RNasa a cada pocillo de la placa de 384 y 6 mg de resina de limpieza Clean Resin. A continuación, se dejó la placa en rotación durante 10 min y se centrifugó 5 min a 3200 x g.

3.4.2.6. *Análisis de la metilación con EpiTYPER MassArray®*

Con el sistema nanodispensador MassARRAY® Nanodispenser se transfirieron 10 nl de los productos de reacción en el bioarray SpectroCHIP®. El espectro de las reacciones de escisión es captado por el sistema MALDI-TOF MassARRAY®. A continuación, los resultados son analizados con el software EpiTYPER y volcados a una tabla Excel mostrando para cada CpG analizada un porcentaje de metilación, con una precisión en el cambio de grado de metilación de hasta un 5%.

3.4.2.7. *Análisis estadístico de los resultados de metilación del gen SOST*

En primer lugar se realizó un análisis de correlación de Spearman para identificar si entre las CpGs dentro de un mismo existía una relación esto es, comprobamos si existía una correlación positiva (si aumenta la metilación de una CpG, aumenta también la metilación de alguna otra CpG dentro del mismo amplicón) o negativa (la disminución del nivel de metilación de una CpG se correlaciona con el aumento de otra CpG dentro del mismo amplicón).

Para establecer si existe una diferencia estadísticamente significativa en el grado de metilación de los CpGs o grupos de CpGs analizados en cada amplicón del gen *SOST*, realizamos los tests ANOVA, Kruskal-Wallis, Kruskal-Wallis con ajuste posthoc de Neyemeni y Kruskal-Wallis con ajuste posthoc de Dunn con los p-valores ajustados mediante Bonferroni. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando GraphPad Software v9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

3.4.3. Estudio de expresión diferencial de miARNs por secuenciación masiva smallRNA-seq

3.4.4. Obtención de los miARNs de plasma de pacientes.

3.4.4.1. Generalidades del procedimiento de purificación de miARNs

Para la obtención de los miARNs de plasma de pacientes y controles se utilizó el “miRNAeasy serum/plasma kit” de Qiagen (Qiagen, Thermofisher, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron un total de 400 µL de plasma para la extracción, obteniendo un volumen de elución de 25 µL de miARN con agua libre de ARNasa.

La cantidad de miARNs totales purificados del plasma se evaluó mediante el sistema NanoDrop One (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) y la calidad mediante la microfluidica Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EEUU).

3.4.4.2. Construcción de librerías de secuenciación

La tecnología NGS permite la secuenciación de millones de fragmentos de ADN basándose en la amplificación y lectura en paralelo de millones de secuencias.

La secuenciación de los miARN se realizó mediante los protocolos de Illumina y en la la Unidad Central de Investigación de Medicina (UCIM).

Se utilizaron un total de 12 muestras para la secuenciación, consistentes en muestras de sujetos control (n = 4, OSTEO_C1, OSTEO_C2, OSTEO_C8 y OSTEO_C13), pacientes con osteoporosis (n = 4, OSTEO_1, OSTEO_2, OSTEO_9 y OSTEO_10) y pacientes con escoliosis degenerativa (n = 4, OSTEO_E2, OSTEO_E3, OSTEO_E4 y OSTEO_E6).

Para generar las librerías se utilizarán los kits “TruSeq™ Small RNA Sample Prep Kit” (Illumina), que permiten la secuenciación multiplexada con la introducción de 48 índices únicos. La preparación de las muestras se realizó según las indicaciones del fabricante, junto con un paso extra que consistía en la purificarán de las regiones de los miRNAs de las librerías mediante el sistema

Pippin (purificación por tamaños en gel). Este paso permitió concentrar la cantidad disponible de miARN. Para ello, se utilizaron geles sin bromuro y seleccionando tamaños entre 140 y 170 bp, lo que permite la eliminación de los primer-dimer y la secuenciación de ARNs pequeños que no son microRNAs. Se realizó una secuenciación de 50 bp de tipo single-end, en el secuenciador NextSeq 550 (Illumina, EE.UU.).

3.4.4.3. Estudio bioinformático de la expresión de los miARNs obtenidos por secuenciación masiva NGS

En primer lugar, se realizó un control de calidad de los datos en crudo obtenidos tras el procedimiento de secuenciación. Este control de calidad permitió evaluar posibles contaminaciones por rARN (ARN ribosomal), evaluar la necesidad de eliminar bases que tenían baja calidad e incluso la identificación de los adaptadores usados durante el proceso de secuenciación.

Tras este primer análisis se eliminaron los adaptadores y en caso de ser necesario se hizo un filtrado de las secuencias por tamaño y calidad. Posteriormente se realizó un nuevo control de calidad, con el fin de comprobar que las acciones anteriores, no hubiesen provocado una pérdida significativa de la calidad y no se hubiese introducido un sesgo en el procedimiento de análisis bioinformático. Los programas utilizados en este preprocesamiento de las muestras, eliminación de los adaptadores y análisis de la calidad fueron FastQC (<http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) y Cutadapt (<http://cutadapt.readthedocs.org/en/stable/>)^{167,168}.

Aquellas lecturas que superaron los criterios de calidad impuestos, fueron alineadas frente al genoma humano de referencia GRCh38 tomada del UCSC (University of California Santa Cruz) mediante el paquete Subread. A continuación, se cuantificaron las lecturas correspondientes a miARNs maduros mediante el paquete RSubread con la ayuda de la base de datos del miRBase v21, obteniendo como resultado una tabla con tantas filas como miARNs maduros, y tantas columnas como muestras. Tomando esta matriz de datos como referencia, se realizaron los estudios de expresión diferencial de los microARNs. Se compararon cada uno de los tres grupos de forma independiente, que eran los grupos

osteoporosis (OSTEO), escoliosis degenerativa (OSTEO_E) y grupo control (OSTEO_C). Para el análisis estadístico, dada la distribución no normal y característica de la expresión de miRNA y el experimento de conteo de reads entre grupos experimentales (distribución binomial negativa), para el análisis de expresión diferencial entre los grupos se usó el paquete DESeq (Bioconductor), que usa un modelo binomial negativo para diferenciar entre la varianza de las réplicas y varianza entre experimentos ¹⁶⁹.

3.4.4.4. Análisis de sobrerrepresentación ORA y enriquecimiento de rutas biológicas KEGG implicadas en la fisiopatología de la osteoporosis y la escoliosis degenerativa

Para la identificación de rutas moleculares relevantes en el contexto de la fisiopatología de la osteoporosis y escoliosis degenerativa, se realizó un análisis de sobrerrepresentación génica (ORA) utilizando los genes diana de los 19 miARNs expresados diferencialmente. Un análisis ORA se basa en encontrar rutas moleculares en las que un conjunto de genes que participan en estas rutas moleculares se ven alterados por el efecto de los miARNs que se han incluido en el análisis. Para ello, se ha utilizado el paquete de análisis bioinformático denominado clusterProfiler en R y se ha empleado un p valor de 0.05.

Paralelamente, a partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los miARNs en base a las rutas relacionadas con mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos (KEGG o Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) relacionadas con la fisiopatología de la osteoporosis y escoliosis degenerativa.

Se empleó la herramienta DIANA TOOLS para este fin (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=site/index>). Finalmente, se seleccionaron aquellas rutas biológicas KEGG que se encontraron enriquecidas.

Desde el enfoque tomado para el presente proyecto de investigación, primero se utilizó DIANA-microT-CDS, al que se accede desde el servidor web DIANA v5.0 (143). Esta herramienta muestra si el gen diana también es predicho por miRanda o TargetScan, o si fue previamente validado experimentalmente en

TarBase v7.0, mediante la utilización de los siguientes parámetros predeterminados: interacciones experimentadas con apoyo de DIANA TarBase v.7.0, un umbral de valor p de 0.001 y un umbral microT de 0.8. Para reducir el número de objetivos de miRNA falsos positivos, se aplicó una corrección de tasa de descubrimiento falso [False Detection Ratio (FDR)] para seleccionar las rutas KEGG. El algoritmo utilizado en este análisis consistió en una prueba exacta de Fisher de una cola. Además, se llevó a cabo un análisis de sobrerrepresentación (ORA) de los genes diana de los miARNs con expresión diferencial. El análisis ORA se basa en encontrar rutas en un conjunto de genes atendiendo al número de genes del conjunto que están involucrados en las rutas, en comparación con el ratio de genes involucrados en estas rutas en el total de genes del organismo. Para ello, se utilizó el paquete clusterProfiler en R y se ha empleado un p valor de corte de 0.05.

3.4.5. *Análisis de validación de los miARNs por RT-qPCR.*

Se analizaron los niveles de miARNs circulantes en plasma utilizando una cohorte de validación en pacientes con fractura de baja energía (n=27), pacientes con escoliosis degenerativa (n=9) y un grupo control (n=30) mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

3.4.5.1. *Generalidades del ensayo de RT-qPCR*

Para el análisis de los miARNs relacionados con el metabolismo óseo y específicamente en la escoliosis se utilizó la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) con el uso de ensayos TaqMan® small RNA assays en un equipo HT7900 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems).

El método de cuantificación de los miARNs por RT-qPCR mediante la tecnología “stem loop” implica dos pasos (Fig. 9):

- 1) la retrotranscripción del miARN a cADN: usando sondas específicas tipo horquilla (“stem loop”) que se unen al extremo 3’ del miARN y la enzima

transcriptasa reversa que retrotranscribe el miARN a una copia de ADN complementario (ADNc).

2) la amplificación de este cADN: por qPCR con unos cebadores (primers Forward y Reverse) y una sonda específica del miARN estudio ¹⁷⁰ (Figura x).

La tecnología “stem loop” permite la unión específica de los cebadores al miARN y evita uniones no específicas a otros ARNs no diana, por lo que el método aporta una mayor especificidad.

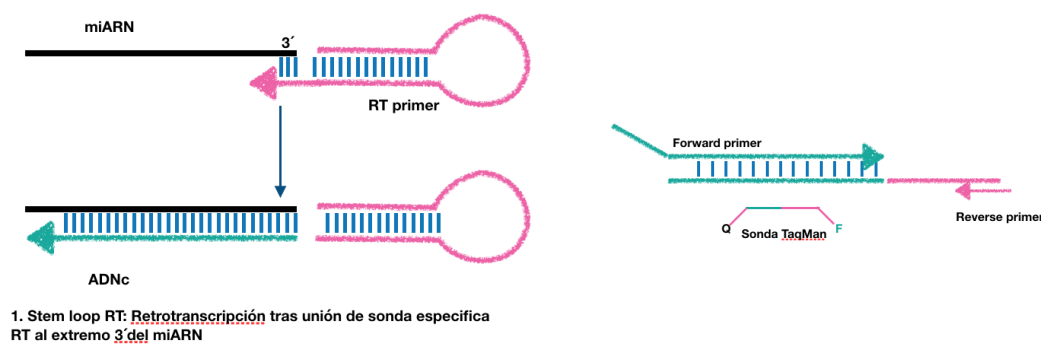


Figura 9. Esquema representativo de una reacción de RT-qPCR basado en la química basada en “stem-loop” para la retrotranscripción de los miARNs. Tras la retrotranscripción del miARN específico y su conversión a cADN, es posible realizar una reacción de PCR usando un par de cebadores específicos (reverse and forward) y una sonda TaqMan para cuantificar de forma relativa la expresión de un miARN específico.

3.4.5.2. Procedimiento experimental de análisis de expresión por RT-qPCR

El ARN se sometió a un paso de transcripción inversa usando la tecnología del steem loop de Life Technologies para obtener ADNc. Se utilizó el kit TaqMan miRNA Reverse Transcription kit, miRNA-specific stem-loop primers (Part No. 4366597, Applied Biosystems, Inc.; actualmente ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando 100 ng de input de ARN en 20 µL de volumen final de reacción de RT (Tabla 4).

Las condiciones de la retrotranscripción comprendían una etapa de incubación inicial a 16°C durante 30 minutos, para permitir el anillamiento de los cebadores;

seguido por una etapa a 42°C durante 30 minutos, para producir la síntesis de ADNc; y una etapa final de 95°C durante 5 minutos para una inactivación final.

Tabla 4. Diferentes componentes utilizados y sus cantidades en la retrotranscripción de los miARN a ADNc.

COMPONENTES RT-PCR	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN (10 µL)
<i>Pool de cebadores (5x)</i>	0.2x	0,4 (de cada primer)
<i>Mix de dNTP 100 mM</i>	2 mM	0.2
<i>Buffer RT 10x</i>	1x	1
<i>Transcriptasa Reversa 50 U µL</i>	100 U	2
<i>H₂O</i>	v.s.p 10 µL	V
<i>Inhibidor RNAasa 20 U µL</i>	0.25	0.125
<i>Muestra ARN</i>	100 ng	V

Una vez obtenido el ADNc, se procedió a analizar la expresión génica por medio de la qPCR utilizando un sistema ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.). Para el análisis de expresión génica se utilizaron cebadores específicos para humano de cada gen de interés, los miARNs analizados se muestran en la tabla 5 (ThermoFisher Scientific, Nueva York, EE.UU.) además del uso de un gen de referencia endógena se utilizó el hsa-miR-191-5p.

Tabla 5. miARNs seleccionados para la validación de miARNs circulantes en grupo de pacientes con fractura de baja energía, y en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa.

NOMBRE DE miARN	SECUENCIA MADURA	NÚMERO DE ACCESO	TaqMan Small RNA Assays
hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	MIMAT0000421	002245
hsa-mir-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	MIMAT0000132	000436
hsa-miR-185-3p	AGGGGCUGGCUUUCUCUGGUC	MIMAT0004611	002104
hsa-miR-215-5p	AUGACCUAUGAAUUGACAGAC	MIMAT0000272	000518
hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	MIMAT0000440	002299

Las condiciones de la RTq-PCR fueron: Un primer paso de 95°C durante 10 minutos, para la activación de la Taq-Polimerasa; seguido por 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Cada muestra se analizó por triplicado, y la cuantificación relativa de los genes se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 6. Compuestos y cantidades utilizadas en la medición de la expresión génica por PCR en tiempo real.

COMPONENTES qPCR	CANTIDAD (μL)
<i>TaqMan Small RNA assays (20x)</i>	0.5
<i>TaqMan UniversalMaster Mix 2x</i>	5
<i>H₂O</i>	3.5
<i>Muestra de la RT-PCR</i>	1
<i>Volumen Final</i>	10

3.4.5.3. Análisis de los resultados y correlaciones estadísticas

Todos los ensayos se realizaron con triplicados técnicos de cada una de las muestras de interés. Los resultados, representan la media $\pm$ desviación estándar (SD) de todas las réplicas. La prueba U de Mann-Whitney se aplicó para evaluar la significación estadística al comparar los resultados obtenidos para los diferentes grupos. Los valores de p se representan de la siguiente forma: **** p-valor < 0.0001, *** p-valor < 0,001, ** p-valor < 0.01 o * p-valor < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Las barras de error dentro de los gráficos son representativas de la desviación estándar de las muestras replicadas. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando GraphPad Software v9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de las medidas de esclerostina y la metilación del gen SOST

4.1.1. Descripción de la muestra.

En este apartado se analizaron 10 pacientes con fractura de baja energía, 5 pacientes con escoliosis degenerativa y 11 controles.

4.1.2. Descripción clínica.

La edad media de los pacientes del grupo de casos con fractura de baja energía fue de 64.40 ± 6.93 años (rango 57-79 años), en el grupo de escoliosis degenerativa la edad media fue de 66.20 ± 7.5 años (rango 58-76 años) y en controles de 64.64 ± 5.22 años (rango 56-72 años). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Respecto al IMC la media fue de 22.65 ± 4.24 (rango 20.58-32.66) en el grupo de casos, 27.27 ± 4.61 (rango 24.61-35.42) en el grupo de escoliosis degenerativa y 27.51 ± 3.56 (rango 22.22-32.87). En el grupo de casos, 5 pacientes fueron clasificados como IMC normales, 3 como sobrepeso y 2 como obesidad tipo I. En el grupo de escoliosis degenerativa, 2 pacientes fueron clasificados como IMC normales, 2 como pacientes con sobrepeso y 1 paciente con obesidad tipo II. En el grupo de controles, 3 pacientes fueron clasificados como IMC normales, 4 como sobrepeso y 4 como obesidad tipo I y en un paciente no se analizó este dato. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

En el grupo de casos, 5 pacientes presentaron fractura vertebral, 4 fractura de radio distal y en un paciente fractura de fémur proximal.

En cuanto a la presencia de diabetes mellitus tipo 2 como patología asociada, sólo apareció en dos casos del grupo control.

Las características clínicas descritas se reflejan en la tabla 7.

Tabla 7. Datos clínicos sobre la edad, antropométricos, de localización de la fractura y el diagnóstico de DM2 en los pacientes estudiados.

	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N=10	MEDIA (DE)	RANGO	N=5	MEDIA (DE)	RANGO	N=11	MEDIA (DE)	RANGO
EDAD (años)	10	64,4 (6,93)	22 (57-79)	5	66,20 (7,50)	18 (58-76)	11	63,64 (5,22)	16 (56-72)
ANTROPOMETRÍA									
IMC (kg/m²)	10	25,65 (4,24)	12,08 (20,58- 32,66)	5	27,27 (4,61)	10,81 (24,61- 35,42)	10	27,51 (3,56)	10,65 (22,22- 32,87)
CLASIFICACIÓN IMC									
BAJO PESO	0			0			0		
NORMAL	5			2			3		
SOBREPESO	3			2			4		
OBESIDAD TIPO I	2			0			3		
OBESIDAD TIPO II	0			1			0		
OBESIDAD TIPO III	0			0			0		
NA	0			0			1		
LOCALIZACIÓN DE LA FRACTURA									
VERTEBRAL	5								
RADIO DISTAL	4								
FÉMUR PROXIMAL	1								
DM2									
SI	0			0			2		
NO	10			5			9		

4.1.3. Descripción de los datos analíticos sobre parámetros del metabolismo óseo.

La media de los valores de beta-CTX en el grupo de casos fueron de 0.51 ± 0.20 ng/ml (rango 0.16-0.70 ng/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa de 0.28 ± 0.20 ng/ml (rango 0.70-0.52 ng/ml) y en el grupo control de 0.24 ± 0.16 ng/ml (rango 0.07-0.50ng/ml). Se encontraron diferencias estadísticamente

significativas con valores más altos para los valores de beta-CTX en el grupo de casos respecto al grupo control con una $p=0.004$, y en el grupo de escoliosis degenerativa respecto al grupo control con valores más altos en el primer grupo con una $p=0.007$.

La media de los valores de P1NP en el grupo de casos fue de 65.94 ± 25.31 ng/ml (rango 28.40-114.30 ng/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa de 71 ± 23.46 ng/ml (rango 40.50-95.70 ng/ml) y en el grupo control de 44.38 ± 15.21 ng/ml (rango 20.20-70.50 ng/ml). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de casos y el grupo de controles y entre el grupo de escoliosis degenerativa y el de controles, con valores más altos en el primer grupo en los dos casos y una $p=0.033$ y $p=0.019$, respectivamente.

La media de los valores de FA en el grupo de casos fue de 82.14 ± 35.96 U/L (rango 51-151 U/L), en el grupo de escoliosis degenerativa de 83.60 ± 19.09 U/L (rango 60-103 U/L) y en el grupo control de 79.00 ± 22.01 U/L (rango 51-114 U/L). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La media de los valores de 25OH-vitamina D en el grupo de casos fueron de 23.08 ± 4.37 ng/ml (rango 15.20-28.50 ng/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa de 24.34 ± 13.07 ng/ml (rango 60-103 ng/ml) y en el grupo control de 26.23 ± 4.42 ng/ml (rango 20.50-33.20 ng/ml). Según la clasificación de la American Society of Endocrinology¹⁶⁵, en el grupo de casos, en 7 pacientes se establecieron los niveles de 25OH-vitamina D como valores insuficientes y en 3 pacientes como valores deficientes. En el grupo de escoliosis degenerativa, los valores de 25OH-vitamina D de 2 pacientes se clasificaron como insuficientes y en tres de ellos como deficientes. En el grupo control, los valores de 3 pacientes se clasificaron como suficientes, los de 7 pacientes como insuficientes y en un caso no pudo ser analizado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

La media de los valores de PTH en el grupo de casos fue de 36.24 ± 7.13 pg/ml (rango 23.94-47.68 pg/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa de 40.19 ± 14.60 pg/ml (rango 20.04-54.51 pg/ml) y en el grupo control de

32.57±13.16pg/ml (rango 8.36-47.77pg/ml). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados.

La media de los valores de FSH en el grupo de casos fue de 60.97±17.02 mU/ml (rango 36.50-92 mU/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa de 60.94±23.32 mU/ml (rango 32.4-95.20 mU/ml), y en el grupo control de 66.85±19.43 mU/ml (rango 38.90-19.43 mU/ml). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Todas las pacientes presentaron valores superiores a 10 mU/ml.

Los valores descritos se reflejan en la tabla 8.

Tabla 8. Datos analíticos sobre los parámetros del metabolismo óseo analizados en sangre periférica.

	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N = 10	MEDIA (DE)	RANGO	N = 5	MEDIA (DE)	RANGO	N = 11	MEDIA (DE)	RANGO
BETA-CTX (ng / ml)	10	0,51 (0,20)	0,60 (0,16– 0,76)	5	0,28 (0,20)	0,45 (0,7–0,52)	10	0,24 (0,16)	0,43 (0,07– 0,50)
P1NP (ng / ml)	10	65,94 (25,31)	85,90 (28,40– 114,3)	5	71,00 (23,46)	55,20 (40,50– 95,70)	10	44,38 (15,21)	50,30 (20,20– 70,50)
FA (U / L)	7	82,14 (35,96)	100 (51–151)	5	83,60 (19,09)	43 (60–103)	9	79,00 (22,01)	63 (51–114)
25 (OH) VIT D (ng/ml)	10	23,08 (4,37)	13,30 (15,20– 28,50)	5	24,34 (13,07)	33,10 (13,60– 46,70)	10	26,23 (4,42)	12,70 (20,50– 33,20)
VALORES VIT D									
SUFICIENTES (> O IGUAL 30)	0			0			3		
INSUFICIENTES (20 – 29,9)	7			2			7		
DEFICIENTE (> 20)	3			3			0		
NA	0			0			1		
PTH (pg / ml)	10	36,24 (7,13)	23,74 (23,94– 47,68)	4	40,19 (14,60)	34,47 (20,04– 54,51)	11	32,57 (13,16)	39,41 (8,36– 47,77)
FSH (mU / ml)	10	60,97 (17,02)	55,50 (36,50– 92)	5	60,94 (23,32)	61,00 (34,20– 95,20)	11	66,85 (19,43)	67,10 (38,90– 106)

4.1.4. Descripción de los datos sobre la densitometría ósea.

Los análisis de densitometría ósea con localización lumbar y para el valor T-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -1.97 ± 1.89 DS (rango $-5 - 2$ DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de -0.96 ± 0.44 DS (rango $-1.60 - (-0.40)$ DS), y en el grupo de controles de -1.12 ± 0.8 DS (rango $-2.20 - 0.1$ DS). No

existieron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre los grupos. Para el valor Z-score, en el grupo de casos se obtuvo un valor medio de 0.37 ± 1.72 DS (rango -2.5 – 3.30 DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de 0.86 ± 0.23 DS (rango 0.5 -1.1 DS), y en el grupo de controles de 0.34 ± 1.36 DS (rango -1.9 -2.1 DS). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre grupos.

Analizando los resultados del valor T-score de la densitometría ósea lumbar, en el grupo de casos encontramos 3 pacientes clasificados como normales, 4 casos como pacientes con osteopenia y 3 casos como pacientes con osteoporosis. En el grupo de escoliosis degenerativa encontramos 1 caso clasificado como normal y 4 casos que fueron clasificados como osteopenia. En el grupo control encontramos 5 casos con DMO normal y 6 clasificados como osteopenia. Agrupando los pacientes según DMO patológica y no patológica, en el grupo de casos 7 pacientes presentan pruebas no patológicas y 3 patológicas, en el grupo de escoliosis degenerativa y controles todos los casos fueron clasificados como no patológicos. En nuestra muestra, esta prueba presentaría una sensibilidad del 30%, con una especificidad del 100%. El valor predictivo positivo sería del 100% y el valor predictivo negativo del 39.28%.

Los análisis de densitometría ósea con localización en fémur proximal y para el valor T-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -1.66 ± 1.23 DS (rango -4 – 0 DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de -1.36 ± 1.12 DS (rango -2.2 –0.40 DS), y en el grupo de controles de -0.85 ± 0.88 DS (rango -1.8 – 0.40DS). No existieron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre grupos.

Para el valor Z-score, en el grupo de casos se obtuvo un valor medio de -0.14 ± 0.87 DS (rango -2-1 DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de 0.22 ± 1.60 DS (rango -0.8 -2 DS), y en el grupo de controles de 0.45 ± 0.85 DS (rango -0.5 -1.90 DS). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre grupos.

Analizando los resultados del valor T-score de la densitometría ósea en el fémur proximal, en el grupo de casos encontramos 3 pacientes clasificados como normales, 4 como pacientes con osteopenia y 3 como pacientes con osteoporosis. En el grupo de escoliosis degenerativa encontramos 1 caso clasificado como normal y 4 casos como pacientes con osteopenia. En el grupo control encontramos 3 casos con DMO normal y 8 pacientes fueron clasificados como pacientes con osteopenia. Agrupando los pacientes según DMO patológica y no patológica, en el grupo de casos identificamos 7 pacientes que presentaron pruebas no patológicas y 3 pacientes que presentaron pruebas patológicas, en el grupo de escoliosis degenerativa y controles todos los casos fueron clasificados como no patológicos. Los valores de sensibilidad fueron del 30%, con una especificidad del 100%. El valor predictivo positivo sería del 100% y el valor predictivo negativo del 39.28%.

Los datos descritos se representan en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de las pruebas de densitometría ósea.

	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N=10	MEDIA (DE)	RANGO	N=5	MEDIA (DE)	RANGO	N=11	MEDIA (DE)	RANGO
LUMBAR									
T-SCORE	10	-1,97 (1,89)	7,00 (-5,00– 2,00)	5	-0,96 (0,44)	1,20 (-1,6–(-0,4))	11	-1,12 (0,80)	2,30 (-2,20– 0,10)
Z-SCORE	10	0,37 (1,72)	5,8 (-2,5– 3,30)	5	0,86 (0,23)	0,60 (0,50–1,10)	11	0,34 (1,36)	4,00 (-1,90– 2,10)
CLASIFICACIÓN DE LA OMS									
NORMAL	3			1			5		
OSTEOPENIA	4			4			6		
OSTEOPOROSIS	3			0			0		
NA	0			0			0		
DMO NO PATOLÓGICA	7			5			5		
DMO PATOLÓGICA)	3			0			0		
NA	0			0			0		
FÉMUR PROXIMAL									
T-SCORE	10	-1,66 (1,23)	4,00 (-4,00– 0,00)	5	-1,36 (1,12)	2,60 (-2,20–0,40)	11	-0,85 (0,88)	2,20 (-1,80– 0,40)
Z-SCORE	10	-0,14 (0,87)	3,00 (-2,00– 1,00)	5	0,22 (1,16)	2,80 (-0,80–2,00)	11	0,45 (0,85)	2,40 (-0,50– 1,90)
CLASIFICACIÓN DE LA OMS									
NORMAL	3			1			3		
OSTEOPENIA	4			4			8		
OSTEOPOROSIS	3			0			0		
NA	0			0			0		
DMO NO PATOLÓGICA	7			5			11		
DMO PATOLÓGICA)	3			0			0		

En la tabla 10 se muestran los análisis estadísticos de los datos analizados.

Tabla 10. Análisis estadístico de los datos clínicos recogidos.

	CASOS VS CONTROLES P-VALOR	ESCOLIOSIS VS CONTROLES P-VALOR	CASOS VS ESCOLIOSIS P-VALOR
EDAD	0,777	0,438	0,652
IMC	0,303	0,911	0,511
CLASIFICACIÓN DEL IMC	0,543	0,759	0,602
DM2	0,026	0,154	0,338
BETA - CTX	0,004	0,007	0,789
P1NP	0,033	0,019	0,715
FA	0,832	0,702	0,936
25 (OH) VIT D	0,126	0,678	0,781
VALORES DE VIT D	0,464	0,536	0,875
PTH	0,443	0,352	0,499
FSH	0,472	0,604	0,998
T-SCORE LUMBAR	0,187	0,688	0,267
Z-SCORE LUMBAR	0,095	0,335	0,654
CLASIFICACIÓN DE LA OMS LUMBAR	0,047	0,004	0,069
DMO	0,073	0,001	0,073
T-SCORE FÉMUR	0,961	0,416	0,544
Z-SCORE FÉMUR	0,139	0,667	0,515
CLASIFICACIÓN DE LA OMS FÉMUR	0,065	0,051	0,069

4.1.5. Medidas de esclerostina por inmunoensayo

Se midieron los niveles de esclerostina en plasma de 26 sujetos (10 pacientes de osteoporosis, 5 pacientes con escoliosis degenerativa), y 11 sujetos sanos (pareados por edad y sexo) usando el kit ELISA Esclerostina (Thermoscientific).

Los valores de esclerostina en las muestras analizadas fueron de 554.00 ± 66.06 pg/ml para el grupo de pacientes con osteoporosis, 685.00 ± 71.19 pg/ml para el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa y 602.00 ± 64.02 pg/ml para el grupo control (Fig.10).

Los resultados obtenidos mediante este inmunoensayo indicaron una tendencia hacia la disminución de los niveles de esclerostina circulante en pacientes con fractura de baja energía y un aumento en los niveles de esclerostina en plasma de los pacientes con escoliosis degenerativa, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los distintos grupos comparados, con una p de 0.08 tras la realización de un test ANOVA.

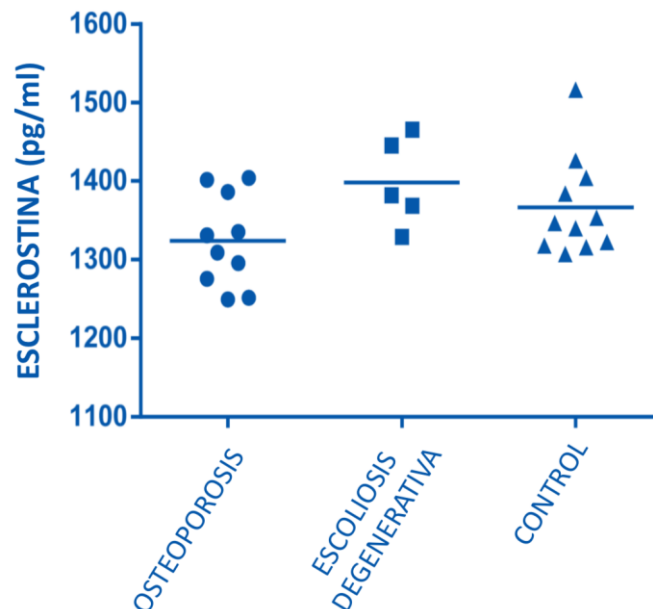


Figura 10. Niveles de esclerostina (pg/ml) en plasma de los sujetos de los tres grupos analizados. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los mismos.

4.1.6. Correlación entre esclerostina y vitamina D.

En el grupo de casos encontramos una relación positiva pero no esta no resultó significativa (coeficiente de Pearson = 0.270, $p = 0.451$).

En el grupo de escoliosis degenerativa tampoco encontramos una correlación significativa pero la relación también fue positiva (coeficiente de Pearson = 0.588, $p = 0.297$).

En el grupo de controles en cambio, aunque tampoco existe una correlación significativa, la correlación resultó ser negativa (coeficiente de Pearson = -0.5, $p = 0.141$).

Analizando los pacientes de los tres grupos en conjunto no se encontró correlación (coeficiente de Pearson = 0.167, $p = 0.426$).

4.1.7. Estudio de la metilación del gen SOST mediante tecnología Sequenom (EpiTYPER®)

Se aisló el ADN a partir de sangre total de 26 sujetos: 10 pacientes de osteoporosis (OSTEO), 5 pacientes con escoliosis degenerativa (OSTEOE), y 11 individuos control (OSTEOC) y, tras el tratamiento con bisulfito y su posterior purificación, se procedió al análisis de la metilación de 2 amplicones específicos del gen *SOST* mediante MassArray de Sequenom. Para el análisis de la metilación de los dos amplicones del gen *SOST* se diseñaron los cebadores para cubrir las regiones comprendidas hasta -400 pb aguas arriba del punto de inicio de la transcripción (amplicón SOST17) y 400 pb aguas abajo del punto de inicio de la transcripción (amplicón SOST28).

El gen *SOST* presenta en su extremo 5' una región de alta densidad de sitios CpG. Esta isla CpG tiene una longitud de 1278 bp (GCRh37; hg19chr17:41832317-41833595) y abarca un total de 15 sitios CpG, que hemos separado en dos amplicones para su análisis, el amplicón SOST17 y el amplicón SOST28. En el amplicón SOST17 hay 7 sitios CpG: CpG_1.2.3, CpG_4, CpG_5, CpG_6, CpG_7.8, CpG_9 y CpG_10. En amplicón SOST28 hay 8 sitios CpG: CpG_1, CpG_2, CpG_3, CpG_4, CpG_5, CpG_6, CpG_7 y CpG_8.

Se procedió en primer lugar a realizar la media de las réplicas para obtener un único valor por paciente para cada CpG. A continuación, se realizó un análisis por correlación de Spearman para comprobar si en los diferentes amplicones y en

las diferentes muestras existía una relación entre las CpGs, esto es, comprobamos si existía una correlación positiva (si aumenta la metilación de una CpG, aumenta también la metilación de alguna otra CpG dentro del mismo amplicón) o negativa (la disminución del nivel de metilación de una CpG se correlaciona con el aumento de otra CpG dentro del mismo amplicón). El objetivo de este análisis fue encontrar asociación entre los CpGs como una única región de metilación, también conocida como regiones de metilación diferencial (DMR). Las DMRs son regiones genómicas con diferentes estados de metilación para los CpGs que contienen en una secuencia específica del ADN y se consideran posibles regiones funcionales involucradas en la regulación transcripcional de genes.

Cuando se analizó la metilación de los distintos amplicones mediante MassArray de Sequenom y se evaluó la metilación de estas DMRs en cada uno de los amplicones analizados SOST17 y SOST28, se encontraron los siguientes resultados:

- En el amplicón SOST17 no se observó ninguna correlación entre la metilación de las CpGs incluídas amplicón en el grupo OSTEO. En el grupo OSTEOC encontramos correlación positiva entre las CpG_9-CpG_6 y CpG_9-CpG_7. En OSTEOE, encontramos correlación positiva entre las CpG_1.2.3-CpG_6; CpG_1.2.3-CpG_7.8 y CpG_6-CpG_7. Todos los p-valores fueron iguales o estuvieron por debajo de 0.05
- En el amplicón SOST28 para las muestras del grupo OSTEO, encontramos correlación negativa entre CpG_1-CpG_7. Correlaciones positivas entre CpG_3-CpG_4; CpG_3-CpG_5; CpG_6-CpG_7; CpG_6-CpG_8; CpG_7-CpG_3 y CpG_7-CpG_8. En OSTEOC encontramos correlación negativa entre CpG_4-CpG_5 y correlación positiva entre CpG_7-CpG_8. En OSTEOE, encontramos correlación positiva entre CpG_2-CpG_4 y CpG_3-CpG_7 aunque en esta última muestra se consideraron valores significativos para los p-valores de 0.08.

Asimismo, realizamos un diagrama de cajas para las CpGs individuales o grupos de CpGs analizadas por EpiTYPER para cada amplicon estudiado para identificar las diferencias entre los distintos grupos de muestras (Fig. 11 y Fig. 12).

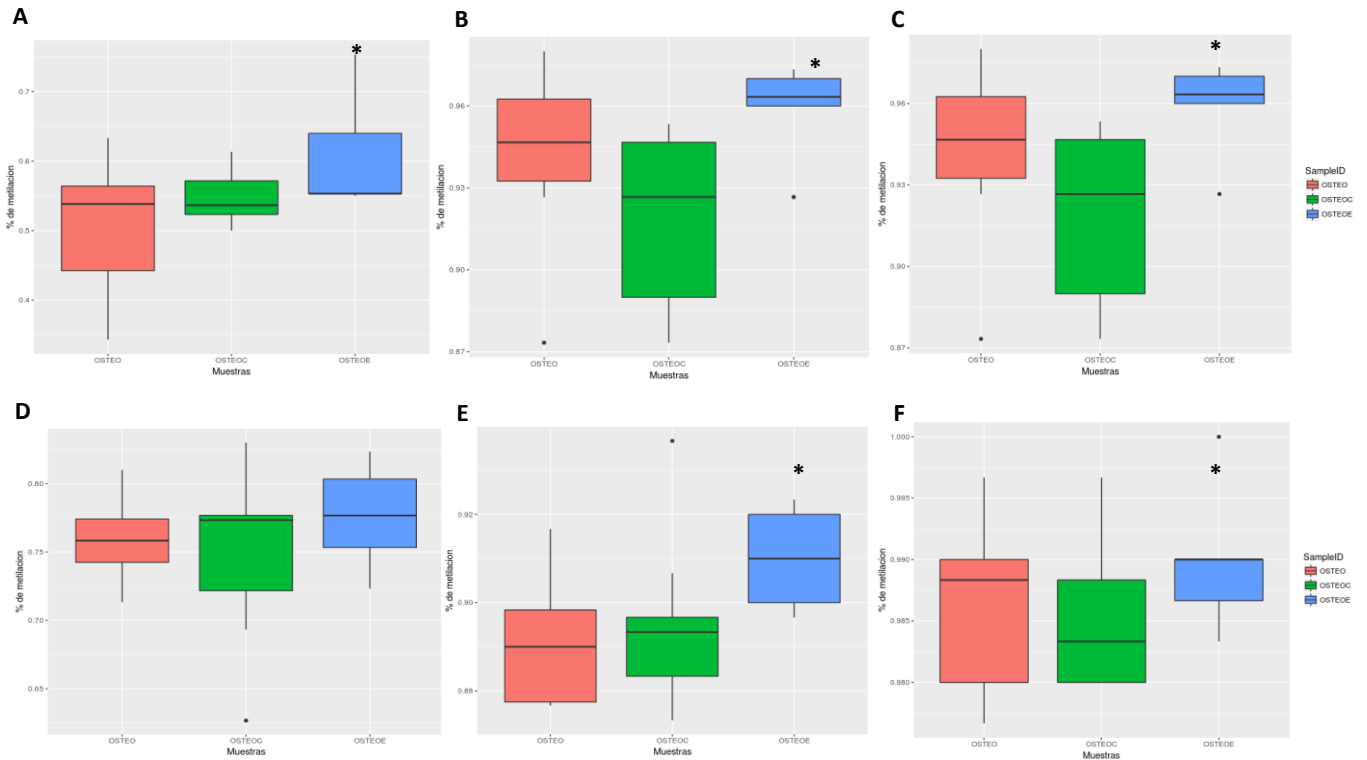


Figura 11. Diagrama de cajas representando el porcentaje de metilación de las muestras de pacientes de osteoporosis (OSTEO), controles (OSTEOC) y de pacientes con osteoporosis y escoliosis degenerativa (OSTEOE) para el amplicón SOST17 en los sitios CpG **A)** CpG_1, CpG_2 y CpG_3; **B)** CpG_4; **C)** CpG_5; **D)** CpG_7, CpG_8; **E)** CpG_9; **F)** CpG_10. * Existen diferencias estadísticamente significativas entre OSTEOC y OSTEOE ($p < 0.05$).

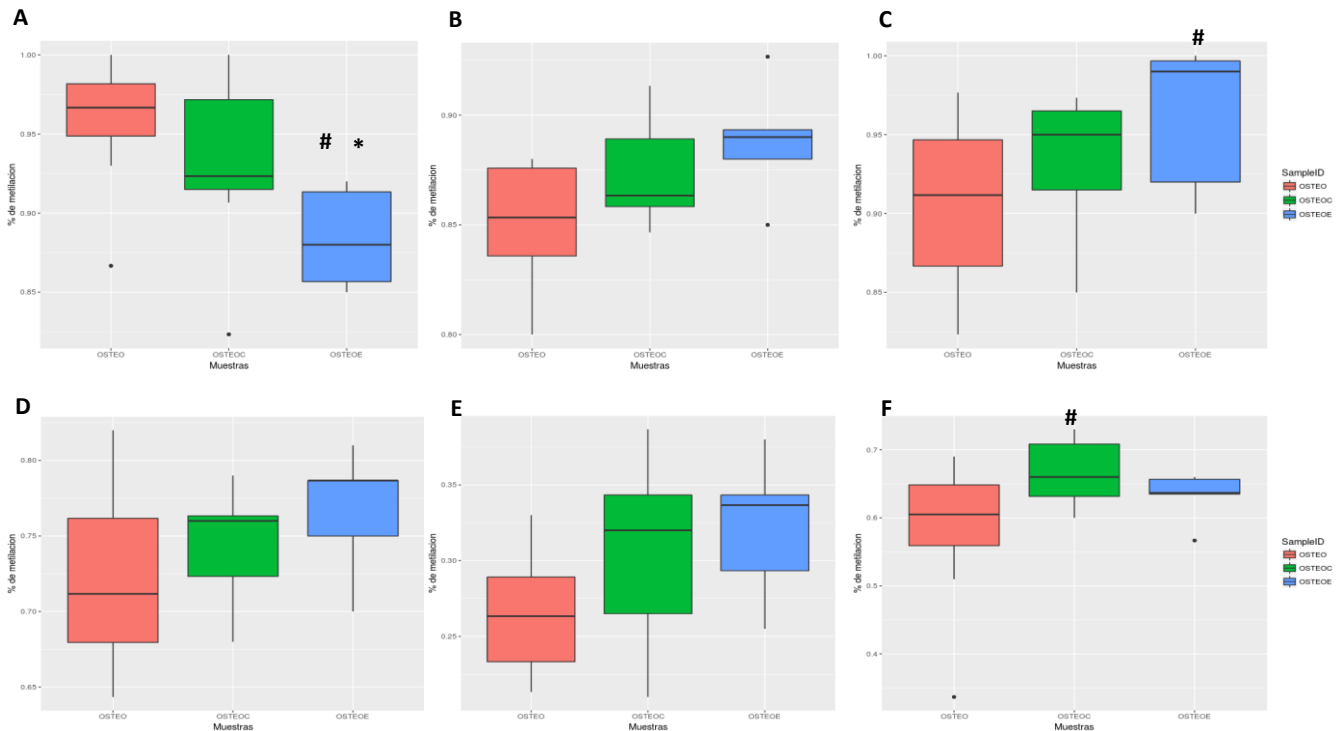


Figura 12. Diagrama de cajas representando el porcentaje de metilación de las muestras de pacientes de osteoporosis (OSTEO), controles (OSTEOC) y de pacientes con osteoporosis y escoliosis degenerativa (OSTEOE) para el amplicón SOST28 en los sitios CpG **A)** CpG_1; **B)** CpG_2; **C)** CpG_4; **D)** CpG_5.; **E)** CpG_6; **F)** CpG_7. * Existen diferencias estadísticamente significativas con OSTEOC ($p < 0.05$). # Existen diferencias estadísticamente significativas con OSTEO ($p < 0.05$).

Para establecer si existe una diferencia estadísticamente significativa en el grado de metilación de los CpGs o grupos de CpGs analizados en cada amplicón del gen *SOST*, realizamos test estadísticos ANOVA, Kruskal-Wallis, Kruskal-Wallis con ajuste posthoc de Neyemeni y Kruskal-Wallis con ajuste posthoc de Dunn con los p-valores ajustados mediante Bonferroni, cuyos resultados se reflejan en la tabla 11.

Tabla 11. Test ANOVA, Kruskal-Wallis, Kruskal-Wallis con ajuste posthoc de Neyemni y Kruskal-Wallis con ajuste posthoc de Dunn con ajustados mediante Bonferroni para valorar el grado de metilación de los grupo CpG.

	ANOVA	KRUSKAL-WALLIS solo ofrece un p-valor y no un desglose de las diferentes comparativas.	KRUSKAL-WALLIS POSTHOC NEYEMENI	KRUSKAL-WALLIS POSTHOC DUNN AJUSTE POR BONFERRONI
SOST17	0.035 en CpG_1,2,3 frente a OSTEOE 0.022 en CpG_9 frente a OSTEOE	0.02 en CpG_4 0.02 en CpG_5 0.04 en CpF_9 0.04 en CpF_10	0.032 en CpG_4 entre OSTEOC y OSTEOE 0.032 en CpG_5 entre OSTEOC y OSTEOE 0.054 en CpG_9 entre OSTEO y OSTEOE	0.035 en CpG_4 entre OSTEOC y OSTEOE 0.035 en CpG_5 entre OSTEOC y OSTEOE
SOST28	0.033 en CpG_1 frente OSTEO 0.008 en CpG_1 frente OSTEOE 0.041 en CpG_2 frente OSTEO 0.012 en CpG_3 frente OSTEO 0.028 en CpG_6 frente OSTEO 0.018 en CpG_7 frente OSTEO	0.01 en CpG_1 0.05 en CpG_3 0.04 en CpG_7	0.011 en CpG_1 entre OSTEO y OSTEOE 0.03 en CpG_7 entre OSTEOC y OSTEO	0.012 en CpG_1 entre OSTEO y OSTEOE 0.034 en CpG_7 entre OSTEOC y OSTEO

Nota: OSTEOC: grupo control; OSTEO: grupo osteoporosis; OSTEOE: grupo escoliosis degenerativa

En el amplicon SOST17, las diferencias entre OSTEOC y OSTEOE en los sitios CpG_4 y CpG_5 aparecen como estadísticamente significativas en Kruskal-Wallis posthoc Neyemni y Kruskal-Wallis posthoc Dunn ajustado por Bonferroni. CpG_9 aparece como estadísticamente significativa en ANOVA y en Kruskal-Wallis posthoc Neyemni entre OSTEOC y OSTEOE.

En el amplicon SOST28, las diferencias entre los grupos OSTEO y OSTEOE en el sitio CpG_1 y entre OSTEO y OSTEOC en el sitio CpG_7 aparecen como estadísticamente significativas en ANOVA, Kruskal-Wallis posthoc Neyemni y Kruskal-Wallis posthoc Dunn ajustado por Bonferroni.

Del análisis de la metilación se sugiere que existe un sitio de regulación de la expresión del gen *SOST* en la región de -400 pb (amplicón SOST17) que corresponde a la región del promotor del gen. Los CpGs de interés han resultado ser el CpG_4 y el CpG_5. En estos sitios los resultados indicaron una mayor metilación para las pacientes con osteoporosis y con escoliosis degenerativa frente al grupo de sujetos control.

4.2. Expresión diferencial de los miARNs circulantes por secuenciación masiva entre los grupos de osteoporosis, escoliosis degenerativa y controles

4.2.1. Descripción de la muestra.

Para este análisis se seleccionaron 4 muestras del grupo de casos (OSTEO_1, OSTEO_2, OSTEO_9 y OSTEO_10), 4 muestras del grupo de pacientes con escoliosis degenerativa (OSTEO_E2, OSTEO_E3, OSTEO_E4 y OSTEO_E6) y 4 muestras del grupo control (OSTEO_C1, OSTEO_C2, OSTEO_C8 y OSTEO_C13).

4.2.2. Descripción clínica.

La edad media de los pacientes del grupo de casos fue de 67.50 ± 9.57 años (rango 57-79 años), en el grupo de escoliosis degenerativa la edad media fue de 67.75 ± 7.68 años (rango 58-76 años) y en controles de 66 ± 7.12 años (rango 56-72 años). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Respecto al IMC la media fue de 25.80 ± 5.04 (rango 20.58-32.66) en el grupo de casos, 25.35 ± 0.91 (rango 24.61-26.37) en el grupo de escoliosis degenerativa y 28.02 ± 4.38 (rango 22.22-31.56). En el grupo de casos, 2 pacientes fueron clasificados como pacientes con IMC normales, 1 como paciente con sobrepeso y 1 como paciente con obesidad tipo I. En el grupo de escoliosis degenerativa, 1 paciente fue clasificado como paciente con IMC normal, 2 como pacientes con sobrepeso y 1 como paciente con obesidad tipo II. En el grupo de controles, un paciente fue clasificado como sujeto con IMC normal, uno como sujeto con sobrepeso y dos como sujetos con obesidad tipo I. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

En el grupo de casos, un paciente presentó fractura vertebral, 2 pacientes presentaron fractura de radio distal y en un paciente presentó fractura de fémur proximal.

En cuanto a la presencia de diabetes mellitus tipo 2 como patología asociada, sólo apareció en dos casos del grupo de escoliosis degenerativa.

Las características clínicas descritas se reflejan en la tabla 12.

Tabla 12. Datos clínicos sobre la edad, antropométricos, de localización de la fractura y el diagnóstico de DM2 en los pacientes estudiados.

3.	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N=4	MEDIA (DE)	RANGO	N=4	MEDIA (DE)	RANGO	N = 4	MEDIA (DE)	RANGO
EDAD (años)	4	67,50 (9,57)	22 (57 – 79)	4	67,75 (7,68)	18 (58 – 76)	4	66,00 (7,12)	16 (56 – 72)
ANTROPOMETRÍA									
IMC (kg/m²)	4	25,80 (5,04)	12,08 (20,58 - 32,66)	4	25,35 (0,91)	1,76 (24,61- 26,37)	3	28,02 (4,38)	9,34 (22,22 – 31,56)
CLASIFICACIÓN IMC									
BAJO PESO	0			0			0		
NORMAL	2			1			1		
SOBREPESO	1			2			1		
OBESIDAD TIPO I	1			0			2		
OBESIDAD TIPO II	0			1			0		
OBESIDAD TIPO III	0			0			0		
NA	0			0			0		
LOCALIZACIÓN DE LA FRACTURA									
VERTEBRAL	1								
RADIO DISTAL	2								
FÉMUR PROXIMAL	1								
DM2									
SI	0			2			0		
NO	4			2			4		

4.2.3. Descripción de los datos analíticos sobre parámetros del metabolismo óseo.

La media de los valores de beta-CTX en el grupo de casos fueron de 0.41 ± 0.26 ng/ml (rango 0.16-0.76 ng/ml) en el grupo de escoliosis degenerativa de 0.24 ± 0.20 ng/ml (rango 0.07-0.52 ng/ml) y en el grupo control de 0.28 ± 0.18 ng/ml (rango 0.07-0.48ng/ml). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

La media de los valores de P1NP en el grupo de casos fueron de 49.27 ± 18.18 ng/ml (rango 28.40-61.70 ng/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa de 64.83 ± 21.91 ng/ml (rango 40.50-91.90 ng/ml) y en el grupo control de 42.60 ± 22.28 ng/ml (rango 20.20-70.50 ng/ml). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La media de los valores de FA en el grupo de casos fue de 64.50 ± 10.25 U/L (rango 51-75 U/L), en el grupo de escoliosis degenerativa de 79.50 ± 19.33 U/L (rango 60-103 U/L) y en el grupo control de 77.25 ± 23.56 U/L (rango 51-107 U/L). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La media de los valores de 25OH-vitamina D en el grupo de casos fueron de 20.65 ± 5.25 ng/ml (rango 15.20-27.40 ng/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa de los valores de 25OH-vitamina D fueron de 27.03 ± 13.40 ng/ml (rango 17.40-46.70 ng/ml) y en el grupo control de 26.13 ± 3.60 ng/ml (rango 23.30-31.40 ng/ml). Según la clasificación de la American Society of Endocrinology¹⁶⁵, en el grupo de casos, dos pacientes los valores de 25OH-vitamina D se clasificaron como valores insuficientes y en dos pacientes como valores deficientes. En el grupo de escoliosis degenerativa, el valor de un paciente se clasificó como suficiente, uno como deficiente y los de dos como insuficiente. En el grupo control, los valores de un paciente se clasificaron como suficientes y los de 3 pacientes como insuficientes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

La media de los valores de PTH en el grupo de casos fue de 32.53 ± 7.85 pg/ml (rango 23.94-42.96 pg/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa los valores de PTH fueron de 38.41 ± 17.35 pg/ml (rango 20.04-54.51 pg/ml) y en el grupo control de 30.31 ± 16.30 pg/ml (rango 8.36-43.58 pg/ml). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La media de los valores de FSH en el grupo de casos fue de 56.95 ± 15.75 mU/ml (rango 40.10-78.10 mU/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa los valores de FSH fueron de 52.38 ± 15.35 mU/ml (rango 34.2-66.50 mU/ml), y en el grupo control de 64.80 ± 23.29 mU/ml (rango 38.90-95.40 mU/ml). No se

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Todas las pacientes presentaron valores de FSH superiores a 10 mU/ml.

Los valores descritos se reflejan en la tabla 13.

Tabla 13. Datos analíticos sobre los parámetros del metabolismo óseo analizados en sangre periférica.

	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N=4	MEDIA (DE)	RANGO	N=4	MEDIA (DE)	RANGO	N=4	MEDIA (DE)	RANGO
BETA-CTX (ng / ml)	4	0,41 (0,26)	0,60 (0,16 – 0,76)	4	0,24 (0,20)	0,45 (0,07 – 0,52)	4	0,28 (0,18)	0,41 (0,07 – 0,48)
P1NP (ng / ml)	3	49,27 (18,18)	33,30 (28,40- 61,70)	4	64,83 (21,91)	51,40 (40,50- 91,90)	4	42,60 (22,28)	50,30 (20,20- 70,50)
FA (U / L)	4	64,50 (10,25)	24 (51 – 75)	4	79,50 (19,33)	43 (60 – 103)	4	77,25 (23,56)	56 (51 – 107)
25 (OH) VIT D	4	20,65 (5,25)	12,20 (15,20- 27,40)	4	27,03 (13,40)	29,30 (17,40- 46,70)	4	26,13 (3,60)	8,10 (23,30- 31,40)
VALORES VITD (ng/ml)									
SUFICIENTES (> O IGUAL 30)	0			1			1		
INSUFICIENTES (20 – 29,9)	2			1			3		
DEFICIENTE (> 20)	2			2			0		
NA	0			0			0		
PTH (pg / ml)	4	32,53 (7,85)	19,02 (23,94- 42,96)	3	38,41 (17,35)	34,47 (20,04- 54,51)	4	30,31 (16,30)	35,22 (8,36 – 43,58)
FSH (mU / ml)	4	56,95 (15,75)	38 (40,10- 78,10)	4	52,38 (15,35)	32,30 (34,20- 66,50)	4	64,80 (23,29)	56,50 (38,90- 95,40)

4.2.4. Descripción de los datos sobre la densitometría ósea.

Los análisis de densitometría ósea con localización lumbar y para el valor T-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -2.13 ± 2.79 DS (rango $-5.3 - 1.5$ DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de $-1.1 \pm (-0.36)$ DS (rango $-1.60 - (-0.80)$ DS), y en el grupo de controles de -0.9 ± 0.57 DS (rango $-1.70 - (-0.40)$ DS). No existieron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre grupos. Para el valor Z-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de 1.30 ± 2.05 DS (rango $-1.20 - 3.30$ DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de 0.80 ± 0.22 DS (rango $0.5 - 1$ DS), y en el grupo de controles de 1.30 ± 1.02 DS (rango $-0.5 - 1.60$ DS). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre grupos.

Analizando los resultados del valor T-score de la densitometría ósea lumbar, en el grupo de casos encontramos un paciente clasificado como normal, uno como osteopenia y 2 como osteoporosis. En el grupo de escoliosis degenerativa encontramos 3 casos clasificados como normales y un caso como osteopenia. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a esta clasificación entre el grupo de escoliosis degenerativa y el grupo control con un p valor de 0.028. En el grupo control encontramos 4 casos clasificados como osteopenia. Agrupando los pacientes según DMO patológica y no patológica, en el grupo de casos 2 pacientes presentan pruebas no patológicas y 2 patológicas, en el grupo de escoliosis degenerativa y controles todos los casos fueron clasificados como no patológicos. En nuestra muestra, esta prueba presentaría una sensibilidad para la detección de una mala calidad ósea del 50%, con una especificidad del 100%. El valor predictivo positivo sería del 100% y el valor predictivo negativo del 66.66%.

Los análisis de densitometría ósea con localización en fémur proximal y para el valor T-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -2.1 ± 1.4 DS (rango $-3.3 - (-0.70)$ DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de -1.20 ± 1.22 DS (rango $-2.2 - 0.40$ DS), y en el grupo de controles de -1.15 ± 0.74 DS (rango $-1.8 - (-0.10)$ DS). No existieron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre grupos. Para el valor Z-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -0.3 ± 0.77 DS (rango $-1 - 0.8$ DS), en el grupo de escoliosis

degenerativa de 0.45 ± 1.20 DS (rango -0.8 -2 DS), y en el grupo de controles de 0.45 ± 0.81 DS (rango -0.40 -1.50 DS). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre grupos.

Analizando los resultados del valor T-score de la densitometría ósea en fémur proximal, en el grupo de casos encontramos un paciente clasificado como normal, un como osteopenia y 2 como osteoporosis. En el grupo de escoliosis degenerativa encontramos 1 caso clasificado como normal y 3 casos como osteopenia. En el grupo control encontramos un caso con DMO normal y 3 clasificados como osteopenia. Agrupando los pacientes según DMO patológica y no patológica, en el grupo de casos 2 pacientes presentan pruebas no patológicas y 2 patológicas, en el grupo de escoliosis degenerativa y controles todos los casos fueron clasificados como no patológicos. Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo coinciden con los calculados para la localización lumbar.

Los datos descritos se representan en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados de las pruebas de densitometría ósea.

3.	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N=4	MEDIA (DE)	RANGO	N=4	MEDIA (DE)	RANGO	N=4	MEDIA (DE)	RANGO
LUMBAR									
T-SCORE	4	-2,13 (2,79)	6,80 (-5,30 – 1,50)	4	-1,10 (-0,36)	0,80 (-1,6 – (- 0,8))	4	-0,90 (0,57)	1,30 (-1,7 – (- 0,4))
Z-SCORE	4	1,30 (2,05)	4,50 (-1,20 – 3,30)	4	0,8 (0,22)	0,50 (0,50 – 1)	4	1,03 (1,02)	2,10 (-0,50 – 1,60)
CLASIFICACIÓN DE LA OMS									
NORMAL	1			3			0		
OSTEOPENIA	1			1			4		
OSTEOPOROSIS	2			0			0		
NA	0			0			0		
DMO NO PATOLÓGICA	2			4			4		
DMO PATOLÓGICA	2			0			0		
NA									
FÉMUR PROXIMAL									
T-SCORE	10	-2,10 (1,14)	2,60 (-3,3 – (-0,7))	5	-1,20 (1,22)	2,60 (-2,20 – 0,40)	11	-1,15 (0,74)	1,70 (-1,8 – (- 0,10))
Z-SCORE	10	-0,3 (0,77)	1,80 (-1 – 0,8)	5	0,45 (1,20)	2,80 (-0,80 – 2)	11	0,45 (0,81)	1,90 (-0,40 – 1,50)
CLASIFICACIÓN DE LA OMS									
NORMAL	1			1			1		
OSTEOPENIA	1			3			3		
OSTEOPOROSIS	2			0			0		
NA	0			0			0		
DMO NO PATOLÓGICA	2			4			4		
DMO PATOLÓGICA	2			0			0		

En la tabla 15 se observa el análisis estadístico de los datos recogidos.

Tabla 15. Análisis estadístico de los datos clínicos recogidos.

	CASOS VS CONTROLES P-VALOR	ESCOLIOSIS VS CONTROLES P-VALOR	CASOS VS ESCOLIOSIS P-VALOR
EDAD	0,333	0,423	0,423
IMC	0,333	0,321	0,321
DM2	0,102	0,102	1
BETA - CTX	0,333	0,423	0,423
P1NP	0,321	0,333	0,321
FA	0,549	0,333	0,333
25 (OH) VIT D	0,333	0,333	0,333
VALORES DE VIT D	0,202	0,223	0,172
PTH	0,333	0,321	0,321
FSH	0,333	0,333	0,333
T-SCORE LUMBAR	0,333	0,423	0,333
Z-SCORE LUMBAR	0,333	0,333	0,333
CLASIFICACIÓN DE LA OMS LUMBAR	0,285	0,028	0,223
T-SCORE FÉMUR	0,238	0,238	0,423
Z-SCORE FÉMUR	0,238	0,333	0,328
CLASIFICACIÓN DE LA OMS FÉMUR	0,223	1	0,223

4.3. Análisis de expresión diferencial de miARNs circulantes en plasma

Tras el procedimiento de smallRNA-seq de miARNs circulantes en muestras de plasma de los grupos de estudio, se procedió en primer lugar al filtrado de miARNs con el fin de seleccionar sólo aquellos miARNs que alcanzaban al menos 1 conteo por millón (cpm) de lecturas. El valor de cpm proporciona una cuantificación relativa de las secuencias, y esta se corresponde con el número de lecturas de una misma secuencia por cada millón de secuencias totales de la muestra. Para el mapeo, las lecturas fueron alineadas con el genoma humano de referencia (última versión GRCh38) para identificar y cuantificar las lecturas que correspondían a miARNs maduros obtenidos de la base de datos miRbase v21 ¹⁷¹.

Por otra parte, el logFC es el resultado de comparar los cpm de los miARN entre cada uno de los grupos estudiados. Por tanto, es el valor que proporciona información de la expresión diferencial de cada uno de los miARNs identificados. Cuando el valor de logFC es positivo implica una mayor expresión del miARN en el grupo que se está comparando respecto al grupo que se usa como grupo de referencia.

El análisis bioinformático identificó un patrón diferencial de expresión de miARNs asociado a las dos patologías estudiadas cuyo perfil de expresión de miARNs permitió clasificar de forma adecuada los distintos grupos de sujetos incluidos en el estudio. En las figuras siguientes se presentan los *heatmaps* (dendograma que agrupa simultáneamente miARNs y muestras según su similitud). El *heatmap* agrupa por similitud de expresión de los miARNs, y en este caso, gracias a la firma establecida de los miARNs, se puede separar claramente los grupos comparados según la expresión de una firma concreta de miARNs.

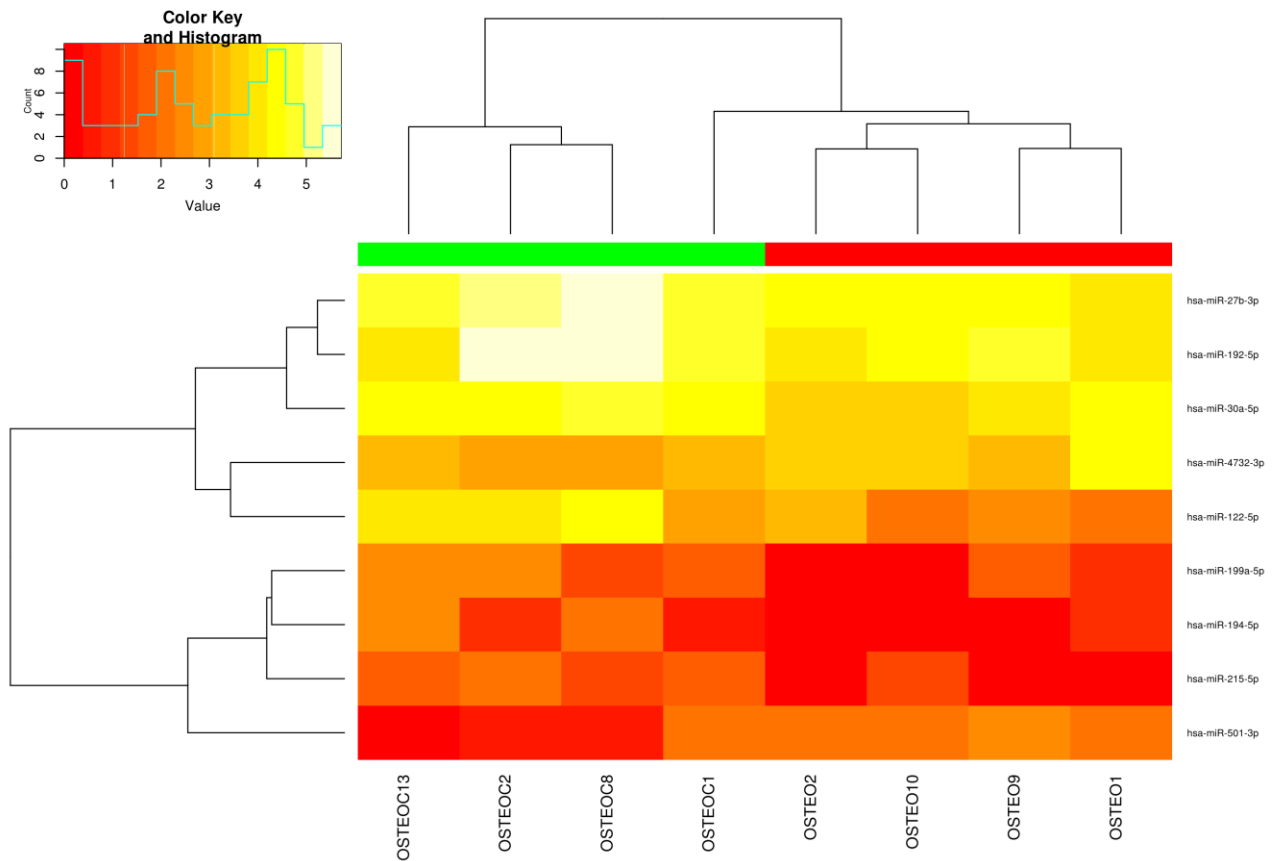


Figura 13. Heatmap con los niveles de expresión de los 9 miARNs significativos a través de las muestras de pacientes con osteoporosis (barra roja superior) y controles (barra verde superior). Según la selección de los 9 miARNs con expresión diferencial ambos grupos quedaron separados de forma adecuada con la excepción del OSTEOC1 cuyo perfil se asemejó más al grupo osteoporosis. Esta figura sirve para ilustrar que la firma de miARNs establecidas parece diferenciar a los pacientes con osteoporosis de los sujetos sanos.

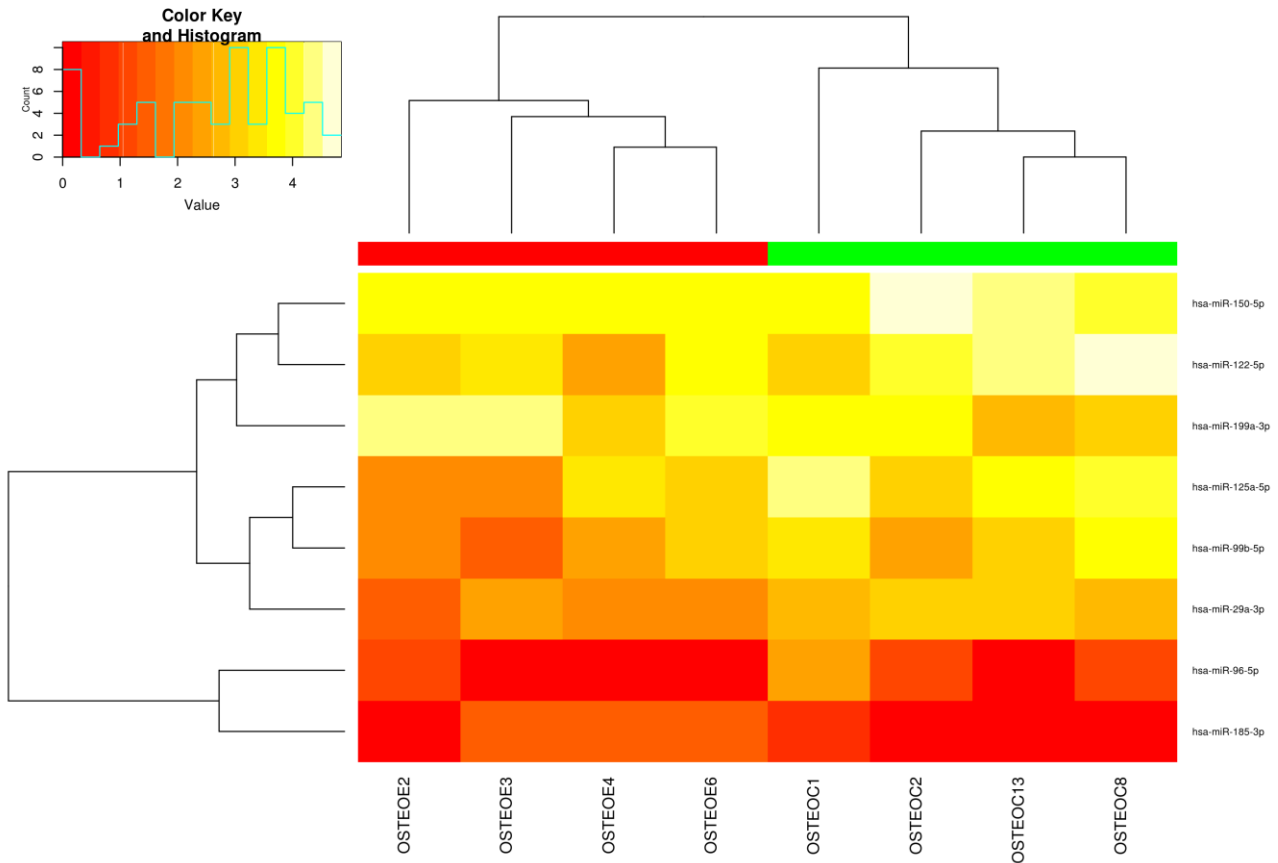


Figura 14. Heatmap con los niveles de expresión de los 8 miARNs significativos a través de las muestras de pacientes con escoliosis degenerativa (barra roja superior) y controles (barra verde superior). Según la selección de los 8 miARNs con expresión diferencial ambos grupos quedaron separados de forma adecuada. Esta figura sirve para ilustrar que la firma de miARNs establecidas puede diferenciar a los pacientes con escoliosis degenerativa de los sujetos sanos.

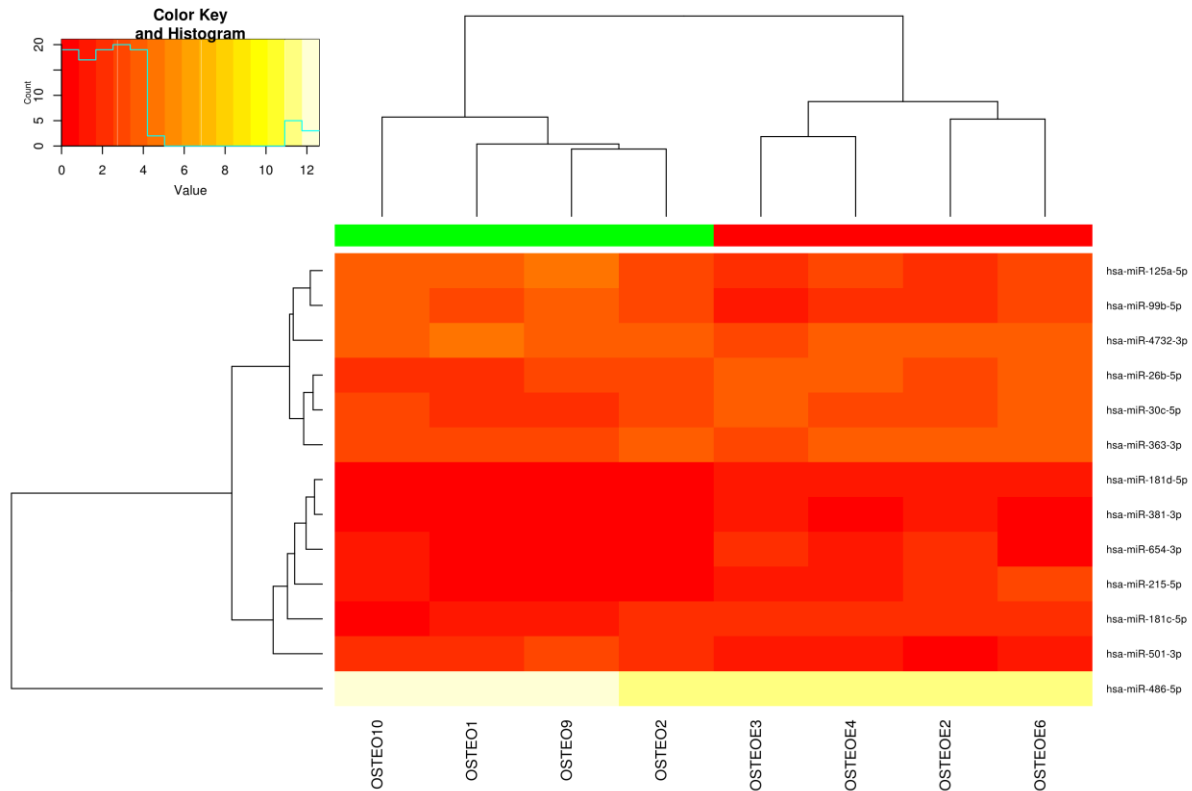


Figura 15. Heatmap con los niveles de expresión de los 13 miARNs significativos a través de las muestras de pacientes con escoliosis degenerativa (barra roja superior) y pacientes con osteoporosis (barra verde superior). Según la selección de los 13 miARNs con expresión diferencial ambos grupos quedaron separados de forma adecuada. Esta figura sirve para ilustrar que la firma de miARNs establecidas puede diferenciar a los pacientes con escoliosis degenerativa de los pacientes con osteoporosis.

Para considerar una diferencia significativa en los niveles de los miARNs se utilizó el valor de fold change >2 (log2-fold change de 1) para considerar que el miARN estaba sobre-regulado o sobrerrepresentado, mientras que cuando el valor de fold change < 0.5 (log2-fold change de -1), se correspondía a una infra-regulación o infra-representación de los microARNs en los plasmas de los pacientes en comparación con el grupo control.

El análisis bioinformático de los resultados del experimento de smallRNA-Seq demostró que en el grupo de pacientes con osteoporosis se detectaron 9 miARNs desregulados, considerando un p-valor < 0.05 , de ellos 7 infra-expresados (miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p y miR-215-5p) y 2 sobre-expresados (miR-501-3p, y miR-4732-3p) (Fig.13).

En el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa se identificaron desregulados 8 miARNs, 6 infra-expresados (miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, y miR-150-5p), y 2 sobre-expresados (miR-185-3p y miR-199a-3p) (Fig.14).

Además, se hallaron 13 miARNs desregulados cuando se compararon los grupos de pacientes entre sí, y de ellos 5 se sobre-expresaron en el grupo de pacientes osteoporóticos (miR-99b-5p, miR-125a-5p, miR-501-3p, miR-486-5p, y miR-4732-3p) y 8 en el grupo que padecían escoliosis degenerativa (miR-26b-5p, miR-30c-5p, miR-181c-5p, miR-181d-5p, miR-215-5p, miR-363-3p, miR-381-3 y miR-654-3p) (Fig.15).

Con el objetivo de contextualizar biológicamente las firmas de miARNs para cada uno de los grupos se procedió a realizar un diagrama de Venn para mostrar gráficamente la agrupación de elementos en conjuntos para cada uno de los grupos de pacientes estudiados (Fig.16).

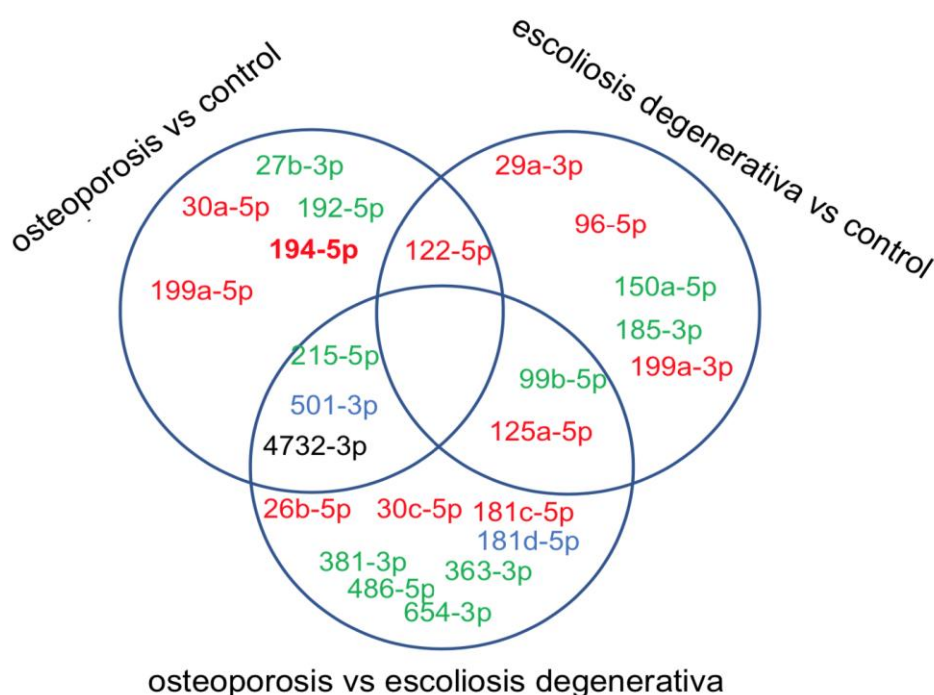


Figura 16. Expresión diferencial de miARNs en el grupo de pacientes con osteoporosis y escoliosis degenerativa respecto al grupo control y comparados entre sí. miARNs relacionados con remodelación ósea u osteoporosis (rojo), miRs relacionados con otras patologías óseas (verde)¹⁷², miARNs relacionados con otras patologías (azul), miARNs no asociados a patología en la literatura (negro).

El diagrama de Venn nos indicó que los miARNs miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-192-5p, miR-194-5p y miR-199a-5p estaban desregulados en el grupo de pacientes con osteoporosis respecto a los controles. También se detectó en estos pacientes la desregulación de miR-215-5p, miR-501-3p y miR-4732-3p, el primero infrarrepresentado y los otros 2 sobrerrepresentados, cuando se compararon respecto a los controles y respecto al grupo de pacientes con escoliosis degenerativa. Interesantemente, el miR-122-5p estuvo infrarrepresentado en ambos grupos de pacientes, lo que indica que aunque fue el mejor para diferenciar los pacientes con algún tipo de patología ósea respecto a los controles, este miRNA carece de valor diferencial entre los dos grupos de pacientes (i.e. grupo de pacientes con osteoporosis y grupo de pacientes con escoliosis degenerativa), ya que sus niveles en muestra de plasma no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de pacientes en el análisis de expresión diferencial por la técnica de smallRNA-seq.

Por su parte miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-150-5p, miR-185-3p y miR-199a-3p se detectaron desregulados en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa en relación con los controles; miR-99b-5p y miR-125a-5p lo estuvieron además respecto al grupo de pacientes con osteoporosis.

A la lista de miARNs desregulados en el grupo de pacientes con osteoporosis respecto al grupo de pacientes con escoliosis degenerativa se suman: miR-26b-5p, miR-30c-5p, miR-181c-5p, miR-181d-5p, miR-363-3p, miR-381-3p, miR-486-5p y miR-654-3p.

4.3.1. Estudio funcional de los miARNs identificados en nuestro estudio miRNA-seq

Algunos de los miARNs detectados en este estudio coinciden o pertenecen a familias que han sido asociadas previamente al metabolismo óseo y han sido propuestos como biomarcadores de osteoporosis (señalados en rojo y verde en el diagrama de Venn, figura 16) ^{173–175}. Sin embargo, hay algunos miARNs que han sido asociados a procesos patológicos relacionadas con el metabolismo óseo como el miR-501-3p y miR-181d-5p, que se han relacionado con la

proliferación de células y metastasis en osteosarcoma o con procesos asociados a la diferenciación osteogénica de células madre humanas vía Runx2^{176,177} respectivamente (señalados en azul en el diagrama de Venn, figura 16) o no han sido previamente asociados a ninguna patología en la literatura (como el miR-4732-3p, negro en el diagrama de Venn, figura 16).

El análisis del conjunto de los miARNs desregulados en este trabajo con la ayuda del programa DIANA-mirPath v3.0, y del algoritmo de la KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomas), detectó que los 9 miARNs desregulados en el grupo de pacientes con osteoporosis participan en hasta 58 rutas de señalización. Muchas de ellas están asociadas a procesos de malignización aunque también se han identificado varias de las vías relacionadas con la biología ósea. Estas rutas en las que participan los 9 miARNs desregulados en el grupo de pacientes con osteoporosis se citan a continuación en la tabla 16.

Tabla 16. Rutas de señalización en las que participan los miARNs desregulados en el grupo de pacientes con osteoporosis y el número de genes que regulan.

RUTA DE SEÑALIZACIÓN	P VALOR	Nº DE GENES REGULADOS	Nº DE miARNs QUE PARTICIPAN EN LA RUTA	NOMBRE DE LOS miARNs QUE PARTICIPAN EN LA RUTA
TGF- β	6.4e-07	48	7	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-501-3p
Hippo	7.74e-07	73	8	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-501-3p, miR-4732-3
PSCs	1.71e-06	73	8	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-501-3p, miR-4732-3
Biosíntesis de O-glicanos tipo mucina	1.5e-05	16	5	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, y miR-199a-5
FoxO	3.28e-05	72	7	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-501-3p
Uniones adherentes	0.001	40	7	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-501-3p
Neurotrofina	0.002	61	9	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-215-5p, miR-501-3p, miR-4732-3
Hormonas tiroideas	0.008	59	9	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-215-5p, miR-501-3p, miR-4732-3
Estrógenos	0.01	45	9	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-215-5p, miR-501-3p, miR-4732-3
WNT	0.02	63	9	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-215-5p, miR-501-3p, miR-4732-3
HIF	0.02	51	8	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-501-3p, miR-4732-3
Apoptosis	0.03	40	8	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-501-3p, miR-4732-3
TNF	0.04	51	9	miR-27b-3p, miR-30a-5p, miR-122-5p, miR-192-5p, miR-194-5p, miR-199a-5p, miR-215-5p, miR-501-3p, miR-4732-3

Mediante la misma estrategia se determinó que los 8 miARNs identificados con el estudio de miARN-seq y que aparecen desregulados en el grupo de

pacientes con *escoliosis degenerativa* están involucrados en 59 rutas. Al igual que en los pacientes con osteoporosis también se identificaron muchas vías asociadas a procesos tumorales y otras relacionadas con la biología ósea. El nombre de las rutas moleculares, así como el número de genes regulados por los miARNs y el listado de miARNs que participan en la regulación de la ruta se describen en la siguiente en la tabla 17.

Tabla 17. Rutas de señalización en las que participan los miARNs desregulados en el grupo de pacientes con *escoliosis degenerativa* y el número de genes que regulan.

RUTA DE SEÑALIZACIÓN	P VALOR	Nº DE GENES REGULADOS	Nº DE miARNs QUE PARTICIPAN EN LA RUTA	NOMBRE DE LOS miARNs QUE PARTICIPAN EN LA RUTA
TGF- β	9.61e-06	41	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
Hippo	1.67e-09	69	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
PSCs	0.001	62	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
Biosíntesis de O-glicanos	8.21e-10	19	6	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
FoxO	6.22e-06	69	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
Uniones adherentes	1.67e-09	44	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
Neurotrofina	0.001	58	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
Hormonas tiroideas	0.02	52	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
Estrógenos	0.004	41	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
WNT	0.01	16	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
HIF	0.0006	53	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
PI3K-Akt	0.003	136	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
mTOR	0.01	30	8	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-99b-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p, miR-185-3p miR-199a-3p
Glicosaminoglicano queratán sulfato	0.01	7	6	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p miR-199a-3p
Formación de eje dorso ventral	0.01	7	6	miR-29a-3p, miR-96-5p, miR-122-5p, miR-125a-5p, miR-150-5p miR-199a-3p

Finalmente, los 13 miRs desregulados al comparar los dos grupos de pacientes entre si (pacientes con osteoporosis y pacientes con *escoliosis degenerativa*) participan en la regulación de hasta 55 rutas moleculares KEGG, predominando como en casos anteriores las vías de señalización de procesos tumorales y rutas relacionadas con el crecimiento y diferenciación celular, así

como con el metabolismo y remodelación ósea. El nombre de las rutas moleculares así como el número de genes regulados por los miARNs y el listado de miARNs que participan en la regulación de la ruta se describen a continuación en la tabla 18.

Tabla 18. Rutas de señalización en las que participan los miARNs comparando el grupo de pacientes con osteoporosis con el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa, así como el número de genes que regulan.

RUTA DE SEÑALIZACIÓN	P VALOR	Nº DE GENES REGULADOS	Nº DE miRNAs QUE PARTICIPAN EN LA RUTA	NOMBRE DE LOS miRNAs QUE PARTICIPAN EN LA RUTA
TGF- β	0.0002	10	45	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-181c-5p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
Hippo	3.54e-06	12	75	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-501-3p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-363-3p; miR-181c-5p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
PSCs	0.009	12	71	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-501-3p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-363-3p; miR-181c-5p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
FoxO	0.002	12	74	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-501-3p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-363-3p; miR-181c-5p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
Uniones adherentes	6.6e-07	11	51	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-363-3p; miR-181c-5p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
Hormonas tiroideas	1.36e-05	13	69	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-501-3p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-363-3p; miR-181c-5p; miR-4732-3p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
HIF	0.009	12	57	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-501-3p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-363-3p; miR-181c-5p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
PI3K-Akt	0.04	13	155	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-501-3p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-363-3p; miR-181c-5p; miR-4732-3p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
mTOR	0.02	12	34	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-501-3p; miR-181d-5p; miR-215-5p; miR-486-5p; miR-26b-5p; miR-363-3p; miR-181c-5p; miR-4732-3p; miR-381-3p; miR-30c-5p; miR-654-3p
Glicosaminoglicano condroitín sulfato/dermatán sulfato	0.0006	4	12	miR-125a-5p; miR-501-3p; miR-26b-5p; miR-654-3p
Formación del eje Dorso-ventral	0.008	8	19	miR-125a-5p; miR-99b-5p; miR-501-3p; miR-181d-5p; miR-26b-5p; miR-181c-5p; miR-30c-5p; miR-654-3p

En este punto hay que señalar, que aunque el miR-122-5p no fue uno de los miRNAs con expresión diferencial entre el grupo de pacientes con osteoporosis y el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa, como se observa en la figura 16, este miRNA también apareció enriquecido en todas las rutas obtenidas del análisis de enriquecimiento de esta comparación. Por lo que el miR-122-5p debe tener un papel clave en el metabolismo óseo.

En cualquier caso, para identificar rutas comunes entre los grupos y poder contextualizar biológicamente las rutas KEGG para cada uno de los grupos se procedió a realizar un diagrama de Venn para mostrar gráficamente la agrupación de elementos en conjuntos para cada uno de los grupos estudiados (Fig.17).

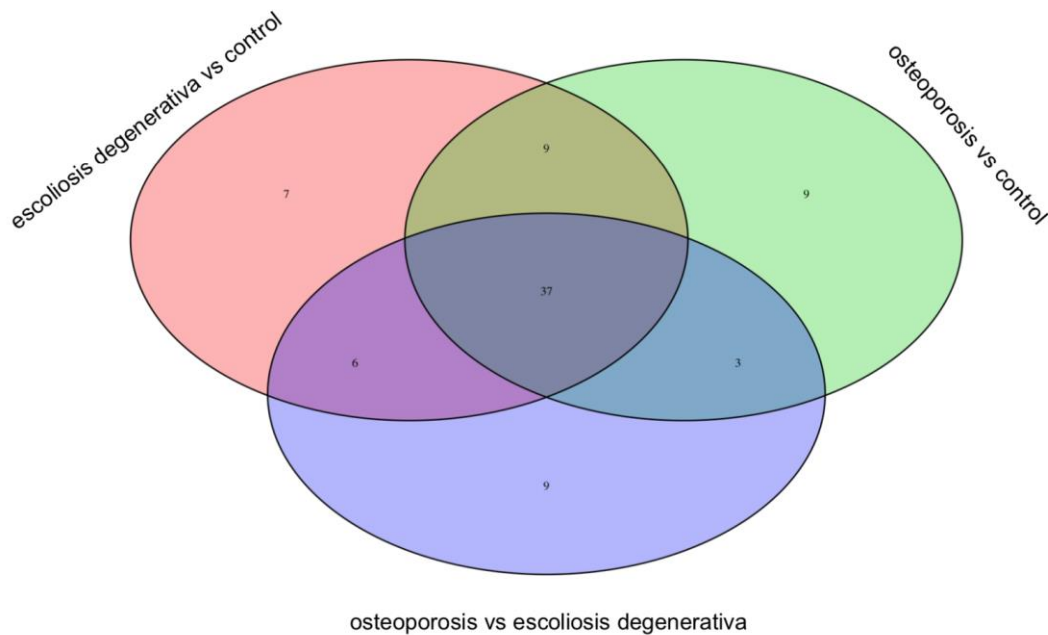


Figura 17. Diagrama de Venn donde se esquematiza el número de rutas desreguladas en el grupo de pacientes con osteoporosis y en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa respecto a las rutas desreguladas en el grupo de controles y comparados entre si.

Como podemos observar en el diagrama de Venn de la figura anterior, figura 17, la elipse rosa representa las 59 rutas identificadas para el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa. La elipse verde representa las 58 rutas afectadas en el grupo de pacientes con osteoporosis. Ambos grupos comparten 46 rutas, 9 de ellas relacionadas con el metabolismo óseo. Hay 13 rutas exclusivas para el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa, y de forma relevante dentro de ellas hay 5 rutas moleculares relacionadas con el sistema osteomioarticular: 1) ruta de biosíntesis de O-Glicanos, 2) ruta PI3K-Akt, 3) ruta de mTOR, 4) ruta de glicosaminoglicano queratán sulfato y 5) ruta de formación de eje dorso ventral. Para los pacientes de osteoporosis se detectaron hasta 12 rutas moleculares exclusivas y dentro de éstas, 3 implicadas en procesos óseos:

la ruta de biosíntesis de O-glicanos tipo mucina, la ruta de activación de la apoptosis y del factor de necrosis tumoral TNF.

Cuando se compararon los pacientes entre sí, se detectaron 55 rutas desreguladas (elipse azul), de las cuales una gran mayoría coinciden con las rutas desreguladas cuando los pacientes se comparan con los controles (43 en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa, y 40 en el grupo de pacientes con osteoporosis). Este análisis nos reveló las mismas rutas relacionadas con procesos óseos dentro de las rutas identificadas como exclusivas para el grupo de pacientes osteoporosis (3) y el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa (5), respectivamente.

En la tabla 19, se indica el patrón de expresión de cada uno de los miARNs y los genes identificados como dianas a través de la herramienta Tarbase (basada en datos validados experimentales).

Tabla 19. Panel de miARNs, genes y rutas implicadas en la homeostasia ósea desregulados en el grupo de pacientes con osteoporosis y en el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa (mirTarbase <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>).

Osteoporosis vs control			Osteoporosis vs OED			OED vs Control		
miR	Ruta	Gen	miR	Ruta	Gen	miR	Ruta	Gen
27b-3p	TGF-β, Hippo, PSC, FOX, Neurotrofin, Tiroides, Estrógeno, Apoptosis, WNT, HIF, TFN	TGFBRs, BMPs, BMPRs, SMADs, MAPK, FST, GSK3B, CCND1, CTNNB1, PIK3CB, WNT9, FOXO3, YAP, GALNT7	26b-5p	Hippo, Glycosaminoglicanos, Adherens Junction, FOXO, HIF, TGF-β, Estrógeno, Dorso ventral axis	BMP2, SMADs, BMPR, GSK3B, WNT, CCN2, CCND1, TGFBR, UST, CHST, PIK3R, LMO7, IGF1R, CCN, MAPK, AKT, FOX, SOS, IGF, MURF, FOS, JUN, CPEB3	29a-3p	Hippo, FoxO, TGF-β, HIF-1, PSC, Neurotrofin, PI3K-Akt, Estrógeno, WNT, mTOR, tiroides	ACTV, GSK3B, SMAD, APC, CCNDs, CTNNBIP1, TGFBR2, TGFBR, PIK3R3, FOXO, SMURF, HIF1A, MAPK, COL, JUN, LRP6, DKK1, B4GALT1, NOTCH, SOS
30a-5p		CXCL11, GALNT7, SMAD1, BMPs, TGFBRs, FST, CCND1, CTNNB1, CTGF, AKT, IGF, NOTCHs, PIK3CB, mTOR, MAPK, LRP6, EGFR	30c-5p		SMADs TGFBR, CCND1, BMPs, NOTCHs, PIK3R, CSNK2A2, IGF1R, MAPK, CAMK2D, VEGFA, JUN, NOTCHs, CEBP	96-5p		TGFBR, CCNDs, PPP2C, SIRT, IGF, MAPK, FOXO, IGF, COL, HIF, LRP6
122-5p		SOC1, AKT, PIK3CD, MAPK, IGF1R, MTOR, LRP6, WNT, CCND1, CTNNB1, EGFR, NOTCH, IRAK, TGFBR, SMAD, IGF1R	99b-5p		ACTG1, MTOR, IGF1R, RHOA, VEGFA, CALM2, SP1, ETV6	99b-5p		ACTG1, RHOA, IGF1R, MTOR, VEGFA, FGFR, IGF1R, PPP3R1,
192-5p		BMP, BMPR2, APC, CTGF, IRAKs, SATB2, SLC39A1, CTNNBIP1, IGF1R, WNT	125a-5p		BMPs, SMAD, AXIN, WNT, CTNN, CHPF2, ERBB2, FGFR1, MAPK, VEGFA, GABARAPL1, PPP2C, CUL1, CREB, Jun, SP1	122-5p		TGFBR, SMAD, WNT, BMPR, SOX, SOS, PIK3CD, MAPK, AKT, SMURF, RHOA, IGF, FGFR, COL, EGFR
194-5p		TGBR, BMPR, AXIN, CCNDs, IGF1R, CDKN1, JUN, SOST, ATF2,	181c/d-5p		BMPR2, CTGF, SMAF, TGFBR2, PPP2C, CHPF2, NOTCHs, PIK3R, EGFR, AKT, FOS, CREB, JUN, CPEB4	125a-5p		WNT, PPP2C, AXIN, CTNNB, CTNNA, BMP, SMAD, MAPK, VEGFA, FGFR, JUN, IRAK1, COL,
199a-5p		GSK3B, MAFB, JUN, ERBB2, SMAD, IRAK, KRAS, MYC, TGFBR	215-5p		ESR1, MED14, ADCY7	150a-5p		NOTCH3, SMAD, VEGFA, SP1, FGFR1, BMP, CDKN1B, PPP2C
215-5p		KIDINS220, ESR1, CTNNBIP1, TRAF	363-3p		NF2, DSE, CTNNB1, XYLT2, SLC16A10, CTNNB1, IRS2, CDKN1, ADCY7	185-3p		SMADs, CCND1, AKT, FOXO, MAPK, VEGFA, RAF, JAK, CDK6, COL, FOSL, NOTCH2
501-3p		CDK6, RHOA, GSK3B, CCND, BMP, NOTCH, FOXO, STAT3, BCL2, ATF2, BRAF, Stat3,	381-3p		GSK3B, BMPR, SMAD, TGFBR, WNT, SOX, FOXO, SMURF, RHOA, UST, IGF1R, ETS, CPEB, VEGFA	199a-3p		BMPs, TGFBR, PPP2R, PIK3C, MAPKs, CDKN1, MTOR, CDK6, CREB1, FOS
4732-3p		WNT, PI3KCB, KCNJ9, PPP1R12B y BBCs	486-5p		ACTB, SMAD, MET, SIRT, MAPK, RPS6KB1			
			501-3p		GSK3B, BMP, CCND2, DSE, HIF1, NOTCH, FOXO, CTNNB1, RHOA, GABARAPL2, STAT3, ATF2			
			654-3p		YWHA, MED, NOTCH, MAPK, CDKN1, CUL1			
			4732		WNT, PIK3CB, KCNJ9, ETV6			
Subregulado			Sobrerregulado					

4.3.2. Descripción individual del miR-99 y miR-122 identificados en el estudio de miRNA-seq.

El miR-122 presentó expresión diferencial en las comparaciones entre el grupo con osteoporosis y los controles; y entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control, pero no entre los grupos con osteoporosis y

escoliosis degenerativa. El miR-99 presentó expresión diferencial entre escoliosis degenerativa y controles, y osteoporosis y escoliosis degenerativa. El miR-122 debe tener un papel relevante en el metabolismo óseo. De hecho, la interacción de miR-122-5p con WNT1 y BMP4, impide la activación de la vía WNT/ β -catenina¹⁷⁸ y la diferenciación osteoblástica, lo que sustenta su asociación con enfermedades del tejido conectivo¹⁷⁹.

El miR-99b-5p se sobreexpresó en pacientes con osteoporosis comparado con los que sufrían escoliosis degenerativa, estos en cambio exhibieron menos niveles de expresión de este miARN respecto a los niveles de los controles. El miR-99b-5p se ha descrito formando parte de una firma de miARNs en osteosarcoma¹⁸⁰. Este miARN participa en las rutas TGF β , WNT, MAPK y AKT/mTOR¹⁸¹¹⁸². Recientemente, Ding *et al.*, mediante un análisis bioinformático en modelos de ratas ovariectomizadas en las que se indujo osteoporosis, identificó la expresión diferencial del miR-99b-5p y como este miARN inhibe la proliferación de los osteoblastos¹⁸³.

4.4. Validación de los microARNs con expresión diferencial entre los distintos grupos de estudio

4.4.1. Descripción de la muestra

Para este análisis se seleccionaron 27 muestras del grupo de casos (OSTEO_1 a OSTEO_28, nótese que existe un caso denominado OSTEO_23/24), 9 muestras del grupo de pacientes con escoliosis degenerativa (OSTEO_E1 a OSTEO_E9) y 30 muestras del grupo control (OSTEO_C1, OSTEO_C2, OSTEO_C4 a OSTEO_C31).

4.4.2. Descripción clínica

La edad media de los pacientes del grupo de casos fue de 65.56 ± 7.82 años (rango 58.5 -71 años), en el grupo de escoliosis degenerativa la edad media fue de 63.89 ± 7.08 años (rango 60-66 años) y en controles de 64.63 ± 6.56 años

(rango 61.25-69.5 años). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Respecto al IMC la media fue de 24.94 ± 4.31 (rango 21.39-27.32) en el grupo de casos, 26.88 ± 3.84 (rango 24.84-26.37) en el grupo de escoliosis degenerativa y 27.84 ± 4.6 (rango 24.77-31.53) en el grupo control. En el grupo de casos, 1 paciente fue clasificada como bajo peso, 14 pacientes con IMC normales, 8 como pacientes con sobrepeso y 4 como pacientes con obesidad tipo I. En el grupo de escoliosis degenerativa, 4 pacientes fueron clasificadas como pacientes con IMC normal, 3 como pacientes con sobrepeso y 1 como paciente con obesidad tipo I y 1 paciente como obesidad tipo II. En el grupo de controles, 10 pacientes fueron clasificadas como sujeto con IMC normal, 6 como sobrepeso y 4 como sujetos con obesidad tipo II. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de casos y controles con un p valor de 0.0183.

En el grupo de casos, 13 pacientes presentaron fractura vertebral, 2 pacientes presentaron fractura de radio distal y en 4 fractura de fémur proximal.

En cuanto a la presencia de diabetes mellitus tipo 2 como patología asociada, apareció en 5 pacientes del grupo de casos, 1 paciente del grupo de escoliosis degenerativa y 6 pacientes del grupo control, sin diferencias estadísticamente significativas entre cohortes.

Las características clínicas descritas se reflejan en la tabla 20.

Tabla 20. Datos clínicos sobre la edad, antropométricos, de localización de la fractura y el diagnóstico de DM2 en los pacientes estudiados.

	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N = 27	MEDIA (DE)	RANGO	N = 9	MEDIA (DE)	RANGO	N = 30	MEDIA (DE)	RANGO
EDAD (años)	27	65.56 (7.82)	12,5 (71 -58.5)	9	63.89 (7.08)	6 (66 – 60)	30	64.63 (6.56)	8.25 (69.5 - 61.25)
ANTROPOMETRÍA									
IMC (kg/m²)	27	24.94 (4.31)	5.93 (27.32 - 21.39)	9	26.88 (3.84)	1.53 (26.37 - 24.84)	30	27.84 (4.6)	6.76 (31.53 - 24.77)
CLASIFICACIÓN IMC	27			9			30		
BAJO PESO	1			0			0		
NORMAL	14			4			10		
SOBREPESO	8			3			9		
OBESIDAD TIPO I	4			1			6		
OBESIDAD TIPO II	0			1			4		
OBESIDAD TIPO III	0			0			0		
NA	0			0			1		
LOCALIZACIÓN DE LA FRACTURA	27								
VERTEBRAL	13								
RADIO DISTAL	3								
FÉMUR PROXIMAL	4								
DM2	27			9			30		
SI	5			1			6		
NO	22			8			23		

4.4.3. Descripción de los datos analíticos sobre parámetros del metabolismo óseo.

La media de los valores de beta-CTX en el grupo de casos fueron de 0.46 ± 0.21 ng/ml (rango 0.3-0.63 ng/ml) en el grupo de escoliosis degenerativa de 0.25 ± 0.17 ng/ml (rango 0.14-0.41 ng/ml) y en el grupo control de 0.28 ± 0.18 ng/ml (rango 0.14-0.4 ng/ml). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de casos y controles con un p valor de 0.001 y entre el grupo de casos y escoliosis degenerativa con un p valor de 0.008.

La media de los valores de P1NP en el grupo de casos fueron de 53.25 ± 24.33 ng/ml (rango 37.28-64.5 ng/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa de 59.8 ± 23.70 ng/ml (rango 40.73-76.15 ng/ml) y en el grupo control de 43.94 ± 17.25 ng/ml (rango 30.53-54.45 ng/ml). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La media de los valores de FA en el grupo de casos fue de 76.91 ± 26.37 U/L (rango 62-84 U/L), en el grupo de escoliosis degenerativa de 77.44 ± 16.43 U/L (rango 68-87 U/L) y en el grupo control de 76.04 ± 20.60 U/L (rango 61.5-90.25 U/L). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La media de los valores de 25OH-vitamina D en el grupo de casos fueron de 21.77 ± 8.24 ng/ml (rango 17.45-25.5 ng/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa los valores de 25OH-vitamina D fueron de 26.84 ± 12.36 ng/ml (rango 17.40-37.9 ng/ml) y en el grupo control de 24.34 ± 6.31 ng/ml (rango 20.45-26.80 ng/ml). Según la clasificación de la American Society of Endocrinology¹⁶⁵, en el grupo de casos, dos pacientes los valores de 25OH-vitamina D se clasificaron como valores suficientes, 15 casos como insuficientes y en 10 pacientes como valores deficientes. En el grupo de escoliosis degenerativa, en 3 pacientes se clasificó como suficiente, en 3 como insuficiente y en otros 3 como deficiente. En el grupo control, los valores de 4 pacientes se clasificaron como suficientes, los de 20 pacientes como insuficientes y los de 4 como deficientes. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

La media de los valores de PTH en el grupo de casos fue de 44.64 ± 16.04 pg/ml (rango 32.21-54.6 pg/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa los valores de PTH fueron de 44.56 ± 17.48 pg/ml (rango 32.3-57.61 pg/ml) y en el grupo control de 43.6 ± 22.4 pg/ml (rango 28.61-47.77 pg/ml). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

La media de los valores de FSH en el grupo de casos fue de 54.11 ± 6.77 mU/ml (rango 44.8-62.4 mU/ml), en el grupo de escoliosis degenerativa los valores de FSH fueron de 52.8 ± 24.65 mU/ml (rango 45.2-63.6 mU/ml), y en el grupo control de 55.91 ± 24.27 mU/ml (rango 42.6-67 mU/ml). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Todas las pacientes presentaron valores de FSH superiores a 10 mU/ml.

Los valores descritos se reflejan en la tabla 21.

Tabla 21. Datos analíticos sobre los parámetros del metabolismo óseo analizados en sangre periférica.

	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N = 27	MEDIA (DE)	RANGO	N = 9	MEDIA (DE)	RANGO	N = 30	MEDIA (DE)	RANGO
BETA-CTX (ng / ml)	26	0.46 (0.21)	0.325 (0.63 - 0.3)	9	0.25 (0.17)	0.27 (0.41 - 0.14)	28	0.28 (0.18)	0.26 (0.40 - 0.14)
P1NP (ng / ml)	26	53.25 (24.33)	27.23 (64.50 - 37.28)	9	59.8 (23.70)	35.43 (76.15 - 40.73)	26	43.94 (17.25)	23.92 (54.45 - 30.53)
FA (U / L)	24	76.91 (26.37)	22 (84 - 62)	9	77.44 (16.43)	19 (87 - 68)	26	76.04 (20.60)	28.75 (90.25 - 61.50)
25 (OH) VIT D	27	21.77 (8.24)	8.05 (25.5 - 17.45)	9	26.84 (12.36)	20.50 (37.90 - 17.40)	28	24.34 (6.31)	6.43 (26.80 - 20.45)
VALORES VIT D	27			9			30		
SUFICIENTES (> O IGUAL 30)	2			3			4		
INSUFICIENTES (20 - 29,9)	15			3			20		
DEFICIENTE (> 20)	10			3			4		
NA	0			0			2		
PTH (pg / ml)	27	44.64 (16.04)	22.395 (54.60 - 32.21)	8	44.56 (17.48)	25.31 (57.61 - 32.30)	29	43.60 (22.40)	19.16 (47.77 - 28.61)
FSH (mU / ml)	25	54.112 (6.77)	17.6 (62.40 - 44.80)	9	52.80 (24.65)	18.40 (63.60 - 45.20)	29	55.91 (24.27)	24.40 (67 - 42.60)

4.4.4. Descripción de los datos sobre la densitometría ósea.

Los análisis de densitometría ósea con localización lumbar y para el valor T-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -1.63 ± 3.1 DS (rango $-3.1 - (-1.3)$ DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de -0.7 ± 0.75 DS (rango $-1.5 - (-0.5)$ DS), y en el grupo de controles de -1.19 ± 1.01 DS (rango $-1.78 - (-0.60)$ DS). No existieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Para el valor Z-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -0.17 ± 1.62 DS (rango $-1.27 - 0.73$ DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de 1.08 ± 0.58 DS (rango $0.83 - 1.08$ DS), y en el grupo de controles de 0.5 ± 1.24 DS (rango $-0.5 - 1.45$ DS). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre grupos.

Analizando los resultados del valor T-score de la densitometría ósea lumbar, en el grupo de casos encontramos 4 pacientes clasificadas como normal, 10 como osteopenia y 10 como osteoporosis. En el grupo de escoliosis degenerativa encontramos 2 casos clasificados como normales y 4 casos como osteopenia. En el grupo control encontramos 11 casos clasificados como densitometría normal, 13 casos con osteopenia y dos casos con osteoporosis. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a esta clasificación entre el grupo de casos y el grupo control, con un p valor de 0.01.

Agrupando los pacientes según DMO patológica y no patológica en la localización lumbar, en el grupo de casos 14 pacientes presentan pruebas no patológicas y 10 patológicas, en el grupo de escoliosis degenerativa todos los casos fueron clasificados como no patológicos. En el grupo control 24 pacientes fueron clasificados como no patológicos y 2 como densitometrías patológicas. En esta cohorte, esta prueba presentaría una sensibilidad para la detección de una mala calidad ósea del 41.66%, con una especificidad del 92.30%. El valor predictivo positivo sería del 83.33% y el valor predictivo negativo del 85.71%.

Los análisis de densitometría ósea con localización en fémur proximal y para el valor T-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -1.84 ± 1.2 DS (rango $-2.63 - (-1.05)$ DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de -1.56 ± 0.96 DS (rango $-2.13 - (-1.13)$ DS), y en el grupo de controles de -1.19 ± 1.01 DS (rango $-1.8 - (-0.5)$ DS). Existieron diferencias estadísticamente significativas para este valor entre el grupo de casos y controles con un p valor de 0.04. Para el valor Z-score, fueron en el grupo de casos un valor medio de -0.29 ± 0.95 DS (rango $-1.03 - 0.3$ DS), en el grupo de escoliosis degenerativa de 0.2 ± 1.02 DS (rango $-0.73 - 0.8$ DS), y en el grupo de controles de 0.4 ± 0.76 DS (rango $-0.20 - 1$ DS). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de casos y controles con un p valor de 0.007.

Analizando los resultados del valor T-score de la densitometría ósea en fémur proximal, en el grupo de casos encontramos 7 pacientes clasificadas como densitometría normal, 7 como osteopenia y 10 como osteoporosis. En el grupo de escoliosis degenerativa encontramos 3 casos clasificado como normal y 4 casos como osteopenia y uno como osteoporosis. En el grupo control

encontramos 10 casos con DMO normal, 14 clasificados como osteopenia y dos como osteoporosis. Agrupando los pacientes según DMO patológica y no patológica, en el grupo de casos 14 pacientes presentan pruebas no patológicas y 10 patológicas, en el grupo de escoliosis degenerativa 7 casos fueron clasificados como no patológicos y uno como patológico, y en el grupo de controles 24 casos fueron clasificados como no patológicos y dos como patológicos. Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo coinciden con los calculados para la localización lumbar.

Los datos descritos se representan en la tabla 22.

Tabla 14. Resultados de las pruebas de densitometría ósea.

	CASOS			ESCOLIOSIS DEGENERATIVA			CONTROLES		
	N = 27	MEDIA (DE)	RANGO	N = 9	MEDIA (DE)	RANGO	N = 30	MEDIA (DE)	RANGO
LUMBAR	27			9			30		
T-SCORE	25	-1.63 (3.10)	1.80 (-1.3 – (- 3.1))	6	-0.70 (0.75)	0.55 (-0.5 – (- 1.05))	26	-1.19 (1.01)	1.18 (-0.6 – (- -1.78))
Z-SCORE	25	-0.167 (1.62)	2 (0.73 – (- 1.275))	6	1.08 (0.58)	0.25 (1.08 - 0.83)	26	0.50 (1.24)	1.95 (1.45 – (-0.5))
CLASIFICACIÓN DE LA OMS	27			9			30		
NORMAL	4			2			11		
OSTEOPENIA	10			4			13		
OSTEOPOROSIS	10			0			2		
NA	3			3			4		
DMO NO PATOLÓGICA									
DMO PATOLÓGICA									
NA									
FÉMUR PROXIMAL	27			9			30		
T-SCORE	24	-1.84 (1.12)	1.58 (-1.05 – (- -2.63))	8	-1.56 (0.96)	1 (-1.125 – (- 2.13))	26	-1.19 (1.01)	1.3 (-0.5 – (- 1.8))
Z-SCORE	24	-0.29 (0.95)	1.33 (0.3 – (- 1.03))	8	0.2 (1.014)	1.53 (0.8 – (- 0.73))	26	0.40 (0.76)	1.2 (1.0 – (- 0.2))
CLASIFICACIÓN DE LA OMS	27			9			30		
NORMAL	7			3			10		
OSTEOPENIA	7			4			14		
OSTEOPOROSIS	10			1			2		
NA	3			2			4		
DMO NO PATOLÓGICA	14			7			24		
DMO PATOLÓGICA	10			1			2		
NA	3			2			4		

En la tabla 23 se observa el análisis estadístico de los datos recogidos.

Tabla 23. Análisis estadístico de los datos clínicos recogidos.

	CASOS VS CONTROLES P-VALOR	ESCOLIOSIS VS CONTROLES P-VALOR	CASOS VS ESCOLIOSIS P-VALOR
EDAD	0.6336	0.9312	0.5603
IMC	0.0183	0.4355	0.2227
CLASIFICACIÓN IMC	0.1946	0.1055	0.1693
DM2	0.8381	0.5775	0.6056
BETA - CTX	0.001885	0.8399	0.008089
P1NP	0.1181	0.09611	0.5102
FA	0.8986	0.9427	0.946
25 (OH) VIT D	0.2003	0.5892	0.2757
VALORES DE VIT D	0.1083	0.1009	0.2471
PTH	0.8412	0.7391	0.9915
FSH	0.7502	0.7414	0.8852
T-SCORE LUMBAR	0.5044	0.3405	0.1877
Z-SCORE LUMBAR	0.1098	0.1754	0.005368
CLASIFICACIÓN DE LA OMS LUMBAR	0.01153	0.6668	0.1489
T-SCORE FÉMUR	0.03956	0.3152	0.5137
Z-SCORE FÉMUR	0.007221	0.6966	0.2526
CLASIFICACIÓN DE LA OMS FÉMUR	0.03552	0.93	0.465

4.4.5. Resultados de validación de miARNs por RT-qPCR.

En un primer momento, se procedió a la validación de 4 miRNAs: 215, 185, 122 y 99, por aparecer con expresión diferencial en algunas de las comparaciones realizadas entre los grupos de estudio evaluados por smallRNA-seq y estar implicados en procesos relacionados con la osteoporosis y otras patologías óseas. Los miR-215 y miR-185 no se encontraron expresados en las muestras a validar, por lo que finalmente sólo se analizaron el miR-122 y el miR-99.

El miR-122 presentó expresión diferencial en las comparaciones entre el grupo con osteoporosis y los controles; y el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control, pero no entre los grupos con osteoporosis y escoliosis degenerativa. El miR-99, presentó expresión diferencial entre escoliosis degenerativa y controles y osteoporosis y escoliosis degenerativa.

4.4.5.1. Comparativa incluyendo todas las muestras.

Al analizar los niveles de expresión de miR-122 en los pacientes con fractura osteoporótica, escoliosis degenerativa y grupo control, se observó una tendencia a la subexpresión de valores en el grupo de pacientes con fractura osteoporótica, respecto al grupo control y al grupo de pacientes con escoliosis degenerativa, aunque sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas. La misma tendencia se encontró para miR-99 en el grupo de pacientes con fractura osteoporótica respecto a los otros dos grupos (Fig. 18).

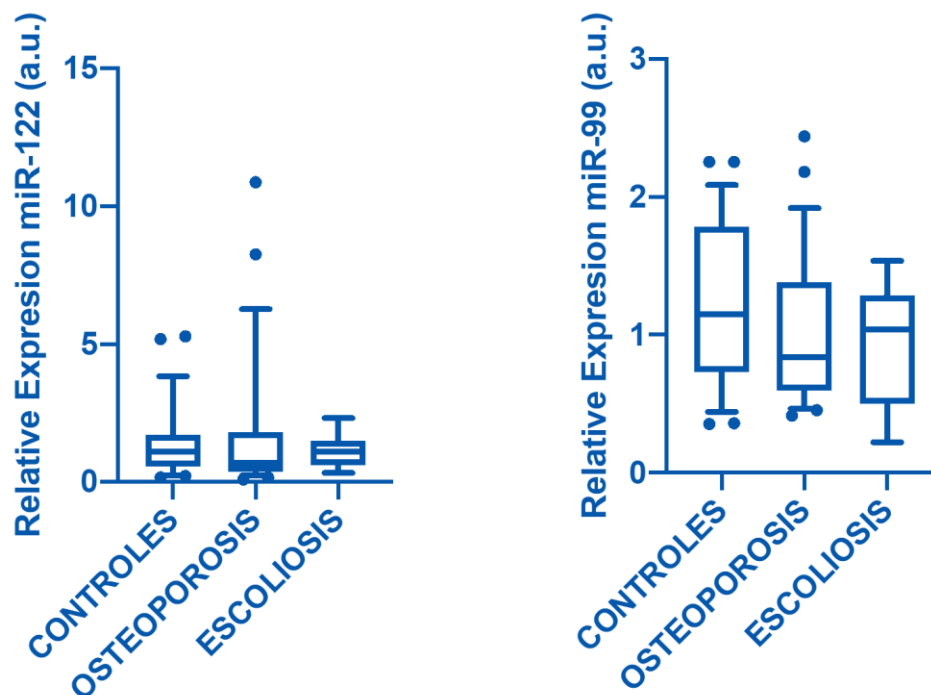


Figura 18. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en el grupo control, grupo con fractura osteoporótica y grupo con escoliosis degenerativa. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

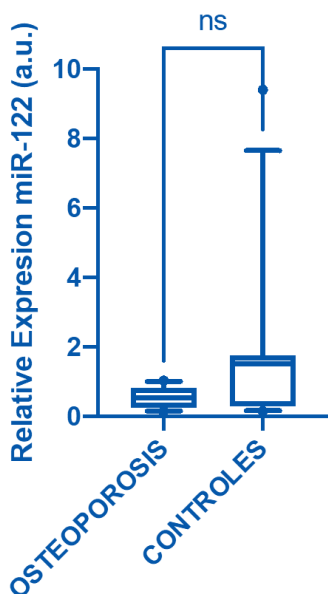
En base a estos resultados, se decidió realizar un análisis de la expresión del miR-122 y el miR-99 en grupos de pacientes en función de la presencia de DM2, del IMC y de los valores de vitamina D, ya que se trata de factores que se ha observado en la literatura que pueden afectar a la calidad ósea.

4.4.5.2. Comparativas según la presencia de DM2.

Se analizó la expresión de miR-122 y miR-99 en los tres grupos descritos en función de la afectación o no de los pacientes de DM2.

Al analizar la expresión de ambos miARNs en pacientes con DM2 en el grupo de pacientes con fractura osteoporótica respecto al grupo control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias en este análisis en el grupo de pacientes que no presentaba esta enfermedad (Fig. 19 y Fig.20).

DM2 SI osteoporosis vs Control



DM2 SI osteoporosis vs Control

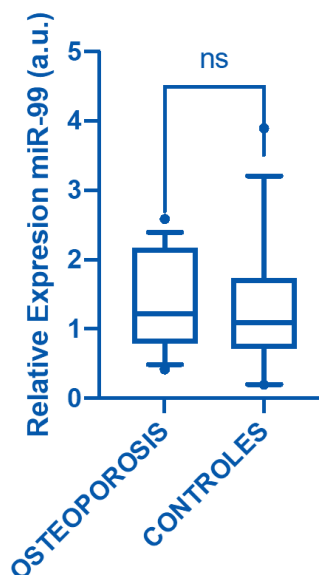


Figura 19. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con DM2. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.

DM2 NO osteoporosis vs Control

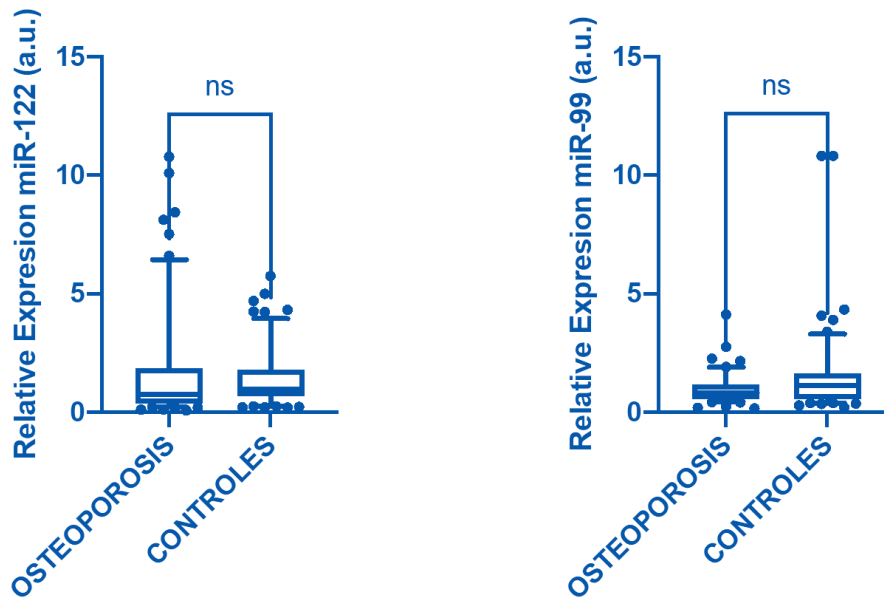


Figura 20. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes sin DM2. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.

Al realizar el análisis de expresión de miR-122 y miR-99 en los pacientes que no presentaban DM2, comparando el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa respecto el grupo control, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 21).

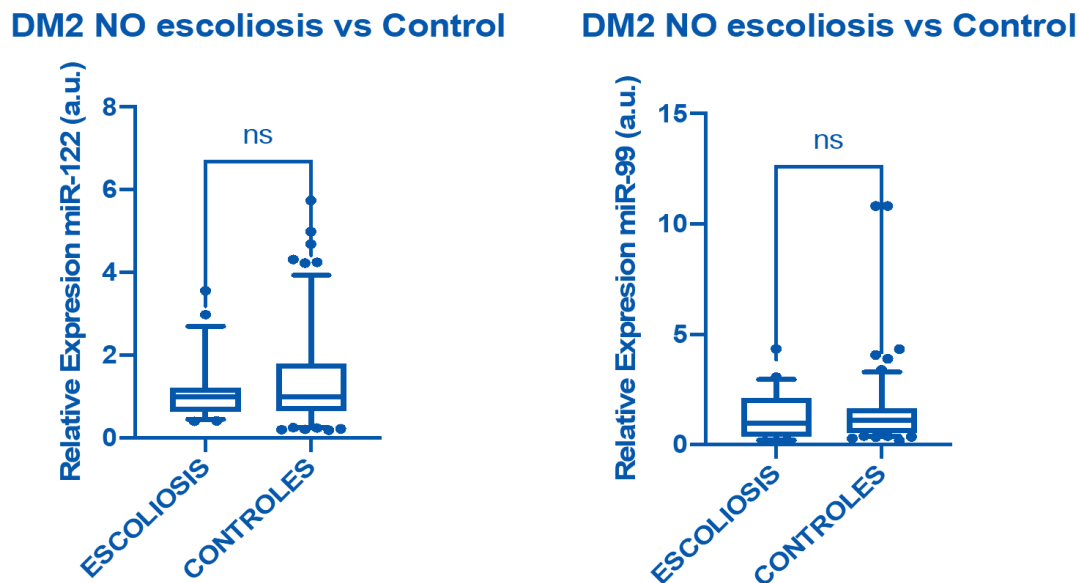


Figura 21. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes sin DM2. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.

4.4.5.3. Comparativas según IMC.

Al realizar los análisis del miR-122 y miR-99 según el IMC se evaluó por un lado el grupo de pacientes con valores de IMC normales o disminuidos, y por otro el grupo de pacientes con valores de IMC aumentados.

Cuando se hicieron los subgrupos en función de si los pacientes mostraban IMC normal o disminuido no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de pacientes con fractura osteoporótica versus el grupo control, tanto para el miR-122 como para el miR-99 (Fig. 22). Sin embargo, para el grupo de pacientes con un IMC aumentado, sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas para el miR-99, encontrando una subexpresión en el grupo con fractura osteoporótica respecto al grupo control. Estas diferencias no se observaron para el miR-122 (Fig.23).

NORMAL+DISMINUIDO osteoporosis vs Control NORMAL+DISMINUIDO osteoporosis vs Control

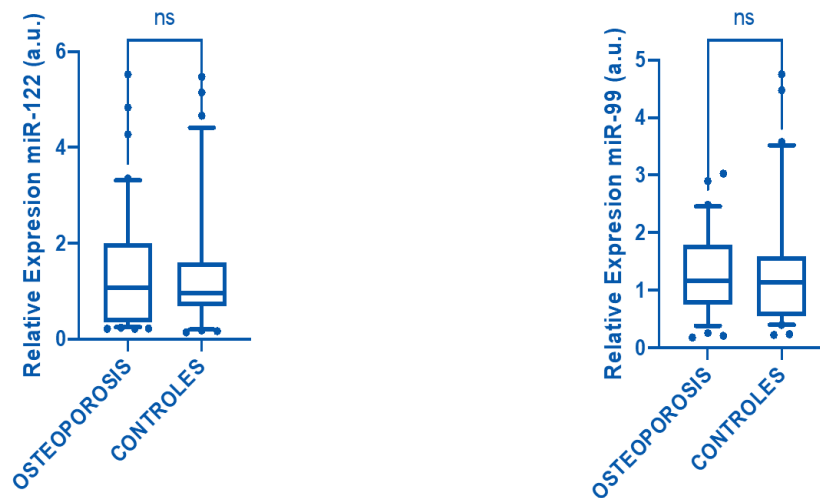
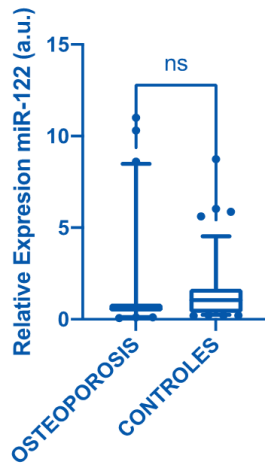


Figura 22. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con IMC normal o disminuido. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.

AUMENTADO osteoporosis vs Control



AUMENTADO osteoporosis vs Control

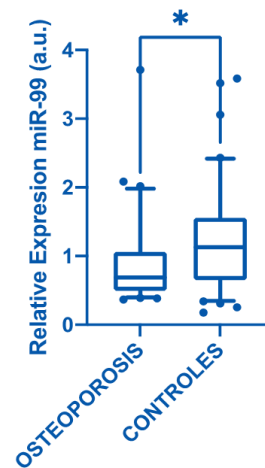
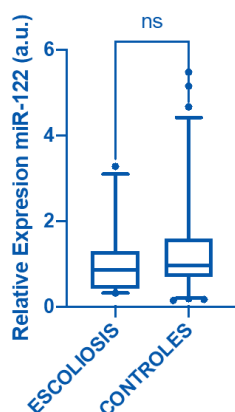


Figura 23. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con IMC aumentado. Se observan diferencias estadísticamente significativas para miR-99 entre el grupo de pacientes con fractura osteoporótica y el grupo control. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante las pruebas U de Mann-Whitney. El valor de P se indica mediante: *p < 0.05.

En el grupo de pacientes con valores de IMC considerados normales o disminuidos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa en comparación con el grupo control para ninguno de los miARNs estudiados. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas al realizar estos análisis en el grupo de pacientes con valores de IMC aumentados (Fig. 24 y Fig. 25).

NORMAL+DISMINUIDO escoliosis vs Control



NORMAL+DISMINUIDO escoliosis vs Control

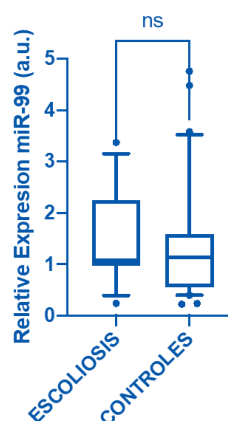
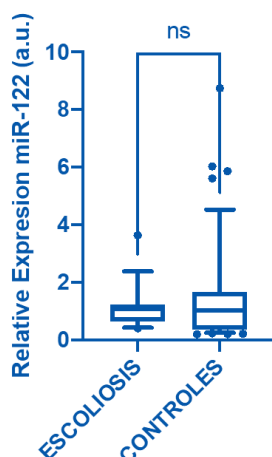


Figura 24. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con IMC normal o disminuido. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.

AUMENTADO escoliosis vs Control



AUMENTADO escoliosis vs Control

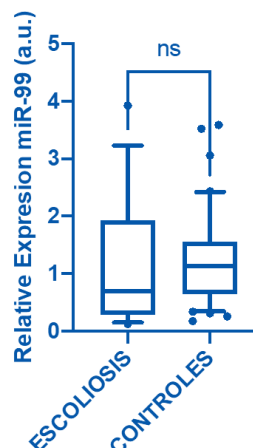


Figura 25. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con IMC aumentado. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.

4.4.5.4. Comparativas según los niveles de vitamina D.

Al realizar los análisis del miR-122 y miR-99 según los niveles de vitamina D, se evaluó por un lado el grupo de pacientes con valores normales o insuficientes, y por otro, el grupo de pacientes con valores establecidos como deficientes.

En el grupo de pacientes con valores de vitamina D normales o insuficientes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de pacientes con fractura osteoporótica versus el grupo control, ni para el miR-122, ni para el miR-99 (Fig. 26). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas para el grupo de pacientes con valores de vitamina D clasificados como deficientes, sin embargo, sí se observó una tendencia a la subexpresión del miR-122 en el grupo de pacientes con fractura osteoporótica (Fig. 27).

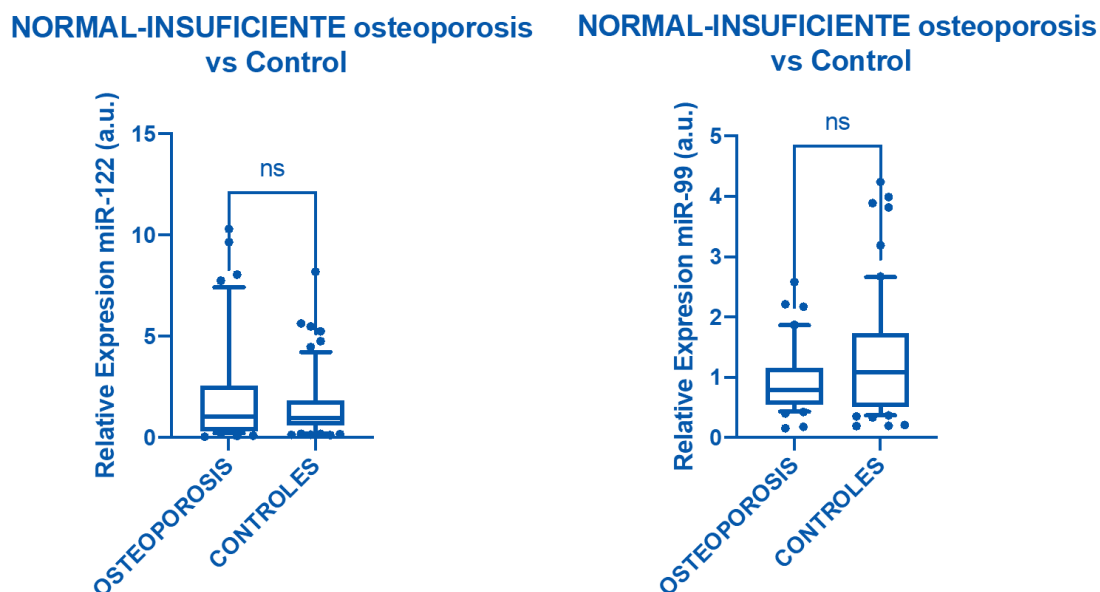
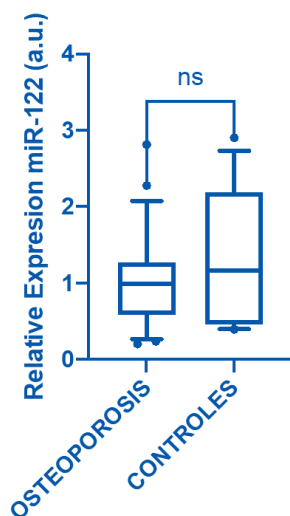


Figura 26. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con niveles de vitamina D normales o insuficientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.

DEFICIENCIA osteoporosis vs Control



DEFICIENCIA osteoporosis vs Control

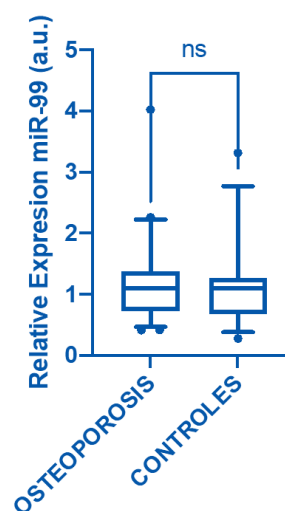
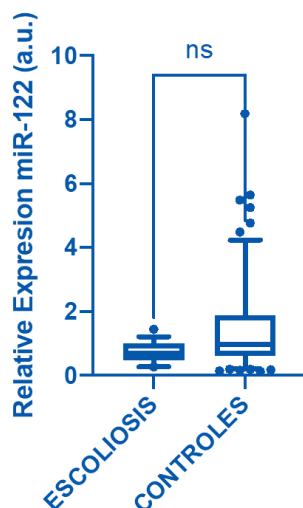


Figura 27. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con niveles de vitamina D deficientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con fractura osteoporótica y el grupo control.

NORMAL-INSUFICIENTE escoliosis vs Control



NORMAL-INSUFICIENTE escoliosis vs Control

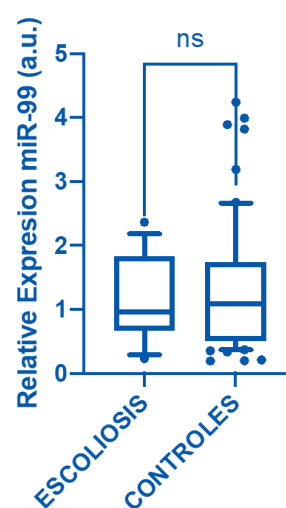


Figura 28. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con niveles de vitamina D normales o insuficientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.

Al analizar los pacientes con valores de vitamina normales o insuficientes, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del miR-122 y del miR-99 al comparar los grupos de con escoliosis degenerativa versus los grupos control (Fig. 28). Tampoco se observaron diferencias en el grupo de pacientes con valores de vitamina D clasificados como deficientes (Fig. 29).

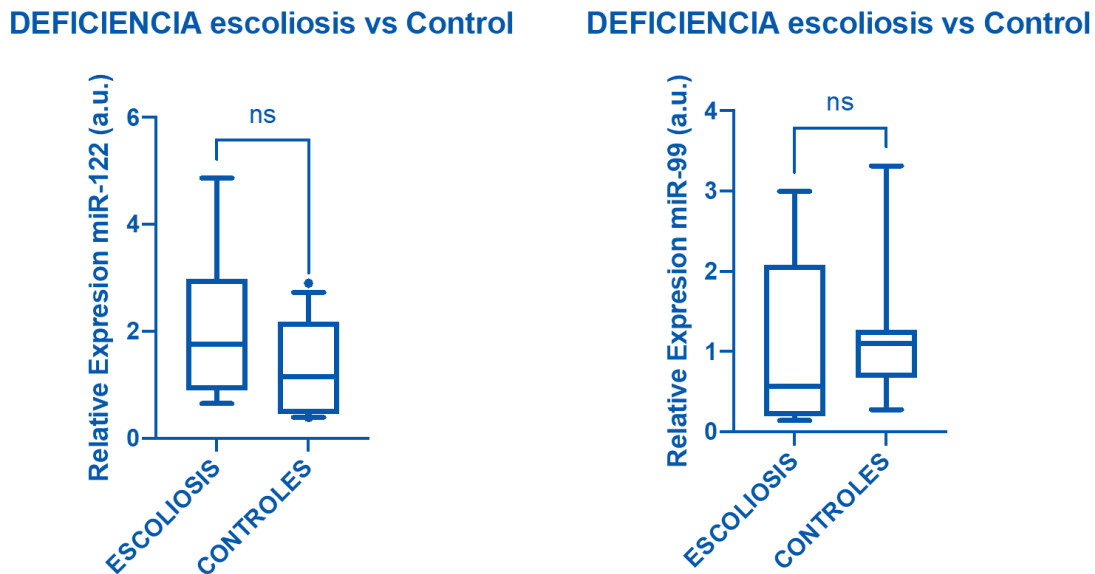


Figura 29. Niveles de expresión de miR-122 y miR-99 en pacientes con niveles de vitamina D deficientes. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo con escoliosis degenerativa y el grupo control.

4.4.5.5. Curva ROC de miR-99 en los pacientes con IMC aumentado y su comparativa con la densitometría ósea

Al encontrar en el grupo de pacientes con un IMC aumentado diferencias estadísticamente significativas en los niveles circulantes en plasma del miR-99, observando una subexpresión en el grupo con fractura osteoporótica respecto al grupo control, se decidió la elaboración de una curva ROC para evaluar la capacidad discriminativa del miR-99 para identificar a los pacientes con una mala calidad ósea.

El área bajo la curva en esta determinación fue de 0.65 con un error estándar de 0.06 y un intervalo de confianza de 95% de 0.53 a 0.77 (p valor=0.02). Por lo tanto, a pesar de presentar un p valor significativo, según el área debajo de la curva descrita clasificaríamos el test como regular¹⁸⁴(Fig.30).

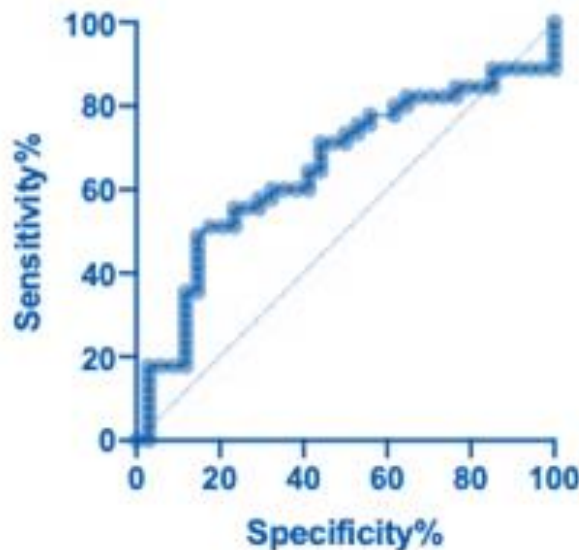


Figura 30. Curva ROC para el miR-99 en pacientes con IMC aumentado para discriminar entre pacientes de grupo de casos, y pacientes del grupo control.

Al presentar en las cohortes analizadas en este estudio la densitometría ósea unos valores de sensibilidad bajos, con un rango entre 0 y 50%, con unos valores de especificidad altos con un rango entre 92.3 y 100%. Decidimos seleccionar un *cut-off value* > 0.4870 con una sensibilidad del 84.44% y una especificidad del 23.53%, buscando aumentar la sensibilidad para ser capaces de identificar a los individuos enfermos (Tabla 24).

Tabla 24. Valores de sensibilidad y especificidad según los diferentes *cut-off values* para evaluar la capacidad discriminativa de los valores de miR-99 en plasma entre el grupo de pacientes con fractura patológica y el grupo control.

Cutoff	Sensibilidad%	95% CI	Especificidad%	95% CI
> 0.2170	97,78	88,43% to 99,89%	0	0,000% to 10,15%
> 0.2825	95,56	85,17% to 99,21%	0	0,000% to 10,15%
> 0.3250	93,33	82,14% to 97,71%	0	0,000% to 10,15%
> 0.3460	91,11	79,27% to 96,49%	0	0,000% to 10,15%
> 0.3600	88,89	76,50% to 95,16%	0	0,000% to 10,15%
> 0.3765	88,89	76,50% to 95,16%	2,941	0,1509% to 14,92%
> 0.3880	88,89	76,50% to 95,16%	5,882	1,045% to 19,09%
> 0.3995	88,89	76,50% to 95,16%	8,824	3,047% to 22,96%
> 0.4120	88,89	76,50% to 95,16%	11,76	4,671% to 26,62%
> 0.4270	88,89	76,50% to 95,16%	14,71	6,449% to 30,13%
> 0.4420	86,67	73,82% to 93,74%	14,71	6,449% to 30,13%
> 0.4525	84,44	71,22% to 92,25%	14,71	6,449% to 30,13%
> 0.4630	84,44	71,22% to 92,25%	17,65	8,349% to 33,51%
> 0.4765	84,44	71,22% to 92,25%	20,59	10,35% to 36,80%
> 0.4870	84,44	71,22% to 92,25%	23,53	12,44% to 40,00%
> 0.4925	82,22	68,67% to 90,71%	23,53	12,44% to 40,00%
> 0.4975	82,22	68,67% to 90,71%	26,47	14,60% to 43,12%
> 0.5055	82,22	68,67% to 90,71%	29,41	16,83% to 46,17%
> 0.5270	82,22	68,67% to 90,71%	32,35	19,13% to 49,16%
> 0.5445	82,22	68,67% to 90,71%	35,29	21,49% to 52,09%
> 0.5550	80	66,18% to 89,10%	35,29	21,49% to 52,09%
> 0.5690	80	66,18% to 89,10%	38,24	23,90% to 54,96%
> 0.5885	77,78	63,73% to 87,46%	38,24	23,90% to 54,96%
> 0.6200	77,78	63,73% to 87,46%	44,12	28,88% to 60,55%
> 0.6490	75,56	61,33% to 85,76%	44,12	28,88% to 60,55%
> 0.6610	75,56	61,33% to 85,76%	47,06	31,45% to 63,26%
> 0.6655	73,33	58,96% to 84,04%	47,06	31,45% to 63,26%
> 0.6800	73,33	58,96% to 84,04%	50	34,07% to 65,93%
> 0.7000	71,11	56,63% to 82,27%	50	34,07% to 65,93%
> 0.7165	71,11	56,63% to 82,27%	52,94	36,74% to 68,55%
> 0.7260	71,11	56,63% to 82,27%	55,88	39,45% to 71,12%
> 0.7300	68,89	54,34% to 80,47%	55,88	39,45% to 71,12%
> 0.7355	66,67	52,07% to 78,64%	55,88	39,45% to 71,12%
> 0.7580	64,44	49,84% to 76,78%	55,88	39,45% to 71,12%
> 0.8065	64,44	49,84% to 76,78%	58,82	42,22% to 73,63%
> 0.8415	62,22	47,63% to 74,89%	58,82	42,22% to 73,63%

> 0.8695	60	45,45% to 72,98%	58,82	42,22% to 73,63%
> 0.8995	60	45,45% to 72,98%	61,76	45,04% to 76,10%
> 0.9125	60	45,45% to 72,98%	64,71	47,91% to 78,51%
> 0.9290	60	45,45% to 72,98%	67,65	50,84% to 80,87%
> 0.9630	57,78	43,30% to 71,03%	67,65	50,84% to 80,87%
> 0.9885	57,78	43,30% to 71,03%	70,59	53,83% to 83,17%
> 0.9985	55,56	41,18% to 69,06%	70,59	53,83% to 83,17%
> 1.031	55,56	41,18% to 69,06%	73,53	56,88% to 85,40%
> 1.062	55,56	41,18% to 69,06%	76,47	60,00% to 87,56%
> 1.072	53,33	39,08% to 67,06%	76,47	60,00% to 87,56%
> 1.081	51,11	37,00% to 65,04%	76,47	60,00% to 87,56%
> 1.103	51,11	37,00% to 65,04%	79,41	63,20% to 89,65%
> 1.126	51,11	37,00% to 65,04%	82,35	66,49% to 91,65%
> 1.139	48,89	34,96% to 63,00%	85,29	69,87% to 93,55%
> 1.148	46,67	32,94% to 60,92%	85,29	69,87% to 93,55%
> 1.165	44,44	30,94% to 58,82%	85,29	69,87% to 93,55%
> 1.194	42,22	28,97% to 56,70%	85,29	69,87% to 93,55%
> 1.230	40	27,02% to 54,55%	85,29	69,87% to 93,55%
> 1.267	37,78	25,11% to 52,37%	85,29	69,87% to 93,55%
> 1.285	35,56	23,22% to 50,16%	85,29	69,87% to 93,55%
> 1.310	35,56	23,22% to 50,16%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.351	33,33	21,36% to 47,93%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.378	31,11	19,53% to 45,66%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.407	28,89	17,73% to 43,37%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.436	26,67	15,96% to 41,04%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.558	24,44	14,24% to 38,67%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.686	22,22	12,54% to 36,27%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.789	20	10,90% to 33,82%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.912	17,78	9,294% to 31,33%	88,24	73,38% to 95,33%
> 1.980	17,78	9,294% to 31,33%	91,18	77,04% to 96,95%
> 2.051	17,78	9,294% to 31,33%	94,12	80,91% to 98,95%
> 2.088	17,78	9,294% to 31,33%	97,06	85,08% to 99,85%
> 2.128	15,56	7,745% to 28,78%	97,06	85,08% to 99,85%
> 2.243	13,33	6,257% to 26,18%	97,06	85,08% to 99,85%
> 2.366	11,11	4,840% to 23,50%	97,06	85,08% to 99,85%
> 2.421	8,889	3,511% to 20,73%	97,06	85,08% to 99,85%
> 2.745	6,667	2,293% to 17,86%	97,06	85,08% to 99,85%
> 3.288	4,444	0,7897% to 14,83%	97,06	85,08% to 99,85%
> 3.551	2,222	0,1140% to 11,57%	97,06	85,08% to 99,85%
> 3.648	0	0,000% to 7,865%	97,06	85,08% to 99,85%

Aplicando este valor de corte a nuestra muestra de pacientes con IMC elevado, calculamos la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo tanto del miR-99 a estudio, como de los valores de densitometría con valor T-score tanto en lumbar como en fémur proximal (Tabla 25).

Tabla 25. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la cohorte de pacientes de validación con IMC aumentado según el miR-99 y la densitometría ósea en localización lumbar y fémur proximal.

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VALOR PREDICTIVO POSITIVO	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO
miR-99	83.34%	11.76%	40%	50%
DMO LUMBAR	0	100%	0	62.77%
DMO FÉMUR PROX	20%	94.1%	66.66%	66.66%

DISCUSIÓN

5.DISCUSIÓN

4.5. Datos analíticos y valores de densitometría ósea.

4.5.1.1. Valores P1NP y beta-CTX en pacientes con fractura por fragilidad y grupo control

Los valores de P1NP y beta-CTX, son considerados los marcadores de recambio óseo más aceptados en la actualidad. El primero se considera un marcador de formación y el segundo de reabsorción ósea, ambos han mostrado un aumento en sus valores en sangre periférica tras un episodio de fractura¹⁸⁵. En esta tesis, al comparar los valores medios de las variables analíticas determinadas en sangre periférica entre el grupo control y el grupo con fractura patológica, se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto en los valores de beta-CTX, como en los de P1NP siendo los valores más altos en el grupo fracturado (beta-CTX 0.51 ± 0.2 vs 0.24 ± 0.16 ng/ml, P1NP: 65.94 ± 25.31 vs 44.38 ± 15.21 ng/ml) en la cohorte de pacientes analizada para el estudio de los niveles de esclerostina y la metilación del gen *SOST*. Este aumento de beta-CTX entre el grupo de fractura y el control se repite en la cohorte de validación que incluye un mayor número de pacientes. Estos resultados coinciden con la bibliografía publicada sobre el tema^{186–188}. En la cohorte en la que se realizaron los estudios secuenciación masiva de microARNs no se observó esta relación probablemente por el bajo número de pacientes incluidos en esta parte del estudio.

Si comparamos los datos del grupo control con los resultados del estudio de cohortes de Camargo *et al.*, en el que estos autores trataban de determinar valores de referencia para estos dos parámetros en mujeres postmenopáusicas españolas, encontramos cifras comparables en cuanto a las medias de ambos parámetros (beta-CTX: 0.24 ± 0.16 vs 0.38 ± 0.19 ng/ml, P1NP: 44.38 ± 15.21 vs 47.7 ± 19.9 ng/ml)¹⁸⁶. Si se observan los valores de los rangos tanto de este estudio, como de los resultados obtenidos por Camargo *et al.*, observamos una

importante dispersión en los datos. Esto puede ser debido a la dificultad descrita en la literatura para estandarizar la toma de muestras y la interpretación de los resultados, debido a la importante variabilidad que existe tanto en la recogida y el procesamiento de la sangre periférica, como en las variables relacionadas con la situación del pacientes, como su patología de base, su situación hormonal, la época del año y la localización geográfica ⁶⁴.

En cuanto a la utilización de estos parámetros como predictores de fractura, existe una relación significativa aunque modesta en la literatura actual ^{62,65}, aunque con la importante variabilidad de estos parámetros, que puede hacer que sea difícil llegar a conclusiones de calidad científica que nos permitan utilizarlos en la práctica clínica habitual. Además, son marcadores que se han descrito que aumentan tras una rotura ósea y no marcadores predictivos de rotura. En nuestro estudio no hemos podido determinar el papel de estos marcadores como predictores de fractura ya que se trata de un estudio observacional no prospectivo y, por tanto, nuestro grupo de casos ya estaban diagnosticados con una fractura de baja energía.

4.5.1.2. Valores P1NP y beta-CTX en pacientes con escoliosis degenerativa y grupo control

En nuestro estudio encontramos valores más altos tanto de P1NP como de beta-CTX en el grupo de escoliosis degenerativa respecto al grupo control con diferencias estadísticamente significativas (beta-CTX 0.28 ± 0.20 vs 0.24 ± 0.16 ng/ml, P1NP: 71 ± 23.46 vs 44.38 ± 15.21 ng/ml) en la cohorte de pacientes para el estudio de los niveles de esclerostina y la metilación del gen *SOST*. Sin embargo, esta relación no se observa en el resto de cohortes, identificándose únicamente un aumento de valores en el grupo fracturado respecto al grupo con escoliosis degenerativa en la cohorte de validación. No existen en la literatura trabajos que estudien los valores de marcadores del recambio óseo en pacientes con escoliosis degenerativa, sin embargo, sí que encontramos algunos estudios sobre estos valores en escoliosis idiopática del adolescente. El grupo de Zhang *et al.* en un estudio prospectivo, describieron una relación entre el aumento de estos valores y el riesgo de progresión de la curva¹⁸⁹. Serán necesarios futuros

estudios prospectivos para determinar si esta relación también aparece en los pacientes con escoliosis degenerativa del adulto.

4.5.1.3. Densitometría ósea

En nuestro estudio, analizando los T-scores en las densitometrías óseas de localización lumbar y fémur proximal, en las tres cohortes analizadas, la prueba presentó una sensibilidad menor o igual al 50%, con una especificidad en torno al 100% en todos los grupos. El valor predictivo positivo estaría por encima del 80% en las tres cohortes y el valor predictivo negativo del 39.28% en la cohorte de estudio de los niveles de esclerostina y metilación del gen *SOST*, aumentando hasta el 85.71% en la cohorte de validación. Es decir, entre los casos con fractura de baja energía, la prueba sólo fue capaz de identificar menos del 50% de los casos, sin embargo, su especificidad resultó estar en torno al 100%, es decir, la mayoría de los controles tuvieron resultados negativos. Si analizamos los resultados de los valores predictivos en nuestro estudio, cuando tenemos una prueba positiva podemos asegurar que nos encontramos con un caso, pero ante un resultado negativo no podemos confirmar que se trate de un sujeto sano.

Stone *et al.* reportan que usando la definición estándar de osteoporosis (T-score menor e igual a -2,5 DS) en su estudio en el que analizan 9.704 mujeres durante más de 8 años, sólo podrían atribuir un 28% de las fracturas de cadera y un 21 % de las fracturas vertebrales a la definición clásica de osteoporosis. En este mismo estudio, ampliando los límites de la densitometría ósea a la definición de osteopenia (T-score menos o igual a -1.5 DS), sólo explicaría del 12 al 53% de las fracturas si nos basamos en las densitometrías óseas realizadas en la cadera y entre el 6 y el 51% de las mismas si nos basamos en las realizadas en raquis lumbar ⁴¹. En el estudio de Lin *et al.* analizan 93 fracturas vertebrales tratadas mediante vertebroplastia percutánea, en 61 de esos pacientes no se produce un fenómeno de pérdida de altura tras el tratamiento y el rango de valores de T-score en fémur proximal en este grupo son de entre -2.1 y -0.3, es decir, ninguno de los pacientes presentaba valores compatibles con osteoporosis ¹⁹⁰. Otros autores también reportaron resultados similares, con una capacidad

de predicción menor del 50% ^{42,43}, reflejando los problemas de esta prueba para predecir que individuos sufrirán una fractura de baja energía ⁴⁴.

Por lo tanto, lo que se refleja en nuestro estudio y en la literatura es que, al presentar una baja sensibilidad para la determinación de fracturas de baja energía, no es adecuado recomendar su realización como método de cribado para intentar identificar en la población general pacientes con mala calidad ósea.

4.6. Niveles y regulación de la esclerostina en los pacientes con osteoporosis y con escoliosis degenerativa.

Aunque la literatura reciente no ha aclarado cuáles deberían ser los niveles de esclerostina en las pacientes con osteoporosis, los niveles de esclerostina deberían estar aumentados en los pacientes con mala calidad ósea, ya que mediante la inhibición de vía de la *Wnt/beta-catenina* disminuiría la formación ósea¹²¹. Además, según el trabajo de Drake *et al.* los niveles de esclerostina en sangre periférica tendrían correspondencia con los encontrados a nivel óseo ¹⁹¹, por lo que podrían servir como marcadores de fragilidad.

En este trabajo de tesis doctoral se ha observado una tendencia a la disminución de los niveles de esclerostina circulante en plasma en el grupo con fractura de baja energía, aunque sin diferencias estadísticamente significativas para un p valor de 0.05.

Son pocos los trabajos en la literatura donde se comparan los niveles de esclerostina en suero en los pacientes con fractura de baja energía respecto a un grupo control, ya que la mayoría de los trabajos sobre este tema, clasifican al paciente osteoporótico como aquel con una densitometría patológica, a pesar de que como se muestra en nuestro estudio, está no es capaz de caracterizar a los pacientes de nuestro grupo de casos. Ardawi *et al.* realizaron un estudio con 569 pacientes en el que sí que encontraron valores elevados de esclerostina en los pacientes con fractura osteoporótica respecto al grupo control con una media de 77.7 +/- 12.3 pmol/L en el grupo de casos comparada con una media de 50.1 +/- 13.1 pmol/L en el grupo control ¹⁵⁴. Sin embargo, el grupo de Lim *et al.* con 103 mujeres postmenopáusicas estudiadas, encontró niveles más bajos en el

grupo con fractura de baja energía ¹⁵⁵. Por otra parte, los grupos de Arasu *et al*, Garnero *et al*. y Dovjak *et al*, no encontraron diferencias estadísticamente significativas ^{156–158} (Tabla 26 y 27).

Tabla 26. Datos sobre tipo de estudio, muestra poblacional y kit de análisis de esclerostina utilizado en los estudios publicados en pacientes con fracturas osteoporóticas y controles.

REFERENCIA	TIPO ESTUDIO	MUESTRA POBLACIONAL	KIT ANÁLISIS ESCLEROSTINA
Arasu 2012	casos-controles prospectivo	Estados Unidos	ELISA sandwich assay (Amgen Inc. Thousand Oaks, CA)
Ardawi 2012	cohortes prospectivo	Arabia Saudí	ELISA Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co
garnero 2013	cohortes prospectivo	Francia	TECO® Sclerostin EIA Kit
Dovjak 2014	casos-controles	Austria	ELISA Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co
Lim 2016	casos-controles	Corea del Sur	ELISA Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co
Tesis doctoral De la Calva 2021	casos-controles	España	Sclerostin (SOST) ELISA kit (Thermo Fisher Scientific)

Tabla 26. Datos sobre tipo de estudio, muestra poblacional y kit de análisis de esclerostina utilizado en los estudios publicados en pacientes con fracturas osteoporóticas y controles.

REFERENCIA	TIPO ESTUDIO	MUESTRA POBLACIONAL	KIT ANÁLISIS ESCLEROSTINA
Arasu 2012	casos-controles prospectivo	Estados Unidos mujeres postmenopáusicas	ELISA sandwich assay (Amgen Inc. Thousand Oaks, CA)
Ardawi 2012	cohortes prospectivo	Arabia Saudí mujeres postmenopáusicas	ELISA Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co
garnero 2013	cohortes prospectivo	Francia 572 mujeres postmenopáusicas	TECO® Sclerostin EIA Kit
Dovjak 2014	casos-controles	Austria mujeres >50a en geriátrico	ELISA Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co
Lim 2016	casos-controles	Corea del Sur mujeres postmenopáusicas	ELISA Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co
Tesis doctoral De la Calva 2021	casos-controles	España mujeres postmenopáusicas	Sclerostin (SOST) ELISA kit (Thermo Fisher Scientific)

Tabla 27. Datos sobre número de pacientes, edad, tipo de fractura, valores de esclerostina y conclusiones en los estudios publicados sobre fracturas osteoporóticas y controles.

REFERENCIA	CASOS				CONTROLES			CONCLUSIONES
	n	Edad	Tipo de fractura	Valores esclerostina pg/ml	n	Edad	Valores esclerostina pg/ml	
Arasu 2012	228	76.6 +/- 6.3	cadera	314.2+/-130.8	204	73.9 +/- 5.5	291.3+/-119.1	no diferencias
Ardawi 2012	569	67.6 +/- 7.1	vertebrales/no vertebrales	21.16+/-3.35	138	59.4 +/- 5.7	13.65+/-3.57	niveles más altos en pacientes con fractura osteoporótica
garnero 2013	64	entre 31 y 89	vertebrales/no vertebrales	No especificado	508	entre 31 y 89	No especificado	no diferencias
Dovjak 2014	110	mayores 50	cadera	3.70	62	mayores de 50	3.76	no diferencias
Lim 2016	103	62.8+/- 6.1	vertebrales/no vertebrales	1200	103	62.8+/-6.1	1370	niveles más bajos en pacientes con fractura osteoporótica
Tesis doctoral De la Calva 2021	10	64.4+/- 6.93	vertebrales/no vertebrales	554+/-66.06	11	62.64+/- 5.22	602+/-64.02	no diferencias

Al comparar los valores entre los diferentes estudios cuando unificamos las medidas de esclerostina a pg/ml, destaca la elevada dispersión de los valores siendo poblaciones similares de mujeres de edad avanzada en todos los trabajos. Este hecho podría deberse a la falta de homogenización en el momento de extracción de la muestra sanguínea, o a los diferentes kits utilizados en cada uno de los trabajos que se han publicado hasta el momento. Por lo tanto, en este sentido la literatura científica no parece aclarar los valores esperables de esclerostina en suero para pacientes osteoporóticas con fractura de baja energía. Es más, incluso en pacientes osteoporóticas tratadas con agentes bifosfonatos como el risedronato, se ha observado un aumento en los niveles de esclerostina sérica cuando se administró risedronato a mujeres posmenopáusicas durante 6 meses. Este hecho observado por Polyzos *et al.*¹⁹², es remarcable puesto que el risedronato es un agente bisfosfonato oral ampliamente utilizado para tratar la osteoporosis, con eficacia comprobada en la prevención de la aparición de fracturas^{193,194}.

Por tanto, a pesar de que fisiopatológicamente deberíamos encontrar unos niveles de esclerostina aumentados en pacientes con mala calidad ósea, no siempre encontramos estos resultados en la literatura publicada sobre el tema 154–158.

En cuanto al análisis entre el grupo control y el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En la bibliografía no hay estudios similares sobre la relación de los niveles de esclerostina con la escoliosis degenerativa del adulto, únicamente encontramos el trabajo de Zhang *et al.* en el que analizan los niveles en biopsias óseas de pacientes con escoliosis idiopática del adolescente, encontrando niveles aumentados en este grupo, y atribuyendo estos resultados a una alteración del metabolismo óseo que presentan estas pacientes con deformidades vertebrales¹⁹⁵.

No encontramos bibliografía similar sobre pacientes con escoliosis degenerativa del adulto, aunque la literatura más reciente apunta a que estimulando la secreción de esclerostina en los osteocitos y restaurando la función normal de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina se podría, en teoría,

aumentar la resistencia ósea y prevenir el deterioro de la deformidad escoliótica en la escoliosis idiopática del adolescente¹⁹⁶. En estos pacientes se ha encontrado la concentración de calmodulina aumentada en los músculos paraespinales del lado convexo y disminuidos en el cóncavo¹⁹⁷. La disminución de la calmodulina, mediante su influencia sobre los niveles de calcio y la infraregulación de la calcitonina, disminuirían los niveles de la esclerostina^{198–200}. Un efecto similar se observa en los valores de proteína G que se encuentran aumentados en muestras óseas del lado de la convexidad en pacientes con escoliosis idiopática del adolescente, induciendo la ruta Wnt/ β -catenina²⁰¹. La sobreactivación de esta ruta puede favorecer alteraciones en el funcionamiento de los músculos, el disco intervertebral y la placa de crecimiento que favorezcan el desarrollo de deformidades vertebrales^{202–204}. Serán necesarios futuros estudios para confirmar estas hipótesis en pacientes con escoliosis degenerativa del adulto.

Otra consideración a tener en cuenta en el estudio de la esclerostina es que, aunque mayoritariamente se produce en los osteocitos, también se puede sintetizar en otras localizaciones como el tejido hepático, el cardíaco o el renal entre otros¹⁵⁹. Esto explicaría los resultados del trabajo de Rofort *et al.*, donde tanto las mujeres jóvenes como las mujeres de mayor edad tienen niveles similares de ARNm de SOST en tejido óseo, a pesar de presentar las de mayor edad niveles más elevados de esclerostina en sangre, lo que implica que otros tejidos pueden ser los responsables del aumento de la secreción de esclerostina con la edad²⁰⁵.

4.6.1.1. Niveles de esclerostina y vitamina D.

En nuestro estudio únicamente hemos observado una tendencia positiva en el grupo de casos y de escoliosis degenerativa, y una tendencia negativa en el grupo de controles entre los niveles de esclerostina y vitamina D.

Los estudios experimentales que han estudiado esta correlación, no muestran consistencia sobre su relación, ya que en algunos trabajos se

describe un aumento de la expresión del gen *SOST* y en otros la relación contraria^{206,207}.

En estudios en pacientes en mujeres postmenopáusicas los datos son similares. La mayoría no encuentran asociación^{157,208,209}, excepto el trabajo de He *et al.* que describen una correlación positiva¹⁴⁸, y el de Ardawi *et al.* que describe una correlación negativa²¹⁰.

Otros trabajos han estudiado el efecto la suplementación con vitamina D en los niveles de esclerostina. El trabajo de Dawson *et al.* mostró una correlación positiva en los pacientes hombres que habían recibido tratamiento con vitamina D, pero no en el grupo de mujeres sugiriendo que su comportamiento puede ser diferente en función del sexo del paciente²¹¹. Sin embargo, Sankaralingam *et al.* no encontró esta diferencia entre sexos y también describió esta correlación positiva en los pacientes que habían sido suplementados con vitamina D, sugiriendo incluso, que un exceso en los valores de vitamina D podría conllevar un empeoramiento de la calidad ósea mediada por el incremento de los niveles de esclerostina²¹².

Los resultados de nuestro estudio coinciden con la mayoría de la literatura publicada, y en el momento actual no podemos establecer una correlación entre los valores de esclerostina y vitamina D.

4.6.2. Metilación gen *SOST*

Con el objetivo de evaluar si la alteración en los niveles de metilación del gen que codifica para la esclerostina podría ser predictivo de mala calidad ósea o de fractura osteoporótica, se evaluó mediante MassArray Sequenom la metilación de este gen en ADN de sangre periférica. Los resultados en la metilación del gen *SOST* mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, aunque estas variaciones en la metilación no mostraron cambios porcentuales considerables (Fig. 11 y 12).

Un estudio realizado por Papathanasiou *et al.* en condrocitos de pacientes con osteoartritis mostró que los niveles de mRNA de *SOST* estaban

incrementados en comparación con condrocitos provenientes de pacientes sanos. Estos autores además evaluaron el rol de la metilación de ADN en la expresión del gen *SOST*. Papathanasiou observó que el promotor de *SOST* estaba hipermetilado en condrocitos normales e hipometilado en condrocitos de pacientes con osteoartritis, lo cual sugiere la participación de mecanismos epigenéticos en la regulación del gen *SOST* en osteoartritis¹³⁸.

En nuestro estudio no hemos detectado cambios por encima del 10% en la metilación del gen *SOST*, aunque sí detectamos que estos cambios fueran significativos en la metilación de algunos CpGs. Una de las posibles causas podría ser que en nuestro estudio se ha usado ADN obtenido de leucocitos, mientras que en los estudios previamente mencionados trabajaron con muestras de tejido óseo o en condrocitos aislados de pacientes con osteoartritis.

También es importante mencionar el estudio de Delgado Calle y col. Estos autores hallaron 2 regiones ricas en CpG en el gen *SOST*: región 1, localizado en el promotor proximal y región 2, cerca del exón 1. El gen *SOST* tuvo una expresión bastante baja cuando se analizó por RT-qPCR en líneas celulares osteoblasticas, no osteoblásticas y osteoblastos primarios en condiciones basales. Por otro lado, el gen *SOST* se sobreexpresó por el agente desmetilante AzadC, demostrando la importancia funcional de la región -581/+30 del gen *SOST*. Estos resultados sugieren que la metilación de ADN está implicada en la regulación de la expresión del gen *SOST* durante la transición osteoblasto-osteocito¹³⁶.

En el estudio realizado por Reppe y col., se describió también la regulación epigenética del gen *SOST* en biopsias de hueso de mujeres postmenopáusicas¹³⁴. En este mismo estudio se correlacionaron los niveles de esclerostina en suero de mujeres postmenopáusicas con la densidad mineral ósea, la incidencia de fracturas, y algunos parámetros de remodelación ósea. La región del promotor del gen *SOST* mostró un incremento de la metilación de *SOST* en pacientes osteoporóticos en comparación con los controles ajustados por edad e índice de masa corporal. Los resultados de Reppe y col., sugieren que la metilación de promotor de *SOST* es un mecanismo compensatorio para reducir las concentraciones de esclerostina en suero y así reducir la señalización de Wnt

para promover la formación de hueso¹³⁴. Estos resultados pueden tener relación con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, donde se ha observado un aumento de la metilación del grupo con fragilidad ósea respecto al grupo control ciertas CpGs (amplicón SOST17 CpG_4 y CpG_5, así como en la CpG_1 del amplicón SOST 28) en el promotor del gen *SOST*, aunque en nuestro caso no vimos una variación significativa de los niveles de esclerostina medidos mediante el kit ELISA SOST en los pacientes con fragilidad ósea. Como hemos indicado en el apartado anterior, las distintas fuentes de síntesis de esclerostina pueden ser las responsables de que no hayamos encontrado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de esta proteína en plasma de los grupos analizados.

4.7. MicroARNs en fracturas osteoporóticas y escoliosis degenerativa.

Otro de los mecanismos epigenéticos que hemos explorado en esta tesis han sido los microARNs.

En nuestro estudio de smallRNA-seq se ha identificado el miR-122-5p como biomarcador candidato para identificar pacientes con fragilidad ósea, por un lado y pacientes con escoliosis degenerativa por el otro. Además, el miR-99 también se identificó como un biomarcador candidato para identificar pacientes con escoliosis degenerativa versus controles, y con fragilidad ósea versus escoliosis degenerativa. No obstante, en el estudio de validación por RT-qPCR con una cohorte mayor de pacientes no fue posible validarlo, observándose únicamente una tendencia a la subexpresión tanto del miR-122 como del miR-99 tanto en el grupo de pacientes con fractura osteoporótica como en el grupo con escoliosis degenerativa, respecto al grupo control, sin observarse diferencias estadísticamente significativas. Esta misma tendencia en el grupo con fractura osteoporótica y con escoliosis degenerativa, podría explicarse por la relación que presentan las dos patologías²¹³. Una de las limitaciones de nuestro estudio podría ser el número limitado de pacientes, sobretodo en el grupo con escoliosis degenerativa.

Uno de los principales problemas al revisar la literatura sobre este tema, es la falta de homogenización en la metodología, ya que numerosos artículos clasifican a los pacientes como casos con mala calidad ósea, a aquellos que presentan una densitometría con valores clasificados como osteoporóticos, y a los sujetos sanos como aquellos con valores no patológicos en esta prueba. Como ya hemos explicado anteriormente, este planeamiento no sería correcto debido a las limitaciones ya descritas sobre esta prueba DMO. Otros aspectos poco homogenizados, son la localización de la fractura o el momento de extracción de la muestra.

No obstante, varios trabajos en la literatura han comparado los perfiles de miARNs circulantes en pacientes con fractura osteoporótica respecto a grupo control. En el trabajo de Panach *et al.* describen el análisis de 8 mujeres postmenopáusicas con fractura de cadera frente a una grupo control de 5 mujeres postmenopáusicas con osteoartritis, identificando una sobreexpresión del miR-122-5p, miR-125b-5p y miR-21-5p en el grupo de casos, sin especificar en el trabajo el momento de extracción de la muestra ²¹⁴. Por otro lado, en el estudio de Weilner *et al.* se analizaron 12 fracturas de cadera en mujeres postmenopáusicas, frente a 11 controles, determinando una infraregulación de los miR-22-3p, miR-328-3p y let-7 g-5p. En este trabajo la toma de muestras se realizó en las dos semanas posteriores a la cirugía ²¹⁵.

Otros estudios, en la metodología de los cuales se ha considerado el grupo de casos a los pacientes diagnosticados de osteoporosis según los valores de la DMO, a pesar de las limitaciones de esta prueba, han encontrado una expresión diferencial del miR-122. Por ejemplo, en los trabajos de Al-Rawaf *et al.* y Mandourah *et al.* en los que aparece subexpresado^{216,217}. En el estudio de Garg *et al.* también aparece como infraexpresado pero en este trabajo el grupo control se trata de pacientes jóvenes, y aunque no aporte datos sobre la DMO, sería esperable que tuviese un mayor porcentaje de valores de DMO normales en el grupo control ²¹⁸. Sin embargo, en el estudio de Seeliger *et al.*, en el cual seleccionaron pacientes con fractura de baja energía e hicieron dos grupos en función de los resultados de la DMO, el análisis de los resultados indicó que en aquellas pacientes que tenían valores de DMO asociados a osteoporosis, presentaban una sobreexpresión del miR-122 ²¹⁹.

Además, existe otro grupo de trabajos basados también en los resultados de DMO, pero que no identifican una expresión diferencial del miR-122, sino de otros miARNs diferentes ²²⁰⁻²²⁸.

Con respecto a la relación del miR-122 con la escoliosis, el grupo de García-Giménez *et al.* describió una firma donde el miR-122-5p se encontraba sobreexpresado, junto con miR-27-5p y miR-223-5p en pacientes con escoliosis idiopática del adolescente ⁹⁵. Otros trabajos han descrito relaciones de otros miARNs con la escoliosis idiopática del adolescente. Zhang *et al.* observó un aumento del miR-145 y la β -catenina en pacientes con escoliosis idiopática del adolescente ¹⁹⁵. Por otra parte, Hui *et al.* describió una expresión diferencial de miR-17-5p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-93-5p, miR-15a-5p, and miR-181b-5p, en los pacientes con esta patología ²²⁹. En lo referente a trabajos donde se haya estudiado la expresión diferencial de miARNs en la escoliosis degenerativa del adulto, Zheng *et al.* describieron una infraexpresión del miR-143 en pacientes con esta patología ²³⁰.

Estos hallazgos deberían estar relacionados con el papel del miR-122-5p en la regulación de mecanismos clave del metabolismo óseo. Así, mediante el estudio bioinformático realizado en esta tesis encontramos que miR-122-5p tiene como diana al mensajero de Wnt1 bloqueando la activación de la vía Wnt / β -catenina. En efecto, este mecanismo de regulación de la ruta Wnt / β -catenina por el miR-122-5p ha sido demostrado anteriormente por Wang *et al.* ¹⁷⁸. La vía de Wnt/ β -catenina es la vía canónica de la diferenciación osteoblástica, en la que la activación de β -catenina promueve la generación de osteoblastos a partir de los progenitores mesenquimales, estimulando la proliferación y diferenciación de osteoblastos, evitando la osteoclastogénesis y también la apoptosis osteoblástica y osteocítica ²³¹. En la señalización de Wnt participa la proteína C de poliposis adenomatosa (APC), la cual facilita la interacción entre la proteína β -catenina y la Glicógeno sintasa quinasa 3B (GSK3B), dando como resultado la fosforilación de β -catenina y su degradación por el proteasoma ²³².

Además, los datos experimentales obtenidos por Mizuno *et al.*, indicaron que el miR-122 puede disminuir los niveles de BMP4 ¹⁷⁹, un factor que también inhibe la activación de la diferenciación osteoblástica. Sin embargo, miR-122-5p

también está involucrado en la mineralización de las células del músculo liso (SMC), que desempeñan un papel integral en la formación de hueso esquelético mediante la trans-diferenciación a los osteoblastos y por lo tanto disminuye la actividad de los osteoclastos ²³³. Este doble papel del miR-122, tanto activando como inhibiendo la diferenciación de los osteoblastos, podría ser compensado por el miR-27a, ya que este miRNA activa la osteogénesis mediante la inducción de la vía de señalización de Wnt, a través de su interacción con APC, que lleva a la liberación y a la migración de β -catenina al núcleo. Esto contribuiría a la diferenciación de las células madre mesenquimales en osteoblastos ²³⁴ y, a su vez, ayudaría a aumentar la masa ósea y disminuir la fragilidad ósea ²³⁵.

Como se ha descrito la ruta Wnt/ β -catenina es regulada por miR-122-5p, sin embargo, la ruta Wnt/ β -catenina regula la función del heparán sulfato (HS) el cual a su vez influye sobre BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2). Bramono *et al.*, demostraron que el HS, un análogo estructural a la heparina potencia la actividad osteogénica de BMP2. Además, estos autores demostraron que este incremento de actividad osteogénica se producía junto con un aumento de la expresión y actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y de osteocalcina. Los resultados de Bramono *et al.*, demostraron que el Heparan sulfato (HS) derivado de la médula ósea ayuda en la formación ósea y sugiere su aplicación en la reparación ósea ²³⁶. En relación con miR-122-5p podrían realizarse estudios comparativos de los niveles de este biomarcador y los niveles de HS y BMP2 en pacientes para evaluar, por ejemplo, el efecto de los tratamientos aplicados en los procesos osteodegenerativos y ver si este miARN tiene capacidad de monitorización de la efectividad de las terapias enfocadas a la reparación ósea.

El miR-99b-5p se ha asociado con varias entidades malignas ²³⁷⁻²³⁹ y, además se ha descrito formando parte de una firma de miARNs en osteosarcoma capaz de predecir la respuesta a iofosfamida¹⁸⁰, este miARN actúa en las rutas TGF β , WNT, MAPK y AKT/mTOR^{181,182}. Recientemente, Ding *et al.*, utilizando una aproximación bioinformática para identificar miARNs y mARNs con expresión diferencial en modelos de ratas ovariectomizadas en las que se indujo osteoporosis encontraron que el miR-99b-5p inhibe la proliferación de los osteoblastos al bloquear el eje FGFR3 y la expresión de genes relacionados con la osteogénesis¹⁸³.

En cuanto a los mecanismos moleculares mediados por los miARNs identificados, como era de esperar en correspondencia con las vías de señalización identificadas, las proteínas TGF- β , sus receptores (TGFBR), las proteínas SMAD (segundo mensajero en esta vía) y las BMPs fueron los genes que con más frecuencia se identificaron como dianas de los miARNs identificados en el análisis de enriquecimiento funcional. Este hallazgo coincide con estudios previos que mostraron que TGF- β , junto a otros factores derivados de la matriz ósea tales IGF, BMPs, y FGFs son dianas susceptibles a la regulación epigenética dentro de las vías de señalización asociados con la modelación y remodelación ósea en la osteoporosis ²⁴⁰. De igual modo GSK3 β y una serie de proteínas intracelulares que forman parte de la ruta canónica de WNT también se identificaron entre los genes regulados por los miARNs. En particular, en la ruta de señalización de Wnt participa la proteína C de poliposis adenomatosa (APC), la cual facilita la interacción entre la proteína β -catenina y la Glicógeno sintasa quinasa 3B (GSK3B), dando como resultado la fosforilación de β -catenina y su degradación por la proteasoma.

Para formar correctamente tejidos y órganos, las células no sólo deben integrar señales morfogénicas proporcionadas por TGF- β , WNTs y otros factores, sino también incorporar información sobre el estado de las vías de control que gobiernan el crecimiento global de las células y los tejidos, como la vía Hippo ²⁴¹. A diferencia de las vías TGF- β y WNT que promueven la actividad nuclear de sus respectivos mediadores, SMADs y β -catenina, la activación de la vía Hippo sirve para desactivar las funciones nucleares de sus mediadores (TAZ / YAP), sin embargo, al igual que las vías TGF- β y WNT, tiene una función transcripcional clave en la regulación de las células madres y su diferenciación^{241,242}.

Otras vías desreguladas están vinculadas con la biosíntesis de los glicanos, lo cual no es de extrañar ya que los proteoglicanos juegan un papel importante en la organización de la matriz extracelular ósea y participan en la estructuración del tejido como reguladores activos de la fibrillogénesis del colágeno. Los proteoglicanos también muestran patrones selectivos de reactividad con citoquinas y factores de crecimiento, como TGF- β y OPG, por lo tanto, modulan la disponibilidad y la actividad biológica de estas proteínas en el hueso ²⁴³. Las

investigaciones recientes han puesto de relieve la participación de la ruta de la O-glicosilación en una serie de enfermedades, incluidas las que afectan la densidad ósea y el metabolismo mineral sugiriendo un papel para los O-glicanos en la regulación de los eventos proteolíticos necesarios para la regulación adecuada del fosfato y la homeostasis *in vivo* ²⁴⁴.

La desregulación de las rutas de señalización de uniones adherentes y de PI3K también es un hallazgo concordante con investigaciones previas acerca del papel de la molécula de adhesión celular-N-caderina en la osteogénesis a través la ruta de señalización PI3K, puntualizando el papel de estas uniones y la comunicación entre los osteoblastos en el crecimiento del hueso y la transcripción de genes osteoblásticos ²⁴⁵. Se reconoce que la N-caderina controla negativamente la proliferación y la supervivencia de los osteoblastos por inhibición de la expresión del ligando WNT3a y la atenuación de las vías WNT, ERK y PI3K/Akt ²⁴⁶.

La relación de la diabetes mellitus y la fragilidad ósea está descrita en la literatura, presentando estos pacientes una disminución de la masa ósea y un aumento de 6 veces respecto a la población general la posibilidad de sufrir una fractura de cadera ²⁴⁷. Es por este motivo que en nuestro estudio decidimos hacer un análisis de la expresión del miR-122 y miR-99 en función de si las pacientes presentaban o no DM tipo 2. Heilmeyer et al. en 2016 presentaron un estudio en el que se describía el miR-550a-5p y el miR-382-3p como predictores de fragilidad ósea en pacientes con fractura osteoporótica con y sin diabetes mellitus tipo 2 ²⁴⁸. En el año 2022, el mismo grupo publicó un trabajo donde se seguía en el tiempo a 168 mujeres postmenopáusicas con DM tipo 2, diagnosticándose en 70 de estas pacientes una fractura de baja energía. Se identificó el miR-19b-1-5p como un factor protector para el desarrollo de fracturas de baja energía, y el miR-203a y el miR-31-5p como factores de riesgo para la presencia de esta lesión ²⁴⁹. Otros estudios relacionaron, como hemos visto frecuentemente en la literatura, el diagnóstico de osteoporosis con los resultados de la DMO, a pesar de las limitaciones ya descritas de este análisis, describiendo variaciones en miR-148-3p, miR-21-5p, miR-214-3p y miR-205 ^{250–252}. En nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-122 y miR-99 entre el grupo de pacientes con fractura

osteoporótica y el grupo de pacientes con escoliosis degenerativa versus al grupo control, cuando realizamos el análisis separando a los pacientes en función de si presentaban o no DM2.

Numerosos trabajos en la literatura han buscado la relación de los miARNs con la obesidad y el desarrollo de fragilidad ósea, como muestra la reciente revisión realizada por Vulf et al.²⁵³. En nuestro estudio observamos que en el pacientes con un índice de masa corporal clasificado como sobrepeso o superior, en miR-99 se encontraba infraexpresado respecto al grupo control, pudiendose considerar este miR candidato para identificar a los pacientes con mala calidad ósea en este grupo. No obstante, en la literatura, no existe ningún trabajo que identifique la relación del miR-99 para identificar la fragilidad ósea en pacientes con obesidad. Probablemente, la relación del miR-99 con las rutas moleculares descritas en las que participa este miARN puede explicar la hipótesis de su relación con la obesidad y la fragilidad ósea^{254,255}. Además, en el estudio de Heianza *et al.* se demostró que los cambios en la expresión circulante de miR-99/100 en respuesta a las intervenciones en la dieta/estilo de vida se asociaron significativamente con disminuciones en los depósitos de grasa visceral/ectópica, así como con el metabolismo de la glucosa, entre pacientes con obesidad abdominal²⁵⁶. Por otro lado, en el trabajo de Ortega *et al.* el miR-99a estaban regulados positivamente en las células y depósitos de grasa subcutánea de los obesos en comparación con los obtenidos de personas delgadas²⁵⁷.

En nuestra muestra de pacientes, numerosos casos presentaban valores de vitamina D insuficientes o deficientes. Se encuentra descrito en la literatura su relación con el metabolismo óseo y la implicación de miARN en sus mecanismos de acción²⁵⁸, es por eso que en nuestro estudio realizamos el análisis de miR-122 y miR-99, en función de si los pacientes presentaban valores normales o insuficientes versus deficientes, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre grupos. No hemos encontrado en la literatura estudios donde se realicen análisis similares sobre la vitamina D.

En cuanto a la capacidad discriminativa del miR-99 en las pacientes con IMC elevado para diferenciar entre pacientes controles y aquellos con una mala calidad ósea, los resultados de la curva ROC determinaron el test como regular, a pesar de presentar un p valor significativo, probablemente por el bajo número de casos incluido en este análisis (casos n=12, controles n=17).

A pesar de no poder ser considerado un test de calidad con el análisis realizado en nuestro trabajo, observamos que la densitometría utilizada en la actualidad, tanto en esa cohorte de pacientes con IMC aumentados como en el resto de cohortes analizadas en nuestro estudio, presenta unos valores altos de especificidad con un rango entre el 92.3% y el 100%, pero unos valores bajos en cuanto a la sensibilidad entre un 0% y un 50%, quedando de manifiesto las debilidades de la misma a la hora de identificar a pacientes con una mala calidad ósea. La bibliografía sobre el tema está de acuerdo en describir estas limitaciones. Estudios sobre esta prueba teniendo en cuenta las variaciones en los valores de T-score, y no la clasificación cualitativa aceptada por la OMS ⁶, son capaces de predecir el riesgo de fractura, pero esta capacidad disminuye con la edad del paciente. Sin embargo, la prueba no es capaz de identificar los individuos que van a sufrir una fractura de baja energía ^{40,44}. En esta línea, estudios de casos y controles sobre el tema, como ya se ha descrito en el apartado de discusión de la densitometría ósea en este trabajo, presentan resultados similares a los descritos en nuestro trabajo, con unos valores de sensibilidad que oscilan entre el 0 y el 40% ^{41-43,190}. En cuanto a la especificidad, es escasa la literatura con casos y controles y valoraciones cualitativas, pero en el estudio de Langsetmo *et al.* presenta unos valores de 96.2% en hombres y 90.4% en mujeres, tratándose de valores altos similares a los de nuestro estudio ⁴².

En nuestro estudio, con un *cut-off value* > 0.4870 conseguimos valores de sensibilidad mayores al 80%, por lo tanto, conseguiríamos identificar a un gran número de pacientes con mala calidad ósea, pero presentando como problema un aumento de falsos positivos. Una solución a esta cuestión podría ser la densitometría ósea, que al presentar tanto en nuestro estudio como en la bibliografía una alta especificidad, podría ayudarnos a identificar a los sujetos sanos disminuyendo los falsos positivos. Por lo tanto, la combinación de estas

dos pruebas podría ser de utilidad para la identificación de pacientes con fragilidad ósea en mujeres con un IMC elevado.

4.8. Limitaciones del estudio

- Se trata de una muestra con un número limitado de pacientes, sobre todo en el grupo de escoliosis degenerativa que probablemente no nos permitan observar diferencias en caso de existir. La reclutación de pacientes se vio dificultada por los exigentes criterios de exclusión al planificar no incluir casos con patologías basales que interfiriesen en el metabolismo óseo, siendo estas de incidencia elevada en la población de mujeres postmenopáusicas a estudio.
- La toma de muestras no se ha realizado exactamente en el mismo momento respecto a la aparición de la fractura en todos los pacientes, no obstante, en todos se realizó en los tres días siguientes al diagnóstico.
- A pesar de los exigentes criterios de exclusión, las pacientes pueden presentar una serie de patologías basales que podrían actuar como factores de confusión en nuestro estudio.

CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio no hemos identificado diferencias estadísticamente significativas en los valores de esclerostina entre los pacientes con fragilidad ósea por un lado, y con escoliosis degenerativa por otro, respecto a la población general, ni tampoco entre ambos grupos.
2. Hemos observado una tendencia positiva entre los valores de esclerostina y vitamina D en el grupo de pacientes con fractura por fragilidad y escoliosis degenerativa, así como una tendencia negativa en el grupo control, sin ser estadísticamente significativas.
3. En cuanto a la metilación del gen *SOST*, hemos identificado zonas en el amplicón *SOST* 17 y *SOST* 18 con variaciones en la metilación. Estas variaciones en la metilación no han mostrado su asociación con las variaciones en los niveles de esclerostina.
4. En el análisis por secuenciación masiva hemos identificado el miR-122 y el miR-99 como candidatos para la identificación de pacientes con fragilidad ósea y escoliosis degenerativa.
5. Se identificó una tendencia a la subexpresión del miR-122 y el miR-99 tanto en pacientes con fractura osteoporótica como en pacientes con escoliosis degenerativa respecto al grupo control sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. Realizando este análisis en el grupo de pacientes con IMC diagnósticos de sobrepeso u obesidad, se ha observado una subexpresión del miR-99 en pacientes con fractura osteoporótica.
6. El miR-99 permite identificar pacientes con mala calidad ósea en el subgrupo con IMC elevado con una sensibilidad del 83.34% pero con una especificidad del 11.7% presentando como problema un aumento de falsos positivos. Su combinación con la densitometría ósea, prueba de alta especificidad, podría ser la solución a esta cuestión.

7. La densitometría ósea se trata de una prueba con una baja sensibilidad, por lo que no es adecuado recomendar su realización como método de cribado para intentar identificar en la población general pacientes con mala calidad ósea.

BIBLIOGRAFÍA

1. Consensus development conference statement. National Institutes of Health. Impotence. December 7-9, 1992. *Int J Impot Res.* 1993 Dec;5(4):181-284.
2. Beck T. Measuring the structural strength of bones with dual-energy X-ray absorptiometry: principles, technical limitations, and future possibilities. *Osteoporos Int.* 2003 Sep;14 Suppl 5:S81-8.
3. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA.* 2001 Feb 14;285(6):785-95.
4. Faulkner KG. Bone matters: are density increases necessary to reduce fracture risk? *J Bone Miner Res.* 2000 Feb;15(2):183-7.
5. Caeiro Rey JR, Dapía Robleda S, Vaquero Cervino E, Roca Ruiz L, Blanco Ramos MA. Factores determinantes de la resistencia ósea. *Rev Española Enfermedades Metabólicas Óseas [Internet].* 2005;14(4):67–74.
6. Compston J, Bowring C, Cooper A, Cooper C, Davies C, Francis R, Kanis JA, Marsh D, McCloskey EV, Reid DM, Selby P; National Osteoporosis Guideline Group. Diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and older men in the UK: National Osteoporosis Guideline Group (NOGG) update 2013. *Maturitas.* 2013 Aug;75(4):392-6.
7. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, Dawson-Hughes B. The recent prevalence of osteoporosis and low bone mass in the United States based on bone mineral density at the femoral neck or lumbar spine. *J Bone Miner Res.* 2014 Nov;29(11):2520-6.
8. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY; Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO) and the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European

guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2019 Jan;30(1):3-44.

9. M. Díaz Curiel, J.J. García, J.L. Carrasco, J. Honorato, R. Pérez Cano, A. Rapado, C. Álvarez Sanz. Prevalencia de osteoporosis determinada por densitometría en la población femenina española. *Medicina Clínica* 2001; 116(3):86-88.
10. Naves Díaz M, Díaz López JB, Gómez Alonso C, Rodríguez Rebollar AB CAJ. Prevalencia e incidencia de osteoporosis en el varón. Capacidad de predecir fractura osteoporótica mediante la utilización de la densitometría. *Rev Esp Enferm Metab Óseas.* 2004;13:87–94.
11. Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004.
12. Looker AC, Melton LJ 3rd, Harris TB, Borrud LG, Shepherd JA. Prevalence and trends in low femur bone density among older US adults: NHANES 2005-2006 compared with NHANES III. *J Bone Miner Res.* 2010 Jan;25(1):64-71.
13. Ensrud KE. Epidemiology of fracture risk with advancing age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013 Oct;68(10):1236-42.
14. Kendall SJ, Singer GC, Briggs TW, Cannon SR. A functional analysis of massive knee replacement after extra-articular resections of primary bone tumors. *J Arthroplasty.* 2000 Sep;15(6):754-60.
15. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res.* 2007 Mar;22(3):465-75.
16. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union:

- medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*. 2013;8(1):136.
17. González Y, Sicras A, Larraínzar R, Sorio F, Canals L, Lizán L, Calvo E. Estimación de los costes sanitarios relacionados con las fracturas osteoporóticas en pacientes posmenopáusicas en España. *PharmacoEcon Span Res Artic*. 2015;12: 1–9.
18. Willers C, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, McCloskey EV, Borgström F, Kanis JA; SCOPE review panel of the IOF. Osteoporosis in Europe: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos*. 2022 Jan 26;17(1):23.
19. Melton LJ 3rd, Thamer M, Ray NF, Chan JK, Chesnut CH 3rd, Einhorn TA, Johnston CC, Raisz LG, Silverman SL, Siris ES. Fractures attributable to osteoporosis: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res*. 1997 Jan;12(1):16-23.
20. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009 Jul;17(1):9-26.
21. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R; National Osteoporosis Foundation. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2014 Oct;25(10):2359-81.
22. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, De Laet C, Dawson A. Prediction of fracture from low bone mineral density measurements overestimates risk. *Bone*. 2000 Apr;26(4):387-91.
23. Lewiecki EM, Laster AJ. Clinical review: Clinical applications of vertebral fracture assessment by dual-energy x-ray absorptiometry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Nov;91(11):4215-22.

24. Hallberg I, Rosenqvist AM, Kartous L, Löfman O, Wahlström O, Toss G. Health-related quality of life after osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*. 2004 Oct;15(10):834-41.
25. Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA*. 2009 Feb 4;301(5):513-21.
26. Trone DW, Kritz-Silverstein D, von Mühlen DG, Wingard DL, Barrett-Connor E. Is radiographic vertebral fracture a risk factor for mortality? *Am J Epidemiol*. 2007 Nov 15;166(10):1191-7.
27. Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D. Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int*. 2000;11(7):556-61.
28. Abrahamsen B, van Staa T, Ariely R, Olson M, Cooper C. Excess mortality following hip fracture: a systematic epidemiological review. *Osteoporos Int*. 2009 Oct;20(10):1633-50.
29. Colón-Emeric C, Kuchibhatla M, Pieper C, Hawkes W, Fredman L, Magaziner J, Zimmerman S, Lyles KW. The contribution of hip fracture to risk of subsequent fractures: data from two longitudinal studies. *Osteoporos Int*. 2003 Nov;14(11):879-83.
30. Pinheiro Mde M. Mortalidade após fratura por osteoporose [Mortality after osteoporotic fracture]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Oct;52(7):1071-2.
31. Trombetti A, Herrmann F, Hoffmeyer P, Schurch MA, Bonjour JP, Rizzoli R. Survival and potential years of life lost after hip fracture in men and age-matched women. *Osteoporos Int*. 2002 Sep;13(9):731-7.
32. Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2005 Dec;34(4):1015-30.

33. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res.* 2022;10(1).
34. Looker AC, Orwoll ES, Johnston CC Jr, Lindsay RL, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP. Prevalence of low femoral bone density in older U.S. adults from NHANES III. *J Bone Miner Res.* 1997 Nov;12(11):1761-8.
35. Kanis JA, Bianchi G, Bilezikian JP, Kaufman JM, Khosla S, Orwoll E, Seeman E. Towards a diagnostic and therapeutic consensus in male osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2011 Nov;22(11):2789-98. WHO (2004). Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis At Primary Health. World Health Organization, Geneva.
36. WHO (2004). Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis At Primary Health. World Health Organization, Geneva.
37. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY; Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2013 Jan;24(1):23-57.
38. Watts NB, Leslie WD, Foldes AJ, Miller PD. 2013 International Society for Clinical Densitometry Position Development Conference: Task Force on Normative Databases. *J Clin Densitom.* 2013 Oct-Dec;16(4):472-81.
39. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ 3rd, Khaltaev N. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone.* 2008 Mar;42(3):467-75.

40. Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, Mellstrom D, Meunier PJ, Melton LJ 3rd, O'Neill T, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res.* 2005 Jul;20(7):1185-94.
41. Stone KL, Seeley DG, Lui LY, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, Nevitt MC, Cummings SR; Osteoporotic Fractures Research Group. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res.* 2003 Nov;18(11):1947-54.
42. Langsetmo L, Goltzman D, Kovacs CS, Adachi JD, Hanley DA, Kreiger N, Josse R, Papaioannou A, Olszynski WP, Jamal SA; CaMos Research Group. Repeat low-trauma fractures occur frequently among men and women who have osteopenic BMD. *J Bone Miner Res.* 2009 Sep;24(9):1515-22.
43. Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, Hofman A, Uitterlinden AG, van Leeuwen JP, Pols HA. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone.* 2004 Jan;34(1):195-202.
44. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996 May 18;312(7041):1254-9.
45. Watts NB. Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Osteoporos Int.* 2004 Nov;15(11):847-54.
46. Papaioannou A, Morin S, Cheung AM, Atkinson S, Brown JP, Feldman S, Hanley DA, Hodsman A, Jamal SA, Kaiser SM, Kvern B, Siminoski K, Leslie WD; Scientific Advisory Council of Osteoporosis Canada. 2010 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada: summary. *CMAJ.* 2010 Nov 23;182(17):1864-73.

47. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, McCloskey E. FRAX and the assessment of fracture probability in men and women from the UK. *Osteoporos Int.* 2008 Apr;19(4):385-97. doi: 10.1007/s00198-007-0543-5.
48. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA 3rd, Berger M. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res.* 2000 Apr;15(4):721-39.
49. Johnell O, Oden A, Caulin F, Kanis JA. Acute and long-term increase in fracture risk after hospitalization for vertebral fracture. *Osteoporos Int.* 2001;12(3):207-14.
50. Delmas PD, Genant HK, Crans GG, Stock JL, Wong M, Siris E, Adachi JD. Severity of prevalent vertebral fractures and the risk of subsequent vertebral and nonvertebral fractures: results from the MORE trial. *Bone.* 2003 Oct;33(4):522-32.
51. Puisto V, Heliövaara M, Impivaara O, Jalanko T, Kröger H, Knekt P, Aromaa A, Rissanen H, Helenius I. Severity of vertebral fracture and risk of hip fracture: a nested case-control study. *Osteoporos Int.* 2011 Jan;22(1):63-8.
52. Compston J, Cooper A, Cooper C, Gittoes N, Gregson C, Harvey N, Hope S, Kanis JA, McCloskey EV, Poole KES, Reid DM, Selby P, Thompson F, Thurston A, Vine N; National Osteoporosis Guideline Group (NOGG). UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. *Arch Osteoporos.* 2017 Dec;12(1):43.
53. Kanis JA, Johansson H, Harvey NC, McCloskey EV. A brief history of FRAX. *Arch Osteoporos.* 2018 Oct 31;13(1):118.
54. Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, Burckhardt P, Cooper C, Christiansen C, Cummings S, Eisman JA,

- Fujiwara S, Glüer C, Goltzman D, Hans D, Krieg MA, La Croix A, McCloskey E, Mellstrom D, Melton LJ 3rd, Pols H, Reeve J, Sanders K, Schott AM, Silman A, Torgerson D, van Staa T, Watts NB, Yoshimura N. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int.* 2007 Aug;18(8):1033-46.
55. El Miedany Y. FRAX: re-adjust or re-think. *Arch Osteoporos.* 2020 Sep 28;15(1):150.
56. Tebé Cordoní C, Del Río LM, Di Gregorio S, Casas L, Estrada MD, Kotzeva A, Espallargues M. Validation of the FRAX predictive model for major osteoporotic fracture in a historical cohort of Spanish women. *J Clin Densitom.* 2013 Apr-Jun;16(2):231-7.
57. Azagra R, Roca G, Encabo G, Aguyé A, Zwart M, Güell S, Puchol N, Gene E, Casado E, Sancho P, Solà S, Torán P, Iglesias M, Gisbert MC, López-Expósito F, Pujol-Salud J, Fernandez-Hermida Y, Puente A, Rosàs M, Bou V, Antón JJ, Lansdberg G, Martín-Sánchez JC, Díez-Pérez A, Prieto-Alhambra D. FRAX® tool, the WHO algorithm to predict osteoporotic fractures: the first analysis of its discriminative and predictive ability in the Spanish FRIDEX cohort. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012 Oct 22;13:204.
58. González-Macías J, Marin F, Vila J, Díez-Pérez A. Probability of fractures predicted by FRAX® and observed incidence in the Spanish ECOSAP Study cohort. *Bone.* 2012 Jan;50(1):373-7.
59. Cremers S, Garnero P, Seibel MJ. Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Princ Bone Biol Two-Volume Set.* 2008;2(8):1857–81.
60. Morris HA, Eastell R, Jorgensen NR, Cavalier E, Vasikaran S, Chubb SAP, Kanis JA, Cooper C, Makris K; IFCC-IOF Working Group for Standardisation of Bone Marker Assays (WG-BMA). Clinical usefulness of bone turnover marker concentrations in osteoporosis. *Clin Chim Acta.* 2017 Apr;467:34-41.

61. Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem.* 2014 Mar;51(Pt 2):189-202.
62. Szulc P, Naylor K, Hoyle NR, Eastell R, Leary ET; National Bone Health Alliance Bone Turnover Marker Project. Use of CTX-I and PINP as bone turnover markers: National Bone Health Alliance recommendations to standardize sample handling and patient preparation to reduce pre-analytical variability. *Osteoporos Int.* 2017 Sep;28(9):2541-2556.
63. Shao J, Zhou SS, Qu Y, Liang BB, Yu QH, Wu J. Correlation between bone turnover and metabolic markers with age and gender: a cross-sectional study of hospital information system data. *BMC Musculoskelet Disord.* 2020 Sep 10;21(1):603.
64. Martínez J, Olmos JM, Hernández JL, Pinedo G, Llorca J, Obregón E, Valero C, González-Macías J. Bone turnover markers in Spanish postmenopausal women: the Camargo cohort study. *Clin Chim Acta.* 2009 Nov;409(1-2):70-4.
65. Vilaca T, Gossiel F, Eastell R. Bone Turnover Markers: Use in Fracture Prediction. *J Clin Densitom.* 2017 Jul-Sep;20(3):346-352.
66. Kotwal S, Pumberger M, Hughes A, Girardi F. Degenerative scoliosis: a review. *HSS J.* 2011 Oct;7(3):257-64.
67. Lee WT, Cheung CS, Tse YK, Guo X, Qin L, Lam TP, Ng BK, Cheng JC. Association of osteopenia with curve severity in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 919 girls. *Osteoporos Int.* 2005 Dec;16(12):1924-32.
68. Cheung CS, Lee WT, Tse YK, Lee KM, Guo X, Qin L, Cheng JC. Generalized osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis--association with abnormal pubertal growth, bone turnover, and calcium intake? *Spine (Phila Pa 1976).* 2006 Feb 1;31(3):330-8.

69. Szalay EA, Bosch P, Schwend RM, Buggie B, Tandberg D, Sherman F. Adolescents with idiopathic scoliosis are not osteoporotic. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2008 Apr 1;33(7):802-6.
70. Pourabbas Tahvildari B, Erfani MA, Nouraei H, Sadeghian M. Evaluation of bone mineral status in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Surg*. 2014 Jun;6(2):180-4.
71. Sadat-Ali M, Al-Othman A, Bubshait D, Al-Dakheel D. Does scoliosis causes low bone mass? A comparative study between siblings. *Eur Spine J*. 2008 Jul;17(7):944-7.
72. Tanabe H, Aota Y, Nakamura N, Saito T. A histomorphometric study of the cancellous spinal process bone in adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2017 Jun;26(6):1600-1609.
73. Sabo A, Hatgis J, Granville M, Jacobson RE. Multilevel Contiguous Osteoporotic Lumbar Compression Fractures: The Relationship of Scoliosis to the Development of Cascading Fractures. *Cureus*. 2017 Dec 19;9(12):e1962.
74. Girardi FP, Parvataneni HK, Sandhu HS, Cammisa FP Jr, Grewal H, Schneider R, Lane JM. Correlation between vertebral body rotation and two-dimensional vertebral bone density measurement. *Osteoporos Int*. 2001;12(9):738-40.
75. Yagi M, King AB, Boachie-Adjei O. Characterization of osteopenia/osteoporosis in adult scoliosis: does bone density affect surgical outcome? *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011 Sep 15;36(20):1652-7.
76. Pappou IP, Girardi FP, Sandhu HS, Parvataneni HK, Cammisa FP Jr, Schneider R, Frelinghuysen P, Lane JM. Discordantly high spinal bone mineral density values in patients with adult lumbar scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2006 Jun 15;31(14):1614-20.

77. Rumancik S, Routh RH, Pathak RD, Burshell AL, Nauman EA. Assessment of bone quantity and distribution in adult lumbar scoliosis: new dual-energy x-ray absorptiometry methodology and analysis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005 Feb 15;30(4):434-9.
78. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol*. 2012 Feb;41(1):10-3.
79. García-Giménez J. *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. 2015. 696 p.
80. Husain A, Jeffries MA. Epigenetics and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep*. 2017 Oct;15(5):450-458.
81. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology [Internet]*. 2013;38(1):23–38.
82. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle*. 2011 Aug 15;10(16):2662-8.
83. Schomacher L. Mammalian DNA demethylation: multiple faces and upstream regulation. *Epigenetics*. 2013 Jul;8(7):679-84.
84. Kang MI, Kim HS, Jung YC, Kim YH, Hong SJ, Kim MK, Baek KH, Kim CC, Rhyu MG. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem*. 2007 Sep 1;102(1):224-39.
85. Zhou GS, Zhang XL, Wu JP, Zhang RP, Xiang LX, Dai LC, Shao JZ. 5-Azacytidine facilitates osteogenic gene expression and differentiation of mesenchymal stem cells by alteration in DNA methylation. *Cytotechnology*. 2009 Jul;60(1-3):11.
86. Tarfiei G, Noruzinia M, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M, Farshdousti Hagh M, Pujol P. ROR2 Promoter Methylation Change in

Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Cell J.* 2011 Spring;13(1):11-5.

87.Liu Y, Zhang XL, Chen L, Lin X, Xiong D, Xu F, Yuan LQ, Liao EY. Epigenetic mechanisms of bone regeneration and homeostasis. *Prog Biophys Mol Biol.* 2016 Nov;122(2):85-92.

88.Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.

89.Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* 2011 Sep 15;25(18):1915-27.

90.Pepin G, Gantier MP. microRNA Decay: Refining microRNA Regulatory Activity. *Microna.* 2016;5(3):167-174.

91.Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, Zhang Y. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Jan 31;8(4):212-27.

92.Stefani G, Slack F. MicroRNAs in search of a target. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006;71:129-34.

93.Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):17897-901.

94.Hackl M, Heilmeier U, Weilner S, Grillari J. Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases - Complex signatures for multifactorial diseases? *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Sep 5;432:83-95.

95.García-Giménez JL, Rubio-Belmar PA, Peiró-Chova L, Hervás D, González-Rodríguez D, Ibañez-Cabellos JS, Bas-Hermida P, Mena-Mollá S, García-López EM, Pallardó FV, Bas T. Circulating miRNAs as

- diagnostic biomarkers for adolescent idiopathic scoliosis. *Sci Rep*. 2018 Feb 8;8(1):2646.
96. Letarouilly JG, Broux O, Clabaut A. New insights into the epigenetics of osteoporosis. *Genomics*. 2019 Jul;111(4):793-798.
97. Stamatoyannopoulos JA. What does our genome encode? *Genome Res*. 2012 Sep;22(9):1602-11.
98. Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, Kellis M, Marra MA, Beaudet AL, Ecker JR, Farnham PJ, Hirst M, Lander ES, Mikkelsen TS, Thomson JA. The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1045-8.
99. García-Giménez, J.L, Ushijima. T TT. Epigenetic Biomarkers: New Findings, Perspectives, and Future Directions in Diagnostics. In: *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. 2016. p. 696.
100. García-Giménez JL, Seco-Cervera M, Tollefsbol TO, Romá-Mateo C, Peiró-Chova L, Lapunzina P, Pallardó FV. Epigenetic biomarkers: Current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017 Nov-Dec;54(7-8):529-550.
101. Reppe S, Lien TG, Hsu YH, Gautvik VT, Olstad OK, Yu R, Bakke HG, Lyle R, Kringen MK, Glad IK, Gautvik KM. Distinct DNA methylation profiles in bone and blood of osteoporotic and healthy postmenopausal women. *Epigenetics*. 2017 Aug;12(8):674-687.
102. Li X, Wang Y, Zhang Z, Yao X, Ge J, Zhao Y. Correlation of MLH1 and MGMT methylation levels between peripheral blood leukocytes and colorectal tissue DNA samples in colorectal cancer patients. *Oncol Lett*. 2013 Nov;6(5):1370-1376.

103. Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, Kirsch M, Schackert G, Calhoun V, Ehrlich S. Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull.* 2016 Mar;42(2):406-14.
104. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R, Plachel F, Feichtinger X, Heimel P, Fahrleitner-Pammer A, Grillari J, Redl H, Resch H, Hackl M. Circulating microRNA Signatures in Patients With Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Nov;101(11):4125-4134.
105. Mooney C, Raoof R, El-Naggar H, Sanz-Rodriguez A, Jimenez-Mateos EM, Henshall DC. High Throughput qPCR Expression Profiling of Circulating MicroRNAs Reveals Minimal Sex- and Sample Timing-Related Variation in Plasma of Healthy Volunteers. *PLoS One.* 2015 Dec 23;10(12):e0145316.
106. Soltanoff CS, Yang S, Chen W, Li YP. Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(1):1-46.
107. Park-Min KH. Epigenetic regulation of bone cells. *Connect Tissue Res.* 2017 Jan;58(1):76-89.
108. Vrtačnik P, Marc J, Ostanek B. Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med.* 2014 May;52(5):589-608.
109. Pérez-Machado G, Seco-Cervera M, Berenguer-Pascual E, Mena-Mollá S, Hermida TB, Deml MC, et al. Chapter 16 - Epigenetics in spine curvature disorders. In: García-Giménez JLBT-E in PM, editor. *Translational Epigenetics.* Academic Press; 2022. p. 449–69.
110. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008 Apr;4(2):68-75

111. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way. *Development*. 2004;131(8):1663–77.
112. Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2007 Oct;28(10):518-25.
113. Wallingford JB, Habas R. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*. 2005 Oct;132(20):4421-36.
114. Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol*. 2005;4(1):2.
115. Daniels DL, Weis WI. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Apr;12(4):364-71.
116. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781-810.
117. Scaglia P, Sanguineti N, Aza-carmona M, Blanco N, Badia PDL, Fern C, et al. Síndrome de osteoporosis-pseudoglioma: a propósito de un caso pediátrico de osteoporosis primaria. *Arch Argent Pediatr*. 2020;118(3):300–4.
118. Kwee ML, Balemans W, Cleiren E, Gille JJ, Van Der Blij F, Sepers JM, Van Hul W. An autosomal dominant high bone mass phenotype in association with craniosynostosis in an extended family is caused by an LRP5 missense mutation. *J Bone Miner Res*. 2005 Jul;20(7):1254-60.
119. Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL, Müller U. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet*. 2004 Mar;74(3):558-63.

120. Ke HZ, Richards WG, Li X, Ominsky MS. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases. *Endocr Rev.* 2012 Oct;33(5):747-83.
121. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2005 May 20;280(20):19883-7.
122. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone.* 2004 Oct;35(4):828-35.
123. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One.* 2011;6(10):e25900.
124. Kamiya N, Kobayashi T, Mochida Y, Yu PB, Yamauchi M, Kronenberg HM, Mishina Y. Wnt inhibitors Dkk1 and Sost are downstream targets of BMP signaling through the type IA receptor (BMPRIA) in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2010 Feb;25(2):200-10.
125. Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone.* 2005 Aug;37(2):148-58.
126. Genetos DC, Toupadakis CA, Raheja LF, Wong A, E S, Fyhrie DP, et al. NIH Public Access. *In Vitro.* 2010;110(2):457–67.
127. Genetos DC, Yellowley CE, Loots GG. Prostaglandin E2 signals through PTGER2 to regulate sclerostin expression. *PLoS One.* 2011 Mar 16;6(3):e17772.
128. Vincent C, Findlay DM, Welldon KJ, Wijenayaka AR, Zheng TS, Haynes DR, Fazzalari NL, Evdokiou A, Atkins GJ. Pro-inflammatory cytokines TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNFalpha induce the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent expression of

- sclerostin in human osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2009 Aug;24(8):1434-49.
129. Bonnet N, Standley KN, Bianchi EN, Stadelmann V, Foti M, Conway SJ, Ferrari SL. The matricellular protein periostin is required for sost inhibition and the anabolic response to mechanical loading and physical activity. *J Biol Chem.* 2009 Dec 18;284(51):35939-50.
130. Dawson-Hughes B, Harris SS, Ceglia L, Palermo NJ. Serum sclerostin levels vary with season. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jan;99(1):E149-52.
131. Dawson-Hughes B, Harris SS, Ceglia L, Palermo NJ. Serum sclerostin levels vary with season. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jan;99(1):E149-52.
132. Galea GL, Meakin LB, Sugiyama T, Zebda N, Sunters A, Taipaleenmaki H, Stein GS, van Wijnen AJ, Lanyon LE, Price JS. Estrogen receptor α mediates proliferation of osteoblastic cells stimulated by estrogen and mechanical strain, but their acute down-regulation of the Wnt antagonist Sost is mediated by estrogen receptor β . *J Biol Chem.* 2013 Mar 29;288(13):9035-48.
133. Sevetson B, Taylor S, Pan Y. Cbfa1/RUNX2 directs specific expression of the sclerosteosis gene (SOST). *J Biol Chem.* 2004 Apr 2;279(14):13849-58.
134. Reppe S, Noer A, Grimholt RM, Halldórsson BV, Medina-Gomez C, Gautvik VT, Olstad OK, Berg JP, Datta H, Estrada K, Hofman A, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Lyle R, Collas P, Gautvik KM. Methylation of bone SOST, its mRNA, and serum sclerostin levels correlate strongly with fracture risk in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2015 Feb;30(2):249-56.

135. Lhaneche L, Hald JD, Domingues A, Hannouche D, Delepine M, Zelenika D, Boland A, Ostertag A, Cohen-Solal M, Langdahl BL, Harsløf T, de Vernejoul MC, Geoffroy V, Jehan F. Variations of SOST mRNA expression in human bone are associated with DNA polymorphism and DNA methylation in the SOST gene. *Bone*. 2016 Nov;92:107-115.
136. Delgado-Calle J, Sañudo C, Bolado A, Fernández AF, Arozamena J, Pascual-Carra MA, Rodriguez-Rey JC, Fraga MF, Bonewald L, Riancho JA. DNA methylation contributes to the regulation of sclerostin expression in human osteocytes. *J Bone Miner Res*. 2012 Apr;27(4):926-37.
137. Shan Y, Wang L, Li G, Shen G, Zhang P, Xu Y. Methylation of bone SOST impairs SP7, RUNX2, and ER α transactivation in patients with postmenopausal osteoporosis. *Biochem Cell Biol*. 2019 Aug;97(4):369-374.
138. Papathanasiou I, Kostopoulou F, Malizos KN, Tsezou A. DNA methylation regulates sclerostin (SOST) expression in osteoarthritic chondrocytes by bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induced changes in Smads binding affinity to the CpG region of SOST promoter. *Arthritis Res Ther*. 2015 Jun 12;17(1):160.
139. Balemans W, Patel N, Ebeling M, Van Hul E, Wuyts W, Lacza C, Dioszegi M, Dikkers FG, Hildering P, Willems PJ, Verheij JB, Lindpaintner K, Vickery B, Foernzler D, Van Hul W. Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet*. 2002 Feb;39(2):91-7.
140. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res*. 2008 Jun;23(6):860-9.

141. Mödder UI, Hoey KA, Amin S, McCready LK, Achenbach SJ, Riggs BL, Melton LJ 3rd, Khosla S. Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men. *J Bone Miner Res.* 2011 Feb;26(2):373-9.
142. Coulson J, Bagley L, Barnouin Y, Bradburn S, Butler-Browne G, Gapeyeva H, Hogrel JY, Maden-Wilkinson T, Maier AB, Meskers C, Murgatroyd C, Narici M, Pääsuke M, Sassano L, Sipilä S, Al-Shanti N, Stenroth L, Jones DA, McPhee JS. Circulating levels of dickkopf-1, osteoprotegerin and sclerostin are higher in old compared with young men and women and positively associated with whole-body bone mineral density in older adults. *Osteoporos Int.* 2017 Sep;28(9):2683-2689.
143. Durosier C, van Lierop A, Ferrari S, Chevalley T, Papapoulos S, Rizzoli R. Association of circulating sclerostin with bone mineral mass, microstructure, and turnover biochemical markers in healthy elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Sep;98(9):3873-83.
144. Ishimura E, Okuno S, Ichii M, Norimine K, Yamakawa T, Shoji S, Nishizawa Y, Inaba M. Relationship between serum sclerostin, bone metabolism markers, and bone mineral density in maintenance hemodialysis patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Nov;99(11):4315-20.
145. Amrein K, Amrein S, Drexler C, Dimai HP, Dobnig H, Pfeifer K, Tomaschitz A, Pieber TR, Fahrleitner-Pammer A. Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jan;97(1):148-54.
146. Hampson G, Edwards S, Conroy S, Blake GM, Fogelman I, Frost ML. The relationship between inhibitors of the Wnt signalling pathway (Dickkopf-1(DKK1) and sclerostin), bone mineral density, vascular calcification and arterial stiffness in post-menopausal women. *Bone.* 2013 Sep;56(1):42-7.

147. Kerschán-Schindl K, Föger-Samwald U, Gleiss A, Kudlacek S, Wallwitz J, Pietschmann P. Circulating bioactive sclerostin levels in an Austrian population-based cohort. *Wien Klin Wochenschr.* 2022 Jan;134(1-2):39-44.
148. He J, Zhang H, Wang C, Zhang Z, Yue H, Hu W, Gu J, Fu W, Hu Y, Li M, Liu Y, Zheng H, Zhang Z. Associations of serum sclerostin and polymorphisms in the SOST gene with bone mineral density and markers of bone metabolism in postmenopausal Chinese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Apr;99(4):E665-73.
149. Register TC, Hruska KA, Divers J, Bowden DW, Palmer ND, Carr JJ, Wagenknecht LE, Hightower RC, Xu J, Smith SC, Dietzen DJ, Langefeld CD, Freedman BI. Sclerostin is positively associated with bone mineral density in men and women and negatively associated with carotid calcified atherosclerotic plaque in men from the African American-Diabetes Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jan;99(1):315-21.
150. Lapauw B, Vandewalle S, Taes Y, Goemaere S, Zmierzczak H, Collette J, Kaufman JM. Serum sclerostin levels in men with idiopathic osteoporosis. *Eur J Endocrinol.* 2013 Mar 15;168(4):615-20.
151. Tian J, Xu XJ, Shen L, Yang YP, Zhu R, Shuai B, Zhu XW, Li CG, Ma C, Lv L. Association of serum Dkk-1 levels with β -catenin in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2015 Apr;35(2):212-218.
152. Maïmoun L, Ben Bouallègue F, Gelis A, Aouinti S, Mura T, Philibert P, Souberbielle JC, Piketty M, Garnero P, Mariano-Goulart D, Fattal C. Periostin and sclerostin levels in individuals with spinal cord injury and their relationship with bone mass, bone turnover, fracture and osteoporosis status. *Bone.* 2019 Oct;127:612-619.

153. Suarjana IN, Isbagio H, Soewondo P, Rachman IA, Sadikin M, Prihartono J, Malik SG, Soeroso J. The Role of Serum Expression Levels of Microrna-21 on Bone Mineral Density in Hypostrogenic Postmenopausal Women with Osteoporosis: Study on Level of RANKL, OPG, TGF β -1, Sclerostin, RANKL/OPG Ratio, and Physical Activity. *Acta Med Indones.* 2019 Jul;51(3):245-252.
154. Ardawi MS, Rouzi AA, Al-Sibiani SA, Al-Senani NS, Qari MH, Mousa SA. High serum sclerostin predicts the occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women: the Center of Excellence for Osteoporosis Research Study. *J Bone Miner Res.* 2012 Dec;27(12):2592-602.
155. Lim Y, Kim CH, Lee SY, Kim H, Ahn SH, Lee SH, Koh JM, Rhee Y, Baek KH, Min YK, Kim DY, Kim BJ, Kang MI. Decreased Plasma Levels of Sclerostin But Not Dickkopf-1 are Associated with an Increased Prevalence of Osteoporotic Fracture and Lower Bone Mineral Density in Postmenopausal Korean Women. *Calcif Tissue Int.* 2016 Oct;99(4):350-9.
156. Arasu A, Cawthon PM, Lui LY, Do TP, Arora PS, Cauley JA, Ensrud KE, Cummings SR; Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Serum sclerostin and risk of hip fracture in older Caucasian women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jun;97(6):2027-32.
157. Garnero P, Sornay-Rendu E, Munoz F, Borel O, Chapurlat RD. Association of serum sclerostin with bone mineral density, bone turnover, steroid and parathyroid hormones, and fracture risk in postmenopausal women: the OFELY study. *Osteoporos Int.* 2013 Feb;24(2):489-94.
158. Dovjak P, Dorfer S, Föger-Samwald U, Kudlacek S, Marculescu R, Pietschmann P. Serum levels of sclerostin and dickkopf-1: effects of age, gender and fracture status. *Gerontology.* 2014;60(6):493-501.
159. Weivoda MM, Youssef SJ, Oursler MJ. Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte. *Bone.* 2017 Mar;96:45-50.

160. Wang P, Cao Y, Zhan D, Wang D, Wang B, Liu Y, Li G, He W, Wang H, Xu L. Influence of DNA methylation on the expression of OPG/RANKL in primary osteoporosis. *Int J Med Sci*. 2018 Oct 3;15(13):1480-1485.
161. Gennari L, Bianciardi S, Merlotti D. MicroRNAs in bone diseases. *Osteoporos Int*. 2017 Apr;28(4):1191-1213.
162. Chen Z, Bemben MG, Bemben DA. Bone and muscle specific circulating microRNAs in postmenopausal women based on osteoporosis and sarcopenia status. *Bone*. 2019 Mar;120:271-278.
163. Torres Jimenez, Ana Paola & Torres Rincon JM. Climaterio y menopausia. GPC. *Rev la Fac Med la UNAM*. 2018;61(2):51–8.
164. Uccioli L, Monticone G, Russo F, Mormile F, Durola L, Mennuni G, Bergamo F, Menzinger G. Autonomic neuropathy and transcutaneous oxymetry in diabetic lower extremities. *Diabetologia*. 1994 Oct;37(10):1051-5.
165. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Jul;96(7):1911-30.
166. Colen MW, Statham AL, Gardiner-Garden M, Clark SJ. Genomic profiling of CpG methylation and allelic specificity using quantitative high-throughput mass spectrometry: critical evaluation and improvements. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(18):e119.
167. De Sena Brandine G, Smith AD. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. *F1000Res*. 2019 Nov 7;8:1874.

168. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads."EMBnet.journal, 17.1 (2011): pp. 10-12. Web. 2 Nov. 2023.
169. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. Nat Preced. 2010.
170. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. Plant Methods. 2007 Oct 12;3:12.
171. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D68-73.
172. Materozzi M, Merlotti D, Gennari L, Bianciardi S. The Potential Role of miRNAs as New Biomarkers for Osteoporosis. Int J Endocrinol. 2018 May 6;2018:2342860.
173. Tang P, Xiong Q, Ge W, Zhang L. The role of microRNAs in osteoclasts and osteoporosis. RNA Biol. 2014;11(11):1355-63.
174. Ji X, Chen X, Yu X. MicroRNAs in Osteoclastogenesis and Function: Potential Therapeutic Targets for Osteoporosis. Int J Mol Sci. 2016 Mar 9;17(3):349.
175. Seeliger C, Balmayor ER, van Griensven M. miRNAs Related to Skeletal Diseases. Stem Cells Dev. 2016 Sep 1;25(17):1261-81.
176. Liu Y, Wang Y, Cheng X, Zheng Y, Lyu M, Di P, Lin Y. MiR-181d-5p regulates implant surface roughness-induced osteogenic differentiation of bone marrow stem cells. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021 Feb; 121:111801.

177. Dai J, Lu L, Kang L, Zhang J. MiR-501-3p promotes osteosarcoma cell proliferation, migration and invasion by targeting BCL7A. *Hum Cell*. 2021 Mar;34(2):624-633.
178. Wang G, Zhao Y, Zheng Y. MiR-122/Wnt/ β -catenin regulatory circuitry sustains glioma progression. *Tumour Biol*. 2014 Sep;35(9):8565-72.
179. Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, Yagi K, Yatsuka-Kanesaki Y, Suda T, Fukuda T, Katagiri T, Kondoh Y, Amemiya T, Tashiro H, Okazaki Y. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett*. 2009 Jul 7;583(13):2263-8.
180. Ell B, Kang Y. MicroRNAs as regulators of bone homeostasis and bone metastasis. *Bonekey Rep*. 2014 Jul 2;3:549.
181. Jin Y, Tymen SD, Chen D, Fang ZJ, Zhao Y, Dragas D, Dai Y, Marucha PT, Zhou X. MicroRNA-99 family targets AKT/mTOR signaling pathway in dermal wound healing. *PLoS One*. 2013 May 28;8(5):e64434.
182. Gougelet A, Pissaloux D, Besse A, Perez J, Duc A, Dutour A, Blay JY, Alberti L. Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. *Int J Cancer*. 2011 Aug 1;129(3):680-90.
183. Ding M, Liu B, Chen X, Ouyang Z, Peng D, Zhou Y. MiR-99b-5p suppressed proliferation of human osteoblasts by targeting FGFR3 in osteoporosis. *Hum Cell*. 2021 Sep;34(5):1398-1409.
184. Martínez Pérez JA, Pérez Martín PS. La curva ROC [ROC curve]. *Semergen*. 2023 Jan-Feb;49(1):101821.
185. Jia Z, Tang M, Zhang X, Jiang W, Shen J, Zhou N, Hao J. Changes in Bone Turnover Markers after Osteoporotic Vertebral Compression Fractures in Males and Females. *Biomed Res Int*. 2022 Nov 23; 2022:5381601.

186. Højsager FD, Rand MS, Pedersen SB, Nissen N, Jørgensen NR. Fracture-induced changes in biomarkers CTX, PINP, OC, and BAP-a systematic review. *Osteoporos Int.* 2019 Dec;30(12):2381-2389.
187. Qi H, Xue J, Gao J, Zhang Y, Sun J, Wang G. Changes of Bone Turnover Markers and Bone Tissue Content After Severe Osteoporotic Vertebral Compression Fracture. *Med Sci Monit.* 2020 Jun 14;26: e923713.
188. Ivaska KK, Gerdhem P, Akesson K, Garnero P, Obrant KJ. Effect of fracture on bone turnover markers: a longitudinal study comparing marker levels before and after injury in 113 elderly women. *J Bone Miner Res.* 2007 Aug;22(8):1155-64.
189. Zhang J, Wang Y, Cheng KL, Cheuk K, Lam TP, Hung ALH, Cheng JCY, Qiu Y, Müller R, Christen P, Lee WYW. Association of higher bone turnover with risk of curve progression in adolescent idiopathic scoliosis. *Bone.* 2021 Feb; 143:115655.
190. Lin S, Cai X, Cheng Q, Chen C, Cao X, Yang F, Fan Y. Association between bone turnover markers, BMD and height loss of cemented vertebrae after percutaneous vertebroplasty in patients with osteoporotic vertebral compression fractures. *J Orthop Surg Res.* 2022 Apr 4;17(1):202.
191. Drake MT, Srinivasan B, Mödder UI, Peterson JM, McCready LK, Riggs BL, Dwyer D, Stolina M, Kostenuik P, Khosla S. Effects of parathyroid hormone treatment on circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Nov;95(11):5056-62.
192. Polyzos SA, Anastasilakis AD, Bratengeier C, Woloszczuk W, Papatheodorou A, Terpos E. Serum sclerostin levels positively correlate with lumbar spinal bone mineral density in postmenopausal women--the six-month effect of risedronate and teriparatide. *Osteoporos Int.* 2012 Mar;23(3):1171-6.

193. Wells GA, Hsieh SC, Zheng C, Peterson J, Tugwell P, Liu W. Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2022 May 3;5(5):CD004523.
194. Deardorff WJ, Cenzer I, Nguyen B LS. Estimate of time to benefit from bisphosphonate therapy. *Drug Ther Bull.* 2022 Jun;60(6):87.
195. Zhang J, Chen H, Leung RKK, Choy KW, Lam TP, Ng BKW, Qiu Y, Feng JQ, Cheng JCY, Lee WYW. Aberrant miR-145-5p/ β -catenin signal impairs osteocyte function in adolescent idiopathic scoliosis. *FASEB J.* 2018 Jun 15:fj201800281.
196. Vasiliadis ES, Evangelopoulos DS, Kaspiris A, Vlachos C, Pneumaticos SG. Sclerostin and Its Involvement in the Pathogenesis of Idiopathic Scoliosis. *J Clin Med.* 2021 Nov 14;10(22):5286.
197. Acaroglu E, Akel I, Alanay A, Yazici M, Marcucio R. Comparison of the melatonin and calmodulin in paravertebral muscle and platelets of patients with or without adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009 Aug 15;34(18):E659-63.
198. Nishizawa Y, Okui Y, Inaba M, Okuno S, Yukioka K, Miki T, Watanabe Y, Morii H. Calcium/calmodulin-mediated action of calcitonin on lipid metabolism in rats. *J Clin Invest.* 1988 Oct;82(4):1165-72.
199. Gooi JH, Pompolo S, Karsdal MA, Kulkarni NH, Kalajzic I, McAhren SH, Han B, Onyia JE, Ho PW, Gillespie MT, Walsh NC, Chia LY, Quinn JM, Martin TJ, Sims NA. Calcitonin impairs the anabolic effect of PTH in young rats and stimulates expression of sclerostin by osteocytes. *Bone.* 2010 Jun;46(6):1486-97.
200. Zhou R, Yuan Z, Liu J, Liu J. Calcitonin gene-related peptide promotes the expression of osteoblastic genes and activates the WNT signal

transduction pathway in bone marrow stromal stem cells. *Mol Med Rep.* 2016 Jun;13(6):4689-96.

201. Xu E, Lin T, Jiang H, Ji Z, Shao W, Meng Y, Gao R, Zhou X. Asymmetric expression of GPR126 in the convex/concave side of the spine is associated with spinal skeletal malformation in adolescent idiopathic scoliosis population. *Eur Spine J.* 2019 Sep;28(9):1977-1986.
202. Cisternas P, Henriquez JP, Brandan E, Inestrosa NC. Wnt signaling in skeletal muscle dynamics: myogenesis, neuromuscular synapse and fibrosis. *Mol Neurobiol.* 2014 Feb;49(1):574-89.
203. Dahia CL, Mahoney EJ, Durrani AA, Wylie C. Intercellular signaling pathways active during intervertebral disc growth, differentiation, and aging. *Spine (Phila Pa 1976).* 2009 Mar 1;34(5):456-62.
204. Tamamura Y, Otani T, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Constantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Developmental regulation of Wnt/-Catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* 2005, 280:19185-19195.
205. Roforth MM, Fujita K, McGregor UI, Kirmani S, McCready LK, Peterson JM, Drake MT, Monroe DG, Khosla S. Effects of age on bone mRNA levels of sclerostin and other genes relevant to bone metabolism in humans. *Bone.* 2014 Feb; 59:1-6.
206. Wijenayaka AR, Prideaux M, Yang D, Morris HA, Findlay DM, Anderson PH, Atkins GJ. Early response of the human SOST gene to stimulation by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Nov; 164:369-373.

207. Shantanam S, MUELLER. Extra-skeletal actions of vitamin D. *Physiol Behav.* 2018;176(1):139–48.
208. Kalem MN, Kalem Z, Akgun N, Bakırarar B. The relationship between postmenopausal women's sclerostin levels and their bone density, age, body mass index, hormonal status, and smoking and consumption of coffee and dairy products. *Arch Gynecol Obstet.* 2017 Mar;295(3):785-793.
209. Reppe S, Noer A, Grimholt RM, Halldórsson BV, Medina-Gomez C, Gautvik VT, Olstad OK, Berg JP, Datta H, Estrada K, Hofman A, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Lyle R, Collas P, Gautvik KM. Methylation of bone SOST, its mRNA, and serum sclerostin levels correlate strongly with fracture risk in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2015 Feb;30(2):249-56.
210. Ardawi MS, Al-Kadi HA, Rouzi AA, Qari MH. Determinants of serum sclerostin in healthy pre- and postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2011 Dec;26(12):2812-22.
211. Dawson-Hughes B, Harris SS, Ceglia L, Palermo NJ. Effect of supplemental vitamin D and calcium on serum sclerostin levels. *Eur J Endocrinol.* 2014 Mar 13;170(4):645-50.
212. Sankaralingam A, Roplekar R, Turner C, Dalton RN, Hampson G. Changes in Dickkopf-1 (DKK1) and Sclerostin following a Loading Dose of Vitamin D 2 (300,000 IU). *J Osteoporos.* 2014; 2014:682763.
213. Tomé-Bermejo F, Piñera AR, Alvarez L. Osteoporosis and the Management of Spinal Degenerative Disease (II). *Arch Bone Jt Surg.* 2017 Nov;5(6):363-374.

214. Panach L, Mifsut D, Tarín JJ, Cano A, García-Pérez MÁ. Serum Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture. *Calcif Tissue Int*. 2015 Nov;97(5):495-505.
215. Weilner S, Skalicky S, Salzer B, Keider V, Wagner M, Hildner F, Gabriel C, Dovjak P, Pietschmann P, Grillari-Voglauer R, Grillari J, Hackl M. Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation. *Bone*. 2015 Oct; 79:43-51.
216. Al-Rawaf HA, Alghadir AH, Gabr SA. Circulating MicroRNA Expression, Vitamin D, and Hypercortisolism as Predictors of Osteoporosis in Elderly Postmenopausal Women. *Dis Markers*. 2021 Dec 13; 2021:3719919.
217. Mandourah AY, Ranganath L, Barraclough R, Vinjamuri S, Hof RV, Hamill S, Czanner G, Dera AA, Wang D, Barraclough DL. Circulating microRNAs as potential diagnostic biomarkers for osteoporosis. *Sci Rep*. 2018 May 30;8(1):8421.
218. Garg B, Malhotra R, Mittal S, Kumar A, Mehta N, Malik G, Gupta M, Trikha V. Differential miRNA Expression in Osteoporotic Elderly Patients with Hip Fractures Compared to Young Patients. *Indian J Orthop*. 2021 Nov 13;56(3):399-411.
219. Seeliger C, Karpinski K, Haug AT, Vester H, Schmitt A, Bauer JS, van Griensven M. Five freely circulating miRNAs and bone tissue miRNAs are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*. 2014 Aug;29(8):1718-28.
220. Kocijan R, Muschitz C, Geiger E, Skalicky S, Baierl A, Dormann R, Plachel F, Feichtinger X, Heimerl P, Fahrleitner-Pammer A, Grillari J, Redl H, Resch H, Hackl M. Circulating microRNA Signatures in Patients with Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Nov;101(11):4125-4134.

221. Kelch S, Balmayor ER, Seeliger C, Vester H, Kirschke JS, van Griensven M. miRNAs in bone tissue correlate to bone mineral density and circulating miRNAs are gender independent in osteoporotic patients. *Sci Rep*. 2017 Nov 20;7(1):15861.
222. Chen R, Liao X, Chen F, Wang B, Huang J, Jian G, Huang Z, Yin G, Liu H, Jin D. Circulating microRNAs, miR-10b-5p, miR-328-3p, miR-100 and let-7, are associated with osteoblast differentiation in osteoporosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018 Mar 1;11(3):1383-1390.
223. Ladang A, Beaudart C, Locquet M, Reginster JY, Bruyère O, Cavalier E. Evaluation of a Panel of MicroRNAs that Predicts Fragility Fracture Risk: A Pilot Study. *Calcif Tissue Int*. 2020 Mar;106(3):239-247.
224. Ramírez-Salazar EG, Carrillo-Patiño S, Hidalgo-Bravo A, Rivera-Paredes B, Quiterio M, Ramírez-Palacios P, Patiño N, Valdés-Flores M, Salmerón J, Velázquez-Cruz R. Serum miRNAs miR-140-3p and miR-23b-3p as potential biomarkers for osteoporosis and osteoporotic fracture in postmenopausal Mexican-Mestizo women. *Gene*. 2018 Dec 30; 679:19-27.
225. Li H, Wang Z, Fu Q, Zhang J. Plasma miRNA levels correlate with sensitivity to bone mineral density in postmenopausal osteoporosis patients. *Biomarkers*. 2014 Nov;19(7):553-6.
226. Zhao Z, Li X, Zou D, Lian Y, Tian S, Dou Z. Expression of microRNA-21 in osteoporotic patients and its involvement in the regulation of osteogenic differentiation. *Exp Ther Med*. 2019 Jan;17(1):709-714.
227. Chen Z, Bemben MG, Bemben DA. Bone and muscle specific circulating microRNAs in postmenopausal women based on osteoporosis and sarcopenia status. *Bone*. 2019 Mar; 120:271-278.

228. Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng XH, Lappe JM, Recker RR, Xiao P. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS One*. 2014 May 12;9(5):e97098.
229. Hui S, Yang Y, Li J, Li N, Xu P, Li H, Zhang Y, Wang S, Lin G, Li S, Qiu G, Zhao RC, Zhang J, Zhuang Q. Differential miRNAs profile and bioinformatics analyses in bone marrow mesenchymal stem cells from adolescent idiopathic scoliosis patients. *Spine J*. 2019 Sep;19(9):1584-1596.
230. Zheng J, Yang Y, Zhao K, Wang R. Low expression of microRNA-143 is related to degenerative scoliosis possibly by regulation of cyclooxygenase-2 expression. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Mar 15;8(3):4140-5.
231. Saidak Z, Le Henaff C, Azzi S, Marty C, Da Nascimento S, Sonnet P, Marie PJ. Wnt/ β -catenin signaling mediates osteoblast differentiation triggered by peptide-induced $\alpha 5\beta 1$ integrin priming in mesenchymal skeletal cells. *J Biol Chem*. 2015 Mar 13;290(11):6903-12.
232. Doble BW, Patel S, Wood GA, Kockeritz LK, Woodgett JR. Functional redundancy of GSK-3 α and GSK-3 β in Wnt/ β -catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. *Dev Cell*. 2007 Jun;12(6):957-71.
233. Nair R, Santos L, Awasthi S, von Erlach T, Chow LW, Bertazzo S, Stevens MM. Extracellular vesicles derived from preosteoblasts influence embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells Dev*. 2014 Jul 15;23(14):1625-35.
234. Wang T, Xu Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Nov 12;402(2):186-9.

235. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013 Feb;19(2):179-92.
236. Bramono DS, Murali S, Rai B, Ling L, Poh WT, Lim ZX, Stein GS, Nurcombe V, van Wijnen AJ, Cool SM. Bone marrow-derived heparan sulfate potentiates the osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). *Bone*. 2012 Apr;50(4):954-64.
237. Xin JX, Yue Z, Zhang S, Jiang ZH, Wang PY, Li YJ, Pang M, Xie SY. miR-99 inhibits cervical carcinoma cell proliferation by targeting TRIB2. *Oncol Lett*. 2013 Oct;6(4):1025-1030.
238. Zhang M, Guo Y, Wu J, Chen F, Dai Z, Fan S, Li P, Song T. Roles of microRNA-99 family in human glioma. *Onco Targets Ther*. 2016 Jun 20;9:3613-9.
239. Khalaj M, Woolthuis CM, Hu W, Durham BH, Chu SH, Qamar S, Armstrong SA, Park CY. miR-99 regulates normal and malignant hematopoietic stem cell self-renewal. *J Exp Med*. 2017 Aug 7;214(8):2453-2470.
240. Iñiguez-Ariza NM, Clarke BL. Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*. 2015 Oct;82(2):245-55.
241. Attisano L, Wrana JL. Signal integration in TGF- β , WNT, and Hippo pathways. *F1000Prime Rep*. 2013 Jun 3; 5:17. doi: 10.12703/P5-17.
242. Kim M, Jho EH. Cross-talk between Wnt/ β -catenin and Hippo signaling pathways: a brief review. *BMB Rep*. 2014 Oct;47(10):540-5.
243. Xiao H, Shan L, Zhu H, Xue F. Detection of significant pathways in osteoporosis based on graph clustering. *Mol Med Rep*. 2012 Dec;6(6):1325-32.

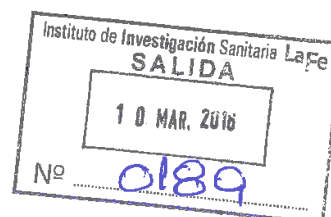
244. Tian E, Ten Hagen KG. Recent insights into the biological roles of mucin-type O-glycosylation. *Glycoconj J*. 2009 Apr;26(3):325-34.
245. Guntur AR, Rosen CJ, Naski MC. N-cadherin adherens junctions mediate osteogenesis through PI3K signaling. *Bone*. 2012 Jan;50(1):54-62.
246. Haÿ E, Nouraud A, Marie PJ. N-cadherin negatively regulates osteoblast proliferation and survival by antagonizing Wnt, ERK and PI3K/Akt signalling. *PLoS One*. 2009 Dec 14;4(12):e8284.
247. Daamouch S, Emini L, Rauner M, Hofbauer LC. MicroRNA and Diabetic Bone Disease. *Curr Osteoporos Rep*. 2022 Jun;20(3):194-201.
248. Heilmeier U, Hackl M, Skalicky S, Weilner S, Schroeder F, Vierlinger K, Patsch JM, Baum T, Oberbauer E, Lobach I, Burghardt AJ, Schwartz AV, Grillari J, Link TM. Serum miRNA Signatures Are Indicative of Skeletal Fractures in Postmenopausal Women With and Without Type 2 Diabetes and Influence Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro. *J Bone Miner Res*. 2016 Dec;31(12):2173-2192.
249. Heilmeier U, Hackl M, Schroeder F, Torabi S, Kapoor P, Vierlinger K, Eiriksdottir G, Gudmundsson EF, Harris TB, Gudnason V, Link TM, Grillari J, Schwartz AV. Circulating serum microRNAs including senescent miR-31-5p are associated with incident fragility fractures in older postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Bone*. 2022 May;158:116308.
250. Grieco GE, Cataldo D, Ceccarelli E, Nigi L, Catalano G, Brusco N, Mancarella F, Ventriglia G, Fondelli C, Guarino E, Crisci I, Sebastiani G, Dotta F. Serum Levels of miR-148a and miR-21-5p Are Increased in Type 1 Diabetic Patients and Correlated with Markers of Bone Strength and Metabolism. *Noncoding RNA*. 2018 Nov 27;4(4):37.

251. Wang R, Zhang Y, Jin F, Li G, Sun Y, Wang X. High-glucose-induced miR-214-3p inhibits BMSCs osteogenic differentiation in type 1 diabetes mellitus. *Cell Death Discov* [Internet]. 2019;5(1):1–11.
252. Zhang G, Li H, Zhao W, Li M, Tian L, Ju W, Li X. miR-205 regulates bone turnover in elderly female patients with type 2 diabetes mellitus through targeted inhibition of Runx2. *Exp Ther Med*. 2020 Aug;20(2):1557-1565.
253. Vulf M, Khlusov I, Yurova K, Todosenko N, Komar A, Kozlov I, Malashchenko V, Shunkina D, Khaziakhmatova O, Litvinova L. MicroRNA Regulation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Development of Osteoporosis in Obesity. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2022 Jun 23;14(3):17.
254. Klötting N, Berthold S, Kovacs P, Schön MR, Fasshauer M, Ruschke K, Stumvoll M, Blüher M. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One*. 2009;4(3):e4699.
255. Sedlmeier EM, Meyer DM, Stecher L, Sailer M, Daniel H, Hauner H, Bader BL. Fetal sex modulates placental microRNA expression, potential microRNA-mRNA interactions, and levels of amino acid transporter expression and substrates: INFAT study subpopulation analysis of n-3 LCPUFA intervention during pregnancy and associations with offspring body composition. *BMC Mol Cell Biol*. 2021 Mar 3;22(1):15.
256. Heianza Y, Krohn K, Yaskolka Meir A, Wang X, Ziesche S, Ceglarek U, Blüher M, Keller M, Kovacs P, Shai I, Qi L. Changes in Circulating miR-375-3p and Improvements in Visceral and Hepatic Fat Contents in Response to Lifestyle Interventions: The CENTRAL Trial. *Diabetes Care*. 2022 Aug 1;45(8):1911-1913.
257. Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Fernández-Real JM. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One*. 2010 Feb 2;5(2):e9022.

258. Lisse TS, Adams JS, Hewison M. Vitamin D and microRNAs in bone. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2013;23(3):195-214.

ANEXOS

ANEXO 1



Dra. Teresa Bas Hermida
Servicio de Cirugía Ortopédica y Trauma

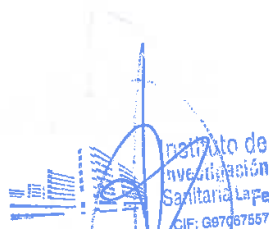
Asunto: Autorización Inicio Estudio.

Valencia, 9 de Marzo de 2016

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente** sobre el Proyecto de Investigación titulado "REGULACION EPIGENETICA DE LA ESCLEROSTINA Y DE LA RUTA WNT/B-CATENINA EN OSTEOPOROSIS. IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES BASADOS EN LA METILACION DEL ADN Y LOS MICROARNS DE FRAGILIDAD OSEA", por usted presentado.

A la vista de los dictámenes emitidos, dicho Proyecto, puede iniciarse y llevarse a cabo.

Atentamente,



José Vicente Castell Ripoll
Director General

Valencia a 9 de Marzo de 2016

El **Dr. Rafael Botella Estrada**, Presidente de la Comisión de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe,

INFORMA:

Que el Proyecto de Investigación titulado: "REGULACION EPIGENETICA DE LA ESCLEROSTINA Y DE LA RUTA WNT/B-CATENINA EN OSTEOPOROSIS. IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES BASADOS EN LA METILACION DEL ADN Y LOS MICROARNS DE FRAGILIDAD OSEA" que presenta la **Dra. Teresa Bas Herminia** del Área Clínica de Cirugía Ortopédica y Trauma del Hospital U. i P. La Fe, contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse positivamente en cuanto a su viabilidad.

P.O.



Rafael Botella Estrada
Presidente de la Comisión de Investigación



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **12 de enero de 2016**, el Proyecto de Investigación titulado **“REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA ESCLEROSTINA Y DE LA RUTA WNT/B-CATENINA EN OSTEOPOROSIS. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES BASADOS EN LA METILACIÓN DEL ADN Y LOS MICROARNS DE FRAGILIDAD ÓSEA.”**, con nº de registro **2016/0060**.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. TERESA BAS HERMIDA** del servicio de **CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMA** como Investigador Principal.

Miembros del CEIB:

Presidente:

Dr. JOAN SALOM SANVALERO (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Vicepresidente:

Dr. JOSE VICENTE CERVERA ZAMORA (Hematología)

Secretario:

D. SERAFIN RODRIGUEZ CAPELLAN (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. SALVADOR ALIÑO PELLICER (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Dr. LUIS ALMENAR BONET (Cardiología)

Dra. ESTHER ZORIO GRIMA (Cardiología)

Dra. BELEN BELTRAN NICLOS (Medicina Digestiva)

Dra. INMACULADA CALVO PENADES (Reumatología Pediátrica)

Dr. JOSE VICENTE CASTELL RIPOLL (Director de Investigación)

Dra. MARIA JOSE GOMEZ-LECHON MOLINER (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)

Dr. JOSE LOPEZ ALDEGUER (Enfermedades Infecciosas)

Dr. JAVIER PEMAN GARCIA (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)

Dr. ALFREDO PERALES MARIN (Jefe de Servicio - Obstetricia)

Dra. PILAR SAENZ GONZALEZ (Neonatología)

Dr. MELCHOR HOYOS GARCIA ()

Dra. BEGOÑA POLO MIQUEL (Gastroenterología Pediátrica)

Dr. ISIDRO VITORIA MIÑANA (Pediatria)

Dra. EUGENIA PAREJA IBARS (Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático)



Dr. JAIME SANZ CABALLER (Investigador del Grupo Acreditado en Hematología y Hemoterapia)
Dra. PILAR SEPULVEDA SANCHIS (Cardiociulatorio)
Dra. MARIA LUISA MARTINEZ TRIGUERO (Análisis Clínicos)
Dra. MARIA TORDERA BAVIERA (Farmacéutica del Hospital)
Dr. ENRIQUE VIOSCA HERRERO (Jefe de Servicio - Medicina Física y Rehabilitación)
Dr. EDUARDO GARCIA-GRANERO XIMENEZ (Cirugía General y Digestivo)
Dr. RAFAEL BOTELLA ESTRADA (Dermatología)
Dr. OSCAR DIAZ CAMBRONERO (Anestesia y Reanimación)

Lo que firmo en Valencia, a 12 de enero de 2016



Fdo.: Don Serafín Rodríguez Capellán
Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica



***OBSERVACIONES ADICIONALES AL DICTAMEN:**

Se emite INFORME FAVORABLE, pero se sugiere al investigador principal que, antes de comenzar el estudio, realice las siguientes mejoras en la HIP:

- En la cláusula tercera, deberían simplificar el lenguaje para su fácil comprensión por el paciente.

ANEXO 2

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Versión de la HIP: v1.	Fecha de la versión: 28-12-15
Investigador Principal: TERESA BAS HERMIDA	
CENTRO: HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE	
Título del proyecto de investigación: REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA ESCLEROSTINA Y DE LA RUTA WNT/B-CATENINA EN OSTEOPOROSIS. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES BASADOS EN LA METILACIÓN DEL ADN Y LOS microARNs DE FRAGILIDAD ÓSEA	

1. INTRODUCCIÓN:

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico la Fe.

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportunas.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA:

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

La osteoporosis es un trastorno esquelético caracterizado por una alteración de la resistencia ósea que predispone a un mayor riesgo de fracturas.

El gold estándar actual para el diagnóstico de la osteoporosis es la densitometría ósea, pero esta técnica sólo explica alrededor de un 60 % de las fracturas en los pacientes afectados por esta patología, por lo que resulta de gran interés el descubrimiento de marcadores de fragilidad ósea. En algunos trabajos se describe la mayor frecuencia de osteoporosis en la escoliosis degenerativa del adulto, que en la escoliosis idiopática del adulto o en la población general.

La esclerostina, la cual se expresa en los osteocitos, constituye un potente inhibidor de la formación ósea. Esta glicoproteína impide la función de los osteoblastos y su función, inhibiendo la vía de la Wnt/beta- catenina, y por tanto la formación ósea, además de inducir la apoptosis de los osteoblastos. Recientemente se ha descrito la regulación epigenética, concretamente por fenómenos de metilación del gen SOST. Este año el grupo de Reppe, ha demostrado que los niveles de esclerostina en suero correlacionan fuertemente con el riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas, y además correlacionan con los niveles de metilación del promotor del gen.

Es conocida la relación entre escoliosis degenerativa y osteoporosis, y se ha visto que la densitometría lumbar en estos pacientes carece de exactitud para el diagnóstico de esta patología. Por lo que se requieren nuevas técnicas de diagnóstico y monitorización y nuevos biomarcadores.

En esta búsqueda de biomarcadores, la epigenética está revolucionando la biomedicina y la medicina personalizada y de precisión, pues estos biomarcadores basados en la metilación del ADN, los ARNs no codificantes (i.e., microARNs) y modificaciones en las histonas permiten hacer diagnóstico, pronóstico e incluso monitorizar el efecto de las terapias aplicadas.

Nuestro estudio pretende establecer una relación entre los niveles de esclerostina en suero, la metilación del gen y la fragilidad ósea. Además completaremos este estudio con el análisis de la expresión de una firma de tres microARNs implicados en la regulación de la ruta Wnt/b-catenina. Para completar el estudio e identificar otras firmas

epigenéticas asociadas a la fragilidad ósea realizaremos un estudio de secuenciación de miRNAs circulantes en pacientes con fragilidad ósea (con fractura osteoporótica), pacientes con escoliosis degenerativa del adulto, y pacientes control (pacientes sometidos a intervención quirúrgica por procedimientos ortopédicos) mediante tecnología Next Generation Sequencing.

Este estudio por lo tanto no implica cambios en la medicación de ninguno de los pacientes, ni una alteración en la organización o programación de sus visitas. Durante su estancia hospitalaria se realizará una extracción de muestra sanguínea, así como una densitometría, y durante el tratamiento quirúrgico de su patología obtendremos una muestra de tejido óseo para su análisis. Estos procedimientos no afectarán el desarrollo de su tratamiento.

4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO:

Si se cumplen los objetivos de este proyecto se encontrarán como beneficios:

- a) Protocolos más efectivos basados en la detección precisa y el perfil de riesgo del paciente de fractura;
- b) Profundización en el conocimiento del desarrollo de osteoporosis mediante la correlación y el análisis de parámetros cuantificables obtenidos de muestras de sangre (método semi-invasivo);
- c) Diagnóstico precoz, personalización y monitorización del tratamiento frente a la osteoporosis;
- d) Mejor caracterización y conocimiento de una patología de gran prevalencia entre los pacientes con osteoporosis como es la escoliosis degenerativa del adulto.

También, ha de saber que los objetivos del proyecto de investigación podrían no cumplirse no llegando a conseguir ningún beneficio directamente relacionado con la enfermedad.

Ha de saber que este tipo de estudio no lleva ningún riesgo asociado. El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud.

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

La toma de muestra de tejido óseo durante la cirugía no alterará la evolución esperada de su procedimiento.

Cualquier otra información que desee, no dude en preguntársela a los médicos especialistas y/o al personal de enfermería que le atiende.

La donación implica, la renuncia por parte de los donantes a cualquier derecho de naturaleza económica o de otro tipo sobre los resultados que pudieran derivarse de manera directa o indirecta de

las investigaciones que se lleven a cabo con las muestras biológicas.

Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales pero los costes de conservación y envío se cubrirán sobre una base sin ánimo de lucro.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS:

El presente proyecto de investigación no pretende evaluar el efecto de ningún tratamiento, sino identificar biomarcadores de progresión y predictivos de la osteoporosis.

Es por ello, por lo que no será sometido a ningún tratamiento experimental.

6. Nº DE URGENCIA PARA PROBLEMAS DEL ESTUDIO

En caso de que desee formular preguntas acerca del estudio o daños relacionados con el mismo, contactar con el médico del estudio Dr. TERESA BAS HERMIDA en el número de teléfono 699921091.

7. CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes, se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13

de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y sólo su médico del estudio o colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Respecto a la confidencialidad de la información del paciente, el responsable del Registro de los datos en la Agencia Española de Protección de Datos, es la Consellería de Sanitat de la Generalitat Valenciana.

Sólo se tramitarán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc... En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio, colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente. El acceso a su historia clínica ha de ser sólo en lo relativo al estudio.

8. COMPENSACIÓN ECONÓMICA:

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo, por lo que su participación en éste no le supondrá ningún gasto.

9. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE:

Cualquier nueva información referente a los fármacos utilizados en el estudio que se descubra durante su participación y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, le será comunicada por su médico lo antes posible. Sin embargo, la

naturaleza de este estudio no prevé la modificación de ninguno de los tratamientos que esté usted tomando en este momento.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, no se añadirá ningún dato nuevo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente obtenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del mismo lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la mediación en estudio o porque consideren que usted no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo por el que se ha decidido su retirada del estudio.

El promotor podrá suspender el estudio siempre y cuando sea por alguno de los supuestos contemplados en la legislación vigente.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado para su enfermedad, pero es posible que no se le pueda seguir administrando la medicación objeto del presente estudio. Por lo tanto, ni el investigador, ni el promotor, adquieren compromiso alguno de mantener dicho tratamiento fuera de este estudio.

12. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS SU UTILIZACIÓN EN ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Cuando termine este proyecto de investigación, es posible que sobren muestras. Para estas muestras te ofrecemos dos opciones:

- a. Que sean destruidas
- b. Que sean utilizadas en otros proyectos que tengan relación con Escoliosis Idiopática del Adolescente. Por eso, te ofrecemos la posibilidad de que dones la muestra que sobre al Biobanco La Fe para que pueda ser conservada y utilizada en el futuro.

En este caso, firmarás también la hoja del consentimiento específico para Biobancos y tus muestras podrán ser utilizadas en proyectos de investigación que estén autorizados por un Comité de Ética y por un Comité Científico.

Tus datos personales y de salud serán tratados con confidencialidad de acuerdo a la Ley.

Podrás solicitar en cualquier momento la modificación o la cancelación de tus datos mediante un correo electrónico dirigido al Biobanco La Fe (biobanco_lafe@iislafe.es) Siempre que tú estés de acuerdo, las muestras seguirán almacenadas en el Biobanco La Fe hasta que se agoten.

En el caso de que se cerrase el Biobanco La Fe la información sobre el destino de tus muestras estará a tu disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica para que puedas decir si estás de acuerdo o no con el fin previsto para las mismas.

ANEXO 3

MODELO DE CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE LEGAL

Título del estudio: REGULACIÓN EPIGENETICA DE LA ESCLEROSTINA Y DE LA RUTA WNT/B-CATENINA EN OSTEOPOROSIS. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES BASADOS EN LA METILACIÓN DEL ADN Y LOS microARNs DE FRAGILIDAD ÓSEA

Yo, *(nombre y apellidos)*

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: *(nombre del Investigador)*

Comprendo que la participación de *(nombre del participante)* es voluntaria.

Comprendo que *(nombre del participante)* puede retirarse del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a *(nombre del participante)*, toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que *(nombre del participante)* participe en el estudio.

Firma del Representante

Firma del Investigador

Nombre:

Fecha:

Nombre:

Fecha:

MODELO DE CONSENTIMIENTO POR ESCRITO

Título del estudio: REGULACIÓN EPIGENETICA DE LA ESCLEROSTINA Y DE LA RUTA WNT/B-CATENINA EN OSTEOPOROSIS. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES BASADOS EN LA METILACIÓN DEL ADN Y LOS microARNs DE FRAGILIDAD ÓSEA

Yo, _____ (nombre y apellidos).

He leído la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: _____ (nombre del Investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1º Cuando quiera
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Una vez que termine la investigación:

Quiero que se destruya la muestra sobrante .

Quiero que la muestra sobrante se guarde en el Biobanco La Fe ☐ *

No _____ quiero _____ que _____ mis _____ muestras _____ se _____ utilicen
para:.....

Fecha

Firma representante legal (si procede).....

Nombre representante legal:

Relación con el paciente:

Firma del Participante

Firma del Investigador

Nombre:

Fecha:

Nombre:

Fecha:

MODELO DE CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

Título del estudio: *REGULACIÓN EPIGENETICA DE LA ESCLEROSTINA Y DE LA RUTA WNT/B-CATENINA EN OSTEOPOROSIS. IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES BASADOS EN LA METILACIÓN DEL ADN Y LOS microARNs DE FRAGILIDAD ÓSEA*

Yo, _____ (*nombre y apellidos*),

He recibido la hoja de información sobre el estudio.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He sido informado por: _____ (*nombre del investigador*)

Declaro bajo mi responsabilidad que: _____ (*nombre del participante del estudio*)

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Y ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio.

Firma del testigo

Firma del Investigador

Nombre:

Fecha:

Nombre:

Fecha:

ANEXO 4

COLECCIÓN UNIDAD DE RAQUIS (CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA) *Página 1 de 1*

SUBCOLECCIÓN: OSTEOPOROSIS POSTMENOPÁUSICA (CIE-10: M80.0)	
ETIQUETA PACIENTE	*NOMBRE: *NHC: *SIP: *FECHA NACIMIENTO:
TIPO DE MUESTRA QUE SE ENVÍA	*SANGRE (EDTA) ☐ N° tubos..... Fecha y hora extracción:..... *SANGRE (CPT) ☐ N° tubos..... Fecha y hora extracción:..... *TEJIDO ÓSEO ☐ N° muestras..... Fecha y hora extracción:.....
PRETRATAMIENTOS Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN POR EL GRUPO <i>(en caso de ser necesario y previo envío al Biobanco)</i>	Condiciones: refrigerada ☐ congelada ☐ Tª ambiente ☐ Fecha..... Hora..... ¿Durante cuánto tiempo ha estado refrigerada/congelada/Tª ambiente?horas
CONSENTIMIENTO BIOBANCO ADJUNTO: ☐ SÍ ☐ NO <i>(Nota: el CI deberá enviarse previo uso de las muestras)</i>	
DIAGNÓSTICO / SOSPECHA DIAGNÓSTICA	*Osteoporosis postmenopáusica con fractura patológica (CIE-10: M80.0) ☐ *Control osteoporosis postmenopáusica (CIE-10: Z76.3) ☐ *Otros ☐ CIE-10: Descripción:.....
OBSERVACIONES/INCIDENCIAS	<i>Nota: referencia tubos CPT (BD Vacutainer®, 362782)</i> TELÉFONO CONTACTO RBLE. ENVÍO: Dra. De la Calva (661260744)

DATOS RECEPCIÓN (A completar por el personal del Biobanco La Fe)	
FECHA RECEPCIÓN MUESTRA	HORA RECEPCIÓN MUESTRA
OBSERVACIONES	
TELÉFONOS ENVÍO MUESTRAS	Laboratorio Biobanco: 246680 – 246679 – 485643

BIOBANCO LA FE - Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS-LA FE) – TORRE A – SÓTANO
 Avda. de Fernando Abril Martorell, 106. C.P.: 46026. Valencia (España). - Tífs.: 96 1246681 - 626.49.40.32
 (Exts.: 246681 / 485606) - biobanco_lafe@iislafe.es - <http://www.iislafe.es/biobanco-la-fe.aspx>



ANEXO 5



CI_VOLUNT: DONACIÓN VOLUNTARIA PARA INVESTIGACIÓN - V1(08/07/2016)

Página 1 de 7

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA INVESTIGACIÓN AL BIOBANCO LA FE

1.- DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

El procedimiento que se propone consiste en **donar voluntariamente** muestra/s biológica/s de sangre, tejidos, heces, orina, fluidos biológicos u otros tipos siguiendo los procedimientos de obtención establecidos en el centro asistencial. Si la obtención de un tipo de muestra llevara asociado un procedimiento invasivo, el donante o su representado/a debería igualmente consentir el citado procedimiento a través del documento proporcionado por el centro.

La/s muestra/s biológica/s serán gestionadas y conservadas en el **BioBANCO La Fe**, como **biobanco público autorizado para la gestión de muestras** biológicas con fines de investigación biomédica según la legislación vigente. Dichas muestras biológicas podrán ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica los cuales hayan sido previamente aprobados por comités externos, de ética y científico, a los que está adscrito el Biobanco. Las muestras estarán gestionadas por el Biobanco La Fe hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

2.- OBJETIVO

La finalidad del Biobanco La Fe es gestionar la recogida, el procesamiento y la **conservación de muestras biológicas humanas para su uso posterior en proyectos de investigación biomédica o para completar pruebas diagnósticas.** Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades y/o disfunciones.

3.- CONDICIONES DE LA DONACIÓN

Ni ud. ni su representado/a recibirán **ninguna compensación económica** ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones realizadas tuvieran éxito podrían ayudar en el futuro a pacientes con enfermedades o disfunciones. Sus muestras o las de su representado/a **no serán vendidas ni distribuidas** a terceros con fines comerciales, pero los costes de obtención, conservación y envío del material se repercutirán, sin ánimo de lucro, a quienes las utilicen según lo establecido en la legislación vigente.

La donación de muestras no impedirá que ud., su representado/a o su familia **puedan hacer uso de ellas**, siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran y cuyo uso final esté justificado de manera clínica o terapéutica. Debe saber que el uso diagnóstico de la muestra donada tendrá prioridad y que el Biobanco La Fe garantizará la existencia de remanente de muestras para este fin.

En caso de producirse un eventual cierre del Biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, **la información sobre el destino de las muestras** para investigación biomédica **estará disponible** en el Registro Nacional de Biobancos o en el registro de la autoridad pública que ostente la competencia en ese momento para que pueda **manifestar su conformidad o disconformidad** en relación al destino previsto de las mismas.

4.- CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN

Podría darse la circunstancia de **ser de nuevo contactado/a** con el fin de recabar nueva información sobre su situación o la de su representado/a o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica. En este caso **volverá a ser informado/a y tendrá la libertad de aceptar o de rechazar** dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del Hospital Universitari i Politècnic La Fe o del centro del cual procede los futuros **cambios de dirección y teléfonos de contacto**, siendo ésta la única vía de contacto con ud., su representado/a o su familia.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud o a la de su representado/a derivada del desarrollo de los proyectos de investigación biomédica y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, **puede solicitar la información relativa a su salud o a la de su representado/a derivada del estudio** de las muestras donadas. Para ejercer este derecho, puede dirigirse a la Dirección Científica del Biobanco La Fe realizando la solicitud pertinente a través de escrito dirigido.

La información que se obtenga puede ser **relevante** también **para sus familiares**. Es decisión suya y/o de su representado/a informarles a fin de, si ellos/as lo desean, puedan ser estudiados/as y valorar así sus opciones de salud futuras. Cuando esta información, a criterio médico, sea necesaria para evitar un grave perjuicio en la salud de sus familiares biológicos, previa consulta al comité de ética asistencial, serán informados/as de ello.

5.- DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

La decisión de donar sus muestras es totalmente **voluntaria**. Ud. o su representado/a pueden negarse a donarlas e incluso **puede revocar su consentimiento en cualquier momento**, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el centro.

Si se revoca el consentimiento que ahora se presta, le pediremos la **opción de destruir las muestras o guardarlas sin identidad**. Esta acción tendrá efecto solo en la parte de las muestras donadas al Biobanco La Fe. No se destruirán las muestras o la información clínica necesarias para el tratamiento y solución de su enfermedad y/o disfunción.

6.- RIESGOS

El procedimiento propuesto **no supone ningún riesgo añadido** para su salud. En el caso de donaciones de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

7.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD

En cumplimiento de la **Ley Orgánica 15/1999, LOPD**, le informamos que:

Sus datos de carácter personal se recogen en los ficheros “*Información clínico-asistencial*”, “*Organización y gestión de la actividad sanitaria*”, “*Prescripción y dispensación farmacéutica*”, “*Epidemiología*”, “*Investigación clínica sanitaria y farmacológica*” y que estos ficheros han sido **publicados y registrados en la Agencia Española de Protección de Datos**, siendo el responsable de éstos la Conselleria de Sanidad Universal y Salud Pública.

La finalidad de la captación y tratamiento de sus datos es la asistencia sanitaria, la prescripción y dispensación farmacéutica, la gestión y control de los procesos asistenciales y sanitarios, la investigación epidemiológica, la **dotación de Biobancos** y los proyectos de investigación clínica sanitaria o farmacológica.

Para el ejercicio de sus **derechos de Acceso, Rectificación, Cancelación y Oposición** (ARCO) se puede dirigir a las **Oficinas de Atención e Información al Paciente de este Hospital** (SAIP), a los registros de entrada de la Conselleria de Sanidad Universal y Salud Pública, así como a los servicios territoriales de la misma.

En caso de cesión a terceros de muestras y/o de información derivada del estudio, se eliminará cualquier dato que pueda revelar su identidad personal.

Este Hospital trata de manera **absolutamente confidencial** sus datos de carácter personal y sólo para las finalidades indicadas y le informa que implementa las medidas de seguridad necesarias para garantizar la seguridad y confidencialidad de sus datos.

EJEMPLAR PARA EL DONANTE

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO – HOJA DE FIRMAS

D./D^a.....de..... años de edad, con nº DNI
..... y nº SIP.....

D./D^a.....de..... años de edad, con nº DNI
..... y nº SIP....., en calidad de representante (en caso de incapacidad)

DECLARO QUE:

- He leído la información que se me ha entregado.
- He sido informado por el profesional de salud abajo firmante sobre la donación de muestras al Biobanco La Fe.
- He comprendido las explicaciones facilitadas habiendo sido éstas proporcionadas en un lenguaje claro y sencillo.
- He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas planteadas.
- He comprendido que la donación de muestras es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
- Libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de las muestras biológicas obtenidas en el trascurso del procedimiento quirúrgico, diagnóstico o terapéutico.
- Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:
.....
.....

CONSIENTO QUE:

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información y de acuerdo a la legislación vigente.

DONANTE

PROFESIONAL DE SALUD

Fdo.: D./D^a.....

Fdo.: D./D^a

Nº colegiado.....

En..... a de de 20.....

EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO LA FE**DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO – HOJA DE FIRMAS**

D./D^a.....de..... años de edad, con nº DNI
..... y nº SIP.....

D./D^a.....de..... años de edad, con nº DNI
..... y nº SIP....., en calidad de representante (en caso de incapacidad)

DECLARO QUE:

- He leído la información que se me ha entregado.
- He sido informado por el profesional de salud abajo firmante sobre la donación de muestras al Biobanco La Fe.
- He comprendido las explicaciones facilitadas habiendo sido éstas proporcionadas en un lenguaje claro y sencillo.
- He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas planteadas.
- He comprendido que la donación de muestras es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
- Libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de las muestras biológicas obtenidas en el trascurso del procedimiento quirúrgico, diagnóstico o terapéutico.
- Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:
.....
.....

CONSIENTO QUE:

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información y de acuerdo a la legislación vigente.

DONANTE**PROFESIONAL DE SALUD**Fdo.: D./D^a.....Fdo.: D./D^a

Nº colegiado.....

En..... a de de 20.....

EJEMPLAR PARA EL CENTRO

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO – HOJA DE FIRMAS

D./D^a.....de..... años de edad, con nº DNI
..... y nº SIP.....

D./D^a.....de..... años de edad, con nº DNI
..... y nº SIP....., en calidad de representante (en
caso de incapacidad)

DECLARO QUE:

- He leído la información que se me ha entregado.
- He sido informado por el profesional de salud abajo firmante sobre la donación de muestras al Biobanco La Fe.
- He comprendido las explicaciones facilitadas habiendo sido éstas proporcionadas en un lenguaje claro y sencillo.
- He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas planteadas.
- He comprendido que la donación de muestras es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.
- Libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de las muestras biológicas obtenidas en el transcurso del procedimiento quirúrgico, diagnóstico o terapéutico.
- Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:
.....
.....

CONSIENTO QUE:

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información y de acuerdo a la legislación vigente.

DONANTE

PROFESIONAL DE SALUD

Fdo.: D./D^a.....

Fdo.: D./D^a

Nº colegiado.....

En..... a de de 20.....

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Revoco el consentimiento prestado en fecha.....de..... de 20.... y no deseo proseguir la donación voluntaria que doy con esta fecha por finalizada.

DONANTE**PROFESIONAL DE SALUD**Fdo.: D./D^a.....Fdo.: D./D^a

Nº colegiado.....

En..... a dede 20.....



