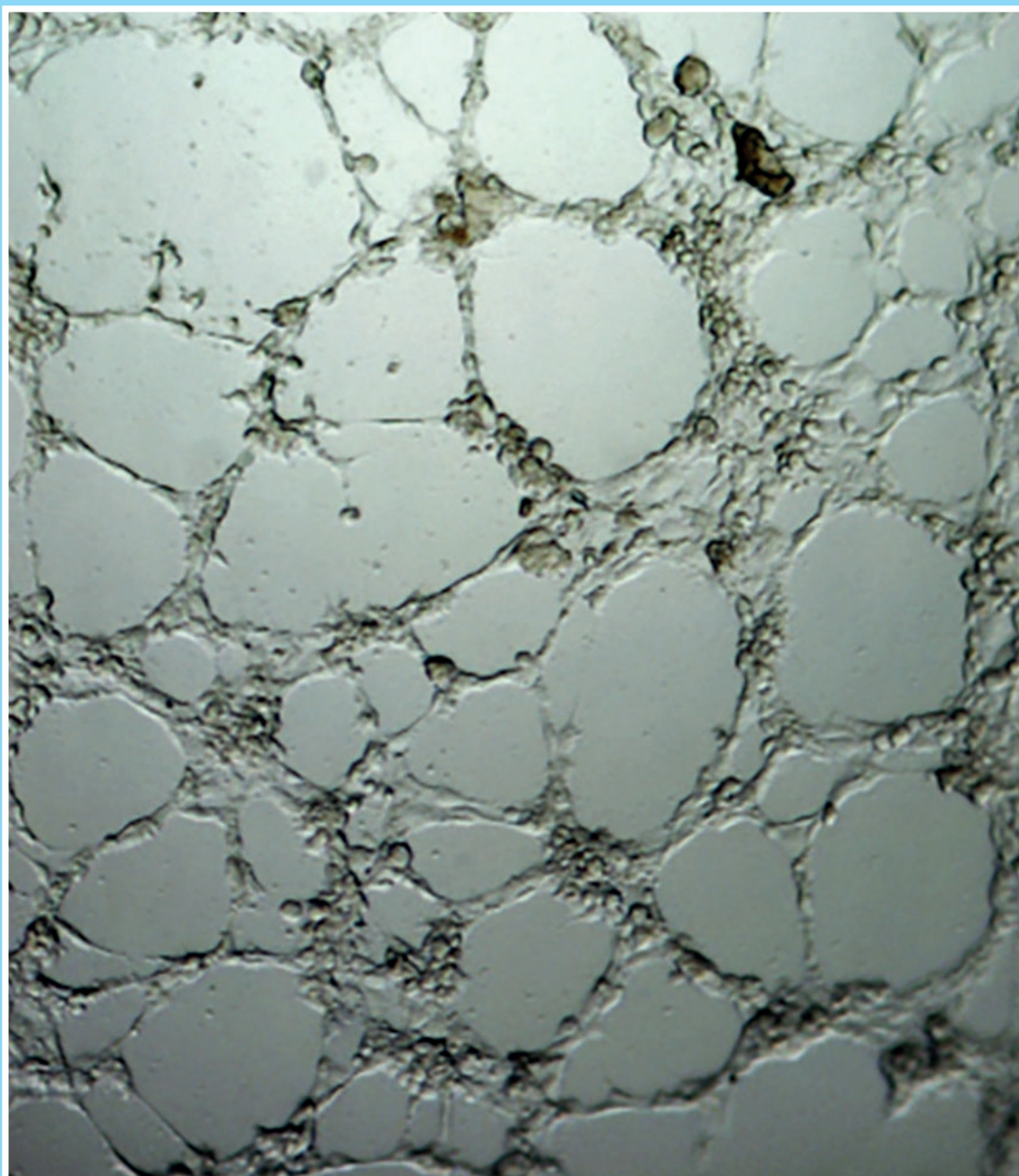




Revista de Osteoporosis
y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com





Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

© Copyright 2025. SEIOMM y © ARÁN EDICIONES, S.L.

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenaje de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright.

La editorial declina toda responsabilidad sobre el contenido de los artículos que aparezcan en esta publicación.
Publicación trimestral con 4 números al año

Esta publicación se encuentra incluida en Scopus, Web of Science, Scielo, DOAJ, ERIHPLUS, Redalyc, IBECs, Embase, Open J-Gate, Free Medical Journals, Sociedad Americana de Investigación Científica (SIIC), Google Academic, Medes, ÄZ3, e-revist@s, WorldCat, Latindex, EBSCO, Medic Latina, Dialnet, Safetylit, Mosby's, Emdcare, Academic Keys, CRUE, Hinari, REDIB, Emerging Sources Citation Index, British Library y ROAD.
Factor de impacto (JCR 2023): 0,8 / Q4

La *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* es una revista *open access*, lo que quiere decir que todo su contenido es accesible libremente sin cargo para el usuario individual y sin fines comerciales. Los usuarios individuales están autorizados a leer, descargar, copiar, distribuir, imprimir, buscar o enlazar a los textos completos de los artículos de esta revista sin permiso previo del editor o del autor, de acuerdo con la definición BOAI (Budapest Open Access Initiative) de *open access*.

Esta revista se publica bajo licencia CC BY-NC-SA (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).



La reutilización de los trabajos puede hacerse siempre y cuando el trabajo no se altere en su integridad y sus autores sean adecuadamente referenciados o citados en sucesivos usos, y sin derecho a la producción de obras derivadas.

ISSN (versión papel): 1889-836X. ISSN: (versión electrónica): 2173-2345
Depósito Legal: M-8158-2023

ARÁN EDICIONES, S.L.

C/ Orense, 11, 4.º - 28020 Madrid - Tel. 91 782 00 30 - Fax: 91 561 57 87
e-mail: osteoporosis@grupoaran.com
www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com
www.grupoaran.com



Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Órgano Oficial de Expresión Científica de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)
y de la Sociedad Iberoamericana de Osteología y Metabolismo Mineral (SIBOMM)

DIRECTORAS

**Dra. Arancha Rodríguez de Gortázar
(Co-directora)**

Departamento de Ciencias Médicas Básicas. Instituto de Medicina Molecular Aplicada (IMMA). Facultad de Medicina. Universidad San Pablo CEU. Madrid (España)

Correo electrónico: argortazar@ceu.es

**Dra. Marta Martín Millán
(Co-directora)**

Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Cantabria. Santander (España)

Correo electrónico: marta.martinm@scsalud.es

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Rosa María Arboiro Pinel

Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz. Madrid (España)

Correo electrónico: rosaarborio@gmail.com

Dra. Teresita Bellido

Directora del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas. Departamento de Medicina. División de Endocrinología y Metabolismo y Departamento de Ortopedia.

Investigadora en el Sistema de Atención Médica de Veteranos de Arkansas Central-John L. McClellan Memorial Hospital. Little Rock, Arkansas (Estados Unidos)

Correo electrónico: tmbellido@uams.edu

Dr. Enrique Casado Burgos

Servicio de Reumatología. Unidad de Metabolismo Óseo. Parc Taulí Hospital Universitari. Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT-CERCA). Universitat Autònoma de Barcelona. Sabadell, Barcelona (España)

Correo electrónico: ecasado@tauli.cat

Dr. Jesús Delgado Calle

Department of Physiology and Cell Biology. University of Arkansas for Medical Sciences. Little Rock, Arkansas (EE. UU.)

Correo electrónico: JDelgadocalle@uams.edu

Dr. Manuel Díaz Curiel

Ex-Director de la Cátedra de Enfermedades Metabólicas Óseas. Universidad Autónoma Madrid. Consultor de Enfermedades Metabólicas Óseas. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. Presidente Honorífico de la Fundación

Hispana de Osteoporosis y Enfermedades Metabólicas Óseas (FHOEMO) (España)

Correo electrónico: mdcuriel@fjd.es

Dr. Adolfo Díez Pérez

Instituto Hospital del Mar de Investigación Médica (IMIM) y Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario del Mar. Universidad Autónoma de Barcelona.

CIBER en Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Instituto Carlos III. Barcelona (España)

Correo electrónico: Adiez@parcdesalutmar.cat

Dr. Luis Fernández de Castro

Skeletal Disorders and Mineral Homeostasis Section. National Institutes of Dental and Craniofacial Research. Bethesda, Maryland (EE. UU.)

Correo electrónico: luis.fernandezdecastro@nih.gov

Dra. Laia Gigre Sala

Servicio de Reumatología. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona (España)

Correo electrónico: lgigre.germanstrias@gencat.cat

Dra. María Jesús Gómez de Tejada Romero

Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla. Sevilla (España). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: mjgtr@us.es

Dr. Oswaldo Daniel Messina

Jefe de Reumatología. Hospital Argerich de Buenos Aires (Argentina). Profesor Asociado de Reumatología y Director de la carrera de postgrado en Reumatología.

Universidad de Buenos Aires (Argentina). Director Médico de Investigaciones Reumatológicas y Osteológicas de Buenos Aires (IRO SRL) (Argentina). Miembro del Board y del Comité. de Asesores Científicos de la International Osteoporosis Foundation (IOF)

Correo electrónico: drosvaldodanielmessina@gmail.com

Dr. Manuel Naves Díaz

Unidad de Gestión Clínica de Metabolismo óseo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA). REDinREN del ISCIII. Universidad de Oviedo. Oviedo (España)

Correo electrónico: mnaves.huca@gmail.com

Dra. Lilian I. Plotkin

Departamento de Anatomía y Biología Celular y Centro de Indiana para la Salud Musculoesquelética. Facultad de Medicina. Universidad de Indiana. Indianápolis, Indiana (Estados Unidos)

Correo electrónico: lplotkin@iupui.edu

Dr. José Antonio Riancho Moral

Departamento de Medicina y Psiquiatría. Universidad de Cantabria. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL). Santander (España)

Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Dr. Manuel Sosa Henríquez

Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS). Grupo de Investigación en Osteoporosis y Metabolismo Mineral. Unidad Metabólica ósea. Hospital Universitario Insular. Las Palmas de Gran Canaria (España)

Correo electrónico: manuel.sosa@ulpgc.es



Revista de Osteoporosis
y Metabolismo Mineral



**JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA
DE INVESTIGACIÓN ÓSEA Y DEL METABOLISMO MINERAL**

Presidente

Guillermo Martínez Díaz-Guerra

Vicepresidente

Mercedes Giner García

Secretaría

Marta Martín Millán

Tesorero

Manel Ciria Recasens

Vocales

Enric Duaso Magaña
María Pilar Aguado Acín

Sumario

Vol. 17 ■ Enero-Marzo ■ N.º 1

Originales

Musculoskeletal disorders and bisphosphonates: a disproportionality analysis within the Spanish pharmacovigilance database
M. T. Yuste, E. Escudero, P. Marín 1

Identification *in silico* of miRNAs and their targets involved in the development of osteoarthritis
S. R. Carrillo-Patiño, F. C. Román-Carraro, J. F. Montes-García, M. A. Ballinas-Verdugo, J. E. Justo-Frausto, E. López-Espinosa, R. F. Jiménez-Ortega 8

Las vesículas extracelulares circulantes modifican la diferenciación de células estromales mesenquimales y angiogénesis. Potencial uso en regeneración ósea
S. Oliva-Lozano, V. Pulido-Escribano, B. Torrecillas-Baena, A. Calañas-Continente, F. Priego-Capote, M. Camacho-Cardenosa, A. Casado-Díaz 19

Revisión

Biogénesis de RNA circulares, funciones biológicas y su papel en el desarrollo de la osteoartritis
S. R. Carrillo-Patiño, F. C. Román-Carraro, B. A. López-Ruiz, J. F. Montes-García, M. A. Ballinas-Verdugo, E. López-Espinosa, R. F. Jiménez-Ortega 31

Artículo Especial

Consenso Delphi sobre el manejo de pacientes con osteoporosis en atención primaria
C. Carbonell-Abella, R. M. Micó-Pérez, F. Vargas Negrín, J. C. Bastida-Calvo, P. Aguado Acín 42

Imagen de portada:

Estudio de angiogénesis en cultivos de células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) sobre matrigel.

Oliva-Lozano S, Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Calañas-Continente A, Priego-Capote F, Camacho-Cardenosa M, Casado-Díaz A. Las vesículas extracelulares circulantes modifican la diferenciación de células estromales mesenquimales y angiogénesis. Potencial uso en regeneración ósea. Rev Osteoporos Metab Miner 2025;17(1):19-30.

Original

Musculoskeletal disorders and bisphosphonates: a disproportionality analysis within the Spanish pharmacovigilance database

M.^a Teresa Yuste, Elisa Escudero, Pedro Marín

Department of Pharmacology. Universidad de Murcia. Murcia, Spain

Abstract

Background: several musculoskeletal adverse effects associated with the use of bisphosphonates have been identified, although their frequency, severity and risk factors are still unknown. The aim of our study is to determine the possible causal relationship between the most widely used bisphosphonates in Spain and the occurrence of musculoskeletal adverse events.

Material and methods: we conducted a retrospective, observational, analytical, case/non-case study using the database of the Spanish Pharmacovigilance System. The bisphosphonates selected were alendronic acid, ibandronic acid and risedronic acid. The adverse reactions studied according to MedDRA terminology were SOC musculoskeletal and connective tissue disorders and PTs myalgia, arthralgia, bone pain, paresthesia, musculoskeletal pain, musculoskeletal stiffness, arthritis, muscle weakness and pain in an extremity.

Results: the ROR values obtained for the SOC were > 1 for all 3 drugs studied. These reactions occur mostly in those over 65 years of age, women and that most of them are classified as serious. For the 9 PTs studied (myalgia, arthralgia, bone pain, paresthesia, musculoskeletal pain, musculoskeletal stiffness, arthritis, muscle weakness and pain in a limb), ROR values > 1 were found for all three drugs, except for the PT paresthesia and PT pain in a limb.

Conclusion: musculoskeletal adverse reactions not listed in the official information have been detected. The information provided by this work could recommend for a re-evaluation and update of the benefit-risk ratio of these drugs.

Keywords:

Alendronic acid.
Bisphosphonates.
Ibandronic acid.
Musculoskeletal
adverse effects.
Pharmacovigilance.
Risedronic acid.

Received: 02/07/2024 • Accepted: 07/01/2025

Disclaimer: FEDRA is the Spanish Pharmacovigilance System of Human Medicines (SEFV-H) database and is managed by the Spanish Medicines and Health Products Agency (AEMPS). The information is derived from various sources, and the likelihood of a suspected adverse effect being related to a drug may vary. The authors' findings, discussion and conclusions are their own and do not reflect the position of the Spanish Pharmacovigilance System or AEMPS.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Artificial intelligence: the authors declare not to have used artificial intelligence (AI) or any AI-assisted technologies in the elaboration of the article.

Yuste MT, Escudero E, Marín P. Musculoskeletal disorders and bisphosphonates: a disproportionality analysis within the Spanish pharmacovigilance database. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2025;17(1):1-7

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00050

Correspondence:

Pedro Marín. Department of Pharmacology.
Universidad de Murcia. Campus de Espinardo.
30100 Murcia, Spain
e-mail: pmarin@um.es

INTRODUCTION

Osteoporosis is a bone disorder that increases a person's risk of fracture due to low bone mineral density, impaired bone microarchitecture/mineralization and/or decreased bone strength. It is a silent disease that progresses without symptoms until it shows as a fracture of the hip, spine, proximal humerus, pelvis and/or wrist, which may lead to hospitalization (1). This disease can be caused by several reasons; the main cause is due to hormone depletion, oestrogen depletion in postmenopausal women and androgen depletion in older men. In particular, due to the imbalance in bone remodelling after menopause, osteoclastic activity predominates over osteoblastic activity (2).

The main objective of a pharmacological therapy, in this case, is to reduce the risk of fracture. Drugs to treat osteoporosis are categorized as either antiresorptive (i.e., bisphosphonates, estrogen agonist/antagonists, estrogens, calcitonin, and denosumab) or anabolic (i.e., teriparatide). Antiresorptive drugs primarily decrease the rate of bone resorption while anabolic drugs increase bone formation more than bone resorption does. Bisphosphonates are anti-osteoclastic agents that suppress osteoclastic formation and help to increase or maintain bone mineral density in the long term (1,3). These drugs can be categorized into 2 groups with different molecular modes of action:

1. *Bisphosphonates that do not contain a nitrogen atom in their structure (non-nitrogenous)*: these are the simplest and include etidronate and clodronate, among others. They can be metabolically incorporated into non-hydrolysable ATP analogues, which interfere with intracellular ATP-dependent pathways.
2. *Bisphosphonates that contain a nitrogen atom in their structure (nitrogenous)*: these are the most potent drugs and include pamidronate, alendronate, risedronate, ibandronate and zoledronate. Although they are not metabolized in the same way as the non-nitrogen bisphosphonates, they inhibit key enzymes of the mevalonate/cholesterol biosynthetic pathway (4). In osteoclasts they inhibit the enzyme farnesyl pyrophosphate synthase (FDPS) a key branch point enzyme in the mevalonate pathway. As a consequence of osteoclast activity inhibition, recruitment and apoptosis, suppression of bone turnover occurs (5).

Oral bisphosphonates such as alendronate, ibandronate or risedronate have been widely used in the treatment and prevention of osteoporosis for 3 decades. Among oral bisphosphonates, alendronate and risedronate have been demonstrated to reduce the rate of hip fractures by approximately 40 %, and all non-vertebral fractures by 20-30 % (6). Initially, bisphosphonates were administered daily. However, nowadays, dosing regimens are weekly in the case of

alendronate and risedronate, or monthly for ibandronate, and more recently for risedronate (7).

The variety of indications and the prolonged duration of most bisphosphonate oral treatments have favored the appearance of different adverse reactions. Among the most common ones are those related to the upper digestive tract: nausea, vomiting, erosions, gastric ulcers, oesophagitis, etc. All bisphosphonates are reported to be associated with a complication denominated osteonecrosis of the jaw, defined as the presence of exposed and necrotic bone in the maxillofacial region that does not heal in 8 or more weeks (8). Moreover, bone, joint and muscle pain may be secondary to bisphosphonates therapy. These last adverse reactions have been described as generally infrequent and mild, although severe pain has been reported (9). The onset of musculoskeletal pain may occur years after treatment initiation and does not always resolve with treatment discontinuation (10). A link between bisphosphonate intake and the development of synovitis, including carpal tunnel syndrome, has also been demonstrated (11).

The aims of our study were: a) to study the possible causal association between taking oral bisphosphonates (alendronic acid, ibandronic acid and risedronic acid) and the development of musculoskeletal adverse reactions; b) to determine the reporting frequencies for the variables age, sex and serious of these reactions; c) to identify the different musculoskeletal reactions associated with each bisphosphonate and their reported risks; and d) to analyze the available official information on these musculoskeletal reactions to bisphosphonates and to compare it with the results obtained in our own study.

MATERIALS AND METHODS

DATA MINING

Data required for our study were obtained from the Spanish Pharmacovigilance System's adverse reaction database, FEDRA. FEDRA contains spontaneous reports of adverse reactions made by health care professionals, the pharmaceutical industry and general population from the start of the programme in 1983 to this day. Adverse reactions are subsequently coded in FEDRA according to the terminology of the Medical Dictionary for Regulatory Activities, MedDRA. Through this tool, preferred terms describing the reactions of interest can be identified for searching. This can be done by system organ class (SOC), high level group term (HLGT), high level term (HLT) and preferred term (PT) (12).

FEDRA searches were conducted for the 3 selected bisphosphonates: alendronic acid, ibandronic acid and

risedronic acid. A general search was first performed to identify spontaneous reports with the SOC musculoskeletal and connective tissue disorders, and after more specific searches were conducted with the following selected PTs: myalgia, arthralgia, bone pain, paresthesia, musculoskeletal pain, musculoskeletal stiffness, arthritis, muscle weakness and limb pain. The study of bone necrosis of the jaw has not been addressed in this study nor the occurrence of atypical fractures.

DATA STATISTICAL ANALYSIS

To achieve the proposed endpoints, we conducted an analytical, retrospective, observational using the case/non-case study approach, which is based on the logic of case-control studies (13). The study selects patients with the disease (cases) and compares their exposure to certain risk factors with that of patients without the disease (non-cases). The risk factors associated with a specific disease are thus identified and analyzed; in this case, with an adverse reaction of interest. If risk factors considered are drugs, as in the present study, the role they play in the occurrence of the reaction can then be explored. The strength of the association between the adverse reaction and the bisphosphonate was estimated by calculating a measure of disproportionality, the reporting odds ratio (ROR) with a 95 % confidence interval (CI) and chi-square test with Yates correction. This ROR is based on a 2-by-2 contingency table ($ROR = (a/b)/(c/d) = ad/bc$) (Table I).

Thus, a = case-exposed; b = non-case-exposed; c = case-non-exposed; and d = non-case-nonexposed. If the ROR value is = 1, there would be no association between the drug and the disease, as the exposure ratio in exposed and unexposed cases would be equal. If the ROR is > 1, then there would be an association; the higher the ROR, the greater the association. If the ROR is < 1, the drug would have a protective effect vs the disease under study (14).

RESULTS

As of 31 October 2023, out of a total of 475,235 reports in the FEDRA database, a total of 371 notifica-

tions were identified for alendronic acid in relation to SOC musculoskeletal and connective tissue disorders, accounting for 32.52 % of the notifications for this drug in FEDRA, 248 for ibandronic acid—50 % overall—and 206 for risedronic acid—33.77 % of all notifications (Table II).

The study on disproportionality indicates that the ROR values for this SOC were > 1 for the 3 drugs in the pipeline. Specifically, for alendronic acid, the ROR was 4.2 (3.7-4.8), for ibandronic acid, the ROR was 8.7 (7.3-10.4), and for risedronic acid, the ROR was 4.4 (3.8-5.3) (Table III).

The analysis of the reports revealed that, for alendronic and ibandronic acid, these reactions mostly occur in patients older than 65 years, and most reports are categorized as serious. For all 3 drugs studied, these reactions occur much more frequently in women (Table II).

In the disproportionality analysis for the 9 studied PTs (myalgia, arthralgia, bone pain, paresthesia, musculoskeletal pain, musculoskeletal stiffness, arthritis, muscle weakness and pain in a limb) across the 3 selected drugs, ROR values > 1 were found for all PTs except for paresthesia with alendronic and risedronic acids, and pain in a limb with alendronic and ibandronic acids (Table IV).

The ROR values for bone pain PT were particularly significant. Alendronic acid had a ROR of 32.4 (24.4-43.0), ibandronic acid had a ROR of 13.9 (7.7-25.6), and risedronic acid had a ROR of 35.1 (24.4-50.5). Additionally, for musculoskeletal stiffness PT, ibandronic acid had a ROR of 15.6 (7.7-31.4), and for arthritis PT, risedronic acid had a ROR of 14.7 (8.4-25.5) (Table III).

Table V compares information on several bisphosphonates marketed in Spain, selected in this study, with the information contained in their package leaflets and technical specifications. Arthritis is not mentioned as such in any of the 3 products; for alendronic acid, a term that could be considered as a synonym, “joint swelling”, is mentioned. “Pain in a limb” is not mentioned, nor is “muscle weakness”. “Musculoskeletal stiffness”, a characteristic and distinct reaction, is mentioned only in the label and package leaflet for ibandronic acid.

Table I. 2 x 2 contingency table

Drug of interest	Adverse reaction of interest	
	Cases	Non-cases
Exposed	a	b
Non-exposed	c	d

a = case-exposed; b = non-case-exposed; c = case-non-exposed; and d = non-case-non-exposed. ROR = (a/b)/(c/d) = ad/bc

Table II. Characteristics of the reported cases of SOC musculoskeletal and connective-tissue disorders in the bisphosphonates studied submitted to FEDRA until October 31st, 2023

	Alendronic acid	Ibandronic acid	Risedronic acid
Total reports in FEDRA	1141	496	610
Reports of SOC musculoskeletal and connective-tissue (% of total)	371 (32.52 %)	248 (50 %)	206 (33.77 %)
Age			
Child	0 (0 %)	1 (1 %)	0 (0 %)
Teen	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (1 %)
Adult	143 (38 %)	105 (42 %)	106 (51 %)
> 65 years	184 (50 %)	121 (49 %)	88 (43 %)
Unknown	44 (12 %)	21 (8 %)	11 (5 %)
Sex			
Female	345 (93 %)	230 (93 %)	193 (94 %)
Male	20 (5 %)	12 (5 %)	11 (5 %)
Unknown	6 (2 %)	6 (2 %)	2 (1 %)
Serious			
Yes	215 (58 %)	144 (58 %)	69 (33 %)
No	156 (42 %)	104 (42 %)	137 (67 %)

Table III. Disproportionality analysis for bisphosphonates and SOC musculoskeletal and connective-tissue disorders

	Alendronic acid			Ibandronic acid			Risedronic acid		
	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test
SOC musculoskeletal and connective-tissue disorders	371	4.2 (3.7-4.8)	604.9	248	8.7 (7.3-10.4)	838.8	206	4.4 (3.8-5.3)	359.5

n: number of cases.

Table IV. Disproportionality analysis for bisphosphonates and preferred terms of musculoskeletal adverse reactions selected

	Alendronic acid			Ibandronic acid			Risedronic acid		
	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test
Myalgia	59	1.1 (0.8-1.4)	0.1	63	2.8 (2.2-3.7)	63.6	57	2.0 (1.5-2.6)	25.2
Arthralgia	65	3.2 (2.5-4.1)	89.5	47	5.5 (4.1-7.5)	152.8	61	5.9 (4.5-7.7)	216.2
Bone pain	54	32.4 (24.4-43.0)	1413	11	13.9 (7.7-25.6)	115.7	32	35.1 (24.4-50.5)	933.1
Paresthesia	14	0.9 (0.6-1.7)	0	11	1.8 (1.0-3.3)	3.2	7	0.9 (0.4-1.9)	0
Musculoskeletal pain	9	2.0 (1.0-3.9)	3.5	10	5.2 (2.8-9.7)	28.9	14	5.9 (3.5-10.1)	50.9

(Continues on next page)

Table IV (cont.). Disproportionality analysis for bisphosphonates and preferred terms of musculoskeletal adverse reactions selected

	Alendronic acid			Ibandronic acid			Risedronic acid		
	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test	<i>n</i>	ROR (95 %CI)	chi-square test
Musculoskeletal stiffness	2	1.6 (0.4-6.6)	0.1	8	15.6 (7.7-31.4)	91.8	3	4.6 (1.5-14.5)	5.3
Arthritis	7	4.1 (1.9-8.7)	13.3	5	6.8 (2.8-16.4)	18.9	13	14.7 (8.4-25.5)	146.1
Muscular weakness	8	1.8 (0.9-3.7)	2.2	4	2.1 (0.8-5.7)	1.4	4	1.7 (0.6-4.6)	0.6
Pain in a limb	8	0.8 (0.4-1.7)	0.1	4	0.9 (0.4-2.6)	0	7	1.4 (0.7-2.9)	0.4

Table V. Comparison between the information obtained in this study on 3 bisphosphonates commercially available in Spain and the information included in their technical specifications and leaflets

Reaction	Technical specifications			Leaflet		
	Alendronate	Ibandronate	Risedronate	Alendronate	Ibandronate	Risedronate
Arthritis	X ^a			X ^a		
Arthralgia	X	X		X		
Pain in a limb						
Musculoskeletal pain	X	X	X	X		X
Bone pain	X			X		X
Myalgia	X	X		X		
Paresthesia						
Muscle weakness						
Musculoskeletal stiffness		X ^b			X ^b	

^aNo arthritis as such; instead "joint swelling" is reported. ^bAlso known as "muscle cramps".

DISCUSSION

Musculoskeletal reactions, in particular muscle, bone and joint pain, are mentioned as a possibility in the European Medicines Agency (EMA) data for products marketed in Europe; of note, the instances of "severity" or "disability" were rare (15). The FDA reporting mentions 'serious and disabling reactions have been reported' when taking a different approach that excludes rarity. However, the reporting also notes that a similar proportion of musculoskeletal reactions were found in both the alendronic acid and placebo comparison groups during clinical trials (16).

Out of a total of 475,235 reports in the FEDRA database at the time of the study, 49,110 (10.33 %) were identified as SOC reports of musculoskeletal and connective tissue reactions. For alendronic acid, 371 out of 1,141 re-

ports (32.52 %) reported musculoskeletal reactions. Of these, 215 (57.95 %) were considered serious. Out of a total of 496 reports in FEDRA for ibandronic acid, 248 (50 %) had the reaction of interest. Furthermore, more than half of these reactions were considered serious (58.07 %; *n* = 144). For risedronic acid, there was a total of 610 reports, of which 206 (33.77 %) were musculoskeletal reactions. However, a smaller percentage of these reactions were considered serious (33.50 %, *n* = 69). It is important to understand that severity is determined by pharmacovigilance center technicians based on established criteria. Therefore, a life-threatening reaction is typically classified as serious. The disproportionality estimation in FEDRA produced the following ROR values: ROR = 4.2 (3.7-4.8) for all musculoskeletal reactions related to alendronic acid, ROR = 8.7 (7.3-10.4) for ibandronic acid, and ROR = 4.4 (3.8-5.3) for risedronic acid. These results suggest a strong association, but it is important to

consider possible biases. While some musculoskeletal reactions studied may occur in the context of osteoporosis, which is the main indication for bisphosphonates, the fact that they have been reported as suspicious supports a potential causal relationship. The study of disproportionality in the selected PTs found statistically significant ROR values, except for paresthesia and pain in one limb. ROR values are considered statistically significant if they are > 1 and their confidence interval does not contain 1. For the remaining PTs that meet these assumptions, the RORs ranged from 2.0 (1.5-2.6) for the PT myalgia with risedronic acid up to 35.1 (24.4-50.5) for the PT bone pain with risedronic acid.

The ROR values for PT bone pain were significant: alendronic acid had a ROR of 32.4 (24.4-43.0), ibandronic acid had a ROR of 13.9 (7.7-25.6), and risedronic acid had a ROR of 35.1 (24.4-50.5). These high values suggest that the original site of injury is the bone, where bisphosphonates are deposited. Other reactions may be referred reactions depending on the affected bone site. Bone pain is considered to be less common in clinical settings than muscle or joint pain. It is typically described as penetrating, deep, and dull. The patient experiences a pain that is located in the bones and recorded by the physician. This is not a diagnosis based on the patient's symptoms, but rather a felt reaction or symptom. It is likely that reactions such as "pain in a limb", which are listed in the MedDRA dictionary as different entities, may, at least in part, also be referred to as bone pain. Possible mechanisms of bone pain include osteitis, which is produced by acute phase reactions to bisphosphonates and mediated by cytokines (17). Other mechanisms may involve pressure changes in the bone marrow, hypoxia in the bone, and mechanical stimulation of nociceptors (18). Additionally, bisphosphonates, like statins, alter the HMG-CoA and mevalonate pathway. There are documented cases of bone pain in the literature where analytical data, such as elevated sedimentation rate and C-reactive protein, indicate inflammation (19).

On the other hand, risedronic acid showed a strong association with PT arthritis, with a ROR of 14.7 (8.4-25.5). The other bisphosphonates studied also showed ROR values indicative of association: alendronic acid with a ROR of 4.1 (1.9-8.7) and ibandronic acid with a ROR of 6.8 (2.8-16.4). Arthritis is an inflammation of the joints with an immunogenic basis. Drugs could act as haptens and contribute to the development of this type of reaction. The obtained high ROR value suggests a strong association, but it is important to rule out possible reporting biases. Arthritis may occur more frequently in patients with osteoporosis, who are eligible for bisphosphonate therapy, leading to a spurious association between the drug and the reaction. Osteoporosis can be associated with other conditions, including certain joint diseases. However, this does not fully account for all reported cases of suspected joint problems. There is evidence to suggest that reactions such as arthritis may be underreported in association with drug use. Literature contains numerous well-documented cases of arthritis associated

with the use of various bisphosphonates, some of which also resulted in positive re-exposure (10). Therefore, the results of the clinical evaluation applied to the presented case series, along with the association data from the disproportionality analysis and literature reports, serve as argumentative sources for establishing causality in the specific combinations of bisphosphonates and musculoskeletal reactions in the absence of specific studies. Finally, the strong association between PT musculoskeletal stiffness and ibandronic acid is noteworthy, with a ROR of 15.5 (7.7-31.4). The technical specifications of the drug reflect this association, but it is not reflected in the technical specifications of risedronic acid, which has this adverse reaction with a ROR of 4.6 (1.5-14.5).

LIMITATIONS

One of the main limitations of this study is underreporting, which refers to the reporting of a small number of suspected adverse reactions relative to the actual number of occurrences (20). Underreporting can impact systems that rely on spontaneous reporting. This issue may arise due to the challenge of linking certain medical conditions with specific drugs. Apart from the difficulty of reporting suspicions, there are various reasons for not reporting. These reasons include the belief that the reaction is already known, laziness, lack of knowledge of the reporting programmes, or fear of being reported. It is important to note that reported information should be objective and free from subjective evaluations. The true rate of musculoskeletal adverse reactions associated with bisphosphonates in the population, as well as any adverse reactions in general, is difficult to determine due to underreporting and lack of information on the actual number of patients treated with these drugs. The information generated through spontaneous reporting only provides a partial view of the situation. Although underreporting does not allow for an accurate estimation of the quantitative magnitude of the problem, it does provide insight into the type of disease produced, its severity, and the clinical and public health repercussions. Additionally, it allows for the identification of possible causal associations, which is particularly relevant in the context of pharmacovigilance. Of note, most regulatory interventions on drug safety have been based on spontaneous reporting data (21). Therefore, these data remain valid.

Bisphosphonates are prescribed based on the presence of osteoporosis, a disease whose symptoms may be considered a confounding factor when evaluating the causal relationship between these drugs and the adverse musculoskeletal reactions studied. Osteoporosis is associated with other rheumatic diseases. Based on this confounding factor, the drug would be prescribed to patients who already have musculoskeletal symptoms, which would later be causally associated with the same symptoms. In other words, the prescription of the drug would be linked to the musculoskeletal symptoms that would later be attributed to the drug. Although associations have

been described, it is difficult to conclude that they are always causal, especially without data on time sequence, withdrawal effects, or response to re-exposure. Clinical data supporting a causal reaction would be valuable.

CONCLUSIONS

Bisphosphonates may cause musculoskeletal adverse reactions that are not listed in the product information for bisphosphonate-containing products. Established reactions such as musculoskeletal stiffness, muscle weakness or arthritis, which are named as such, are not included in the information for use contained in the technical specifications and leaflets. The mandatory information on bisphosphonates in these documents needs updating to include known data on musculoskeletal reactions in a clear and consistent manner.

Bisphosphonates can cause a range of musculoskeletal adverse reactions, being arthritis and arthralgia being the most common ones. A significant proportion of reported musculoskeletal reactions are considered serious. As older individuals tend to have longer exposure to bisphosphonates, any adverse reactions would likely be more prevalent in this age group. Among the most frequently occurring musculoskeletal adverse reactions, bone pain is the reaction that is most strongly associated with bisphosphonates.

The benefit-risk ratio of bisphosphonates should be re-evaluated following new data on their long-term safety and efficacy profile. This work, along with literature reports, provides safety information on bisphosphonates that calls for an update of their benefit-risk ratio. Results obtained support the inclusion of new data in the information on these products. The regulatory authorities—Spanish and European—are responsible for including any new safety information in product information, where appropriate. Health care professionals should establish their own risk-benefit ratio based on new safety knowledge.

REFERENCES

1. Tu KN, Lie JD, Wan CKV, Cameron M, Austel AG, Nguyen JK, et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. *PT* 2018;43(2):92-104.
2. Johnston CB, Dagar M. Osteoporosis in Older Adults. *Med Clin North Am* 2020;104(5):873-84. DOI: 10.1016/j.mcna.2020.06.004
3. Eriksen EF, Díez-Pérez A, Boonen S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: a systematic review. *Bone* 2014;58:126-35. DOI: 10.1016/s8756-3282(00)00376-8.
4. Ebetino FH, Sun S, Cherian P, Roshandel S, Neighbors JD, Hu E, et al. Bisphosphonates: The role of chemistry in understanding their biological actions and structure-activity relationships, and new directions for their therapeutic use. *Bone* 2022;156:116289. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116289
5. Rogers MJ, Mönkkönen J, Munoz MA. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton. *Bone* 2020;139:115493. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115493.
6. Reid IR, Billington EO. Drug therapy for osteoporosis in older adults. *Lancet* 2022;399(10329):1080-92. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02646-5. Erratum in: *Lancet* 2022;400(10354):732. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01644-0
7. Ganesan K, Goyal A, Roane D. Bisphosphonate. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.
8. EMA. Leaflet of Adavance. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/adavance-epar-product-information_en.pdf. Accessed 15 November 2023.
9. FDA. Technical specifications of Fosamax. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/021575s017lbl.pdf. Accessed 22 July 2023
10. Diaz-Borjon A, Seyler TM, Chen NL, Lim SS. Bisphosphonate-associated arthritis. *J Clin Rheumatol* 2006;12:131-3. DOI: 10.1097/01.rhu.0000221796.06383.4e
11. Carvajal A, Martín Arias LH, Sáinz M, Escudero A, Fierro I, Sauzet O, et al. Carpal Tunnel Syndrome Associated with Oral Bisphosphonates. A Population-Based Cohort Study. *Plos One* 2016;11:e0146772. DOI: 10.1371/journal.pone.0146772
12. Brown EG, Wood L, Wood S. The Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) Drug Saf 1999;20:109-17. DOI: 10.2165/00002018-199920020-00002
13. Faillie J-L. Case-non-case studies: principle, methods, bias and interpretation. *Therapies* 2019;74:225-32. DOI: 10.1016/j.the-rap.2019.01.006
14. Rothman KJ, Lanes S, Sacks ST. The reporting odds ratio and its advantages over the proportional reporting ratio. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2004;13(8):519-23. DOI: 10.1002/pds.1001
15. Ozaras N, Rezvani A. Diffuse skeletal pain after administration of alendronate. *Indian J Pharmacol* 2010;42:245-6. DOI: 10.4103/0253-7613.68435
16. Yemisci OU, Yalbuздag SA, Karatas M. Risedronate-induced arthritis. *J Clin Rheumatol* 2010;16:168-9. DOI: 10.1097/RHU.0b013e3181dfbb15
17. Uğurlar M. Alendronate- and risedronate-induced acute polyarthritis. *Osteoporos Int* 2016;27:3383-5. DOI: 10.1007/s00198-016-3695-3
18. Black DM, Delmas PD, Eastel R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. HORIZON Pivotal Fracture Trial. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007;356:1809-22. DOI: 10.1056/NEJMoa067312
19. Reid DM, Devogelaer JP, Saag K, Roux C, Lau CS, Reginster JY, et al. Zoledronic acid and risedronate in the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis (HORIZON): a multicentre, double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. *Lancet* 2009;373:1253-63. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60250-6
20. Álvarez-Requejo A, Carvajal A, Begaud B, Moride Y, Vega T, Martín-Arias LH. Under-reporting of adverse drug reactions: estimate based on a spontaneous reporting scheme and sentinel system. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;54:483-8. DOI: 10.1007/s002280050498
21. Inman W. Assessment of drug safety problems. in *Epidemiological issues in reported drug-induced illness*. S.I. Gent M, editor. Mc Master University Library Press: Honolulu (ON). 1996. p. 17-24.

Original

Identification *in silico* of miRNAs and their targets involved in the development of osteoarthritis

Sergio Rafael Carrillo-Patiño^{1,2}, Fiordaliso Carolina Román-Carraro³, Juan Fernando Montes-García^{2,4}, Martha Alicia Ballinas-Verdugo⁵, José Eduardo Justo-Frausto², Emma López-Espinosa⁶, Rogelio Frank Jiménez-Ortega^{1,6}

¹Laboratorio de Genómica del Metabolismo Óseo. Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Mexico City. Mexico. ²Unidad Académica de Ciencias de la Salud. Universidad ETAC campus Coacalco. Coacalco de Berrizobal, Mexico State. Mexico. ³Departamento de Procesos y Tecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Cuajimalpa. Mexico City. Mexico. ⁴Laboratorio de Genética. Unidad de Morfología y Función. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. Tlalhepantla de Baz, Mexico State. Mexico. ⁵Departamento de Inmunología. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Mexico City. Mexico. ⁶Unidad de Acupuntura Humana Rehabilitatoria. Universidad Estatal del Valle de Ecatepec (UNEVE). Ecatepec de Morelos, Mexico State. Mexico

Abstract

Introduction: osteoarthritis is considered the main cause of joint pain in older people, affecting four core tissues: cartilage, bone, joint capsule, and joint apparatus. In recent years, microRNAs have been described to play a vital role in the development of bone metabolism diseases, including osteoarthritis, since they can have an inhibitory effect or a promoting effect on disease progression.

Objective: through microarray analysis and bioinformatics tools, miRNAs and their potential target genes involved in signaling pathways associated with the development of osteoarthritis are identified.

Methods: the microRNAs were selected through microarray expression analysis from the "Gene Expression Omnibus" database, and through literature search, their target genes were obtained by integrating different databases. This set of genes was compared with a set of differentially expressed genes from expression microarray analysis of samples from patients with osteoarthritis. The shared gene set was subjected to signaling pathway enrichment analysis.

Results: a total of 4 miRNAs were identified, miR-485, miR-940, miR-107, and miR-142-5p, that regulate 185 genes involved in 9 signaling pathways in which *CSF1*, *CXCL3*, *FOS*, *IL6*, *IL6R*, *NFATC1*, *NFKB1*, *NFKB2*, *PPARG*, *THBS1* and *TNF* genes play a crucial role in bone and immune system-associated processes and their deregulation may favor the progression of osteoarthritis.

Conclusions: the microRNAs identified in this study could be used as biomarkers for the timely diagnosis and monitoring of osteoarthritis treatment.

Keywords:
Osteoarthritis.
Bone metabolism.
MicroRNAs. Bone
mineral density.
Bioinformatics.
Microarrays.

Received: 12/10/2024 • Accepted: 27/01/2025

Acknowledgements: Rogelio Frank Jiménez-Ortega PhD. is part of the COMECYT researchers and researchers for Mexico program with folio number CAT2024-0036.

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflict of interest.

Artificial intelligence: the authors declare not to have used artificial intelligence (AI) or any AI-assisted technologies in the elaboration of the article.

Carrillo-Patiño SR, Román-Carraro FC, Montes-García JF, Ballinas-Verdugo MA, Justo-Frausto JE, López-Espinosa E, Jiménez-Ortega RF. Identification *in silico* of miRNAs and their targets involved in the development of osteoarthritis. Rev Osteoporos Metab Miner 2025;17(1):8-18

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00064

Correspondence:

Rogelio Frank Jiménez-Ortega. Laboratorio de Genómica del Metabolismo Óseo. Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Ciudad de México, México
e-mail: rogeliofrank.jimenez@uneve.edu.mx

INTRODUCTION

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent chronic joint disease worldwide. It affects all joint tissues, causes complete joint dysfunction, and causes progressive loss of articular cartilage, which generates damage to other joint structures, such as the subchondral bone and the membrane synovium, leading to chronic disability and decreased quality of life (1). Changes in cartilage can be age-induced. However, cartilage degeneration can occur in response to inappropriate mechanical stress and low-grade systemic inflammation associated with trauma, obesity, and genetic predisposition, which subserve the risk of development and progression of OA (2).

The complex interactions among cartilage, synovium, and subchondral bone significantly impact cartilage function, making it challenging to pinpoint the onset and location of pathological changes. Consequently, it has been suggested that biological factors may trigger temporal and spatial alterations in chondrocytes and cellular components of cartilage, that potentially leading to a pathological state (3). Chondrocytes are derived from mesenchymal progenitors and its function is to synthesize the extracellular matrix and form anlagen cartilage for bone development (4). Chondrogenesis occurs due to the condensation of mesenchymal cells expressing collagens I, III, and V and the differentiation of chondroprogenitor cells with expression of cartilage-specific collagens II, IX, and XI. During limb development, resting chondrocytes can form cartilage at the ends of opposing bones with intermediate interzones formed during cavitation, increase, and then proceed to terminal differentiation towards hypertrophy and apoptosis to allow endochondral ossification so the calcified hypertrophic cartilage is resorbed and replaced by bone (5). Proliferating chondrocytes are under the control of the parathyroid hormone/Indian hedgehog (PTHrP/Ihh) axis and express collagen VI and matrilin 1 (MATN1). The hypertrophic zone is characterized by collagen of vascular endothelial growth (VEGF) and VEGF receptors whose interaction allows non-vascularized and hypoxic tissue to be converted into bone through the activity of osteoclasts (bone-retaining cells) and osteoblasts (bone-forming cells). A similar sequence of events occurs in the postnatal growth plate, leading to rapid skeletal growth (6). These processes depend on a complex regulation through the interaction of transforming growth factor β (TGF- β), bone morphogenic protein (BMP), and the WNT signaling pathway. Therefore, changes to these signaling pathways could lead to the development of OA (7). Recent studies have shown that microRNAs (miRNAs) play an essential role in the appearance and development of different diseases: multiple types of cancer, cardiovascular, metabolic, immune, kidney and bone metabolism diseases (8).

miRNAs are a class of endogenous, small (19-25 nt), non-coding RNAs that negatively regulate gene expression and basic physiological processes such as cell differentiation, growth, proliferation, metabolism, and apoptosis. The miRNA-mediated target gene regulation process begins with the recognition of the pre-miRNA duplex chain through the DICER protein, which is an RNase III responsible for the elimination of the terminal loop of the pre-miRNA, which together with the argonaute protein (AGO) are part of the RNA-induced silencing complex (RISC). The chains derived from the mature duplex miRNA are loaded into AGO in humans and are ATP-dependent. Overall, the strand with the lowest stability in the 5' position or 5' uracil is preferably loaded into AGO and will be considered as the guide strand. The selection of this chain depends on the union of the first 6-8 nucleotides with the 3'UTR region of the target mRNA (seed region) and the type of AGO protein that is present in the RISC. It has been shown that miRNAs bind to specific sequences, and the base complementarity between the miRNA and its target gene determines the fate of the mRNA. The interaction between the miRNA seed region (2-8 nt) and the 3'UTR of the mRNA is of great importance since perfect complementarity allows the AGO2 protein with exonuclease function to cleave the mRNA at RNA processing proteins, which associate with AGO and function as mRNA storage sites (P bodies). On the other hand, when the binding of the miRNA to the seed region of the mRNA is not perfect, a hairpin is formed between the miRNA and its target gene between the 9th and 10th nucleotides of the miRNA, inducing translation suppression (9). To date, few studies have investigated circulating miRNAs in OA, and findings lack consistency, with the diagnostic value of these miRNAs yet to be elucidated. Therefore, this work aims to identify miRNAs and their potential target genes involved in signaling pathways whose deregulation can lead to the development of OA, through search of existing literature and bioinformatics tools.

MATERIAL AND METHODS

SELECTION OF miRNAs

To select a set of miRNAs involved in the development of OA, microarray files in CEL format were first obtained from studies where changes in miRNA expression profiles in patients with OA were analyzed, which were selected through searching in different databases: PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Files in ".txt" format were obtained from a study where miRNAs differentially expressed in primary osteoblasts from patients with hip replacement for osteoporosis or OA were identified using the miRCURY LNA microRNA Array, 7th Generation technology (QIAGEN, San Diego, USA) with access No. GSE74209 (10). In a different study using high-throughput seqRNA (DNBSEQ [BGI-Shenzhen, China]), changes in the ex-

pression profiles of ncRNAs from synovial tissue samples of anterior cruciate ligation tears were analyzed, from which the analyzed data of differentially expressed miRNAs were obtained (11). Finally, through a literature search, a set of miRNAs associated with OA was compiled, which are summarized in a review and bioinformatics analysis conducted by Cong et al. 2017 (12). The group of miRNAs selected for this study was selected through a comparative analysis represented in a Venn diagram using the "Bioinformatics & Evolutionary Genomics" tool (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

PREDICTION OF POTENTIAL miRNA TARGET GENES

To identify the target genes of selected miRNAs, a search was performed in different databases that use computational algorithms to determine the nucleotide pairing between the 3'UTR region of a target mRNA and the 5' "Seed" region (2-7 nucleotides) of a miRNA. Databases used were miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>), miRDB (<https://mirdb.org/>), TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/), Tools4miRs (<https://tools4mirs.org/software/>), and miRTarBase (<https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/>). The target RNAs for each miRNA were selected if they were present in, at least, 3 of the 5 databases used (13).

CANDIDATE GENES SELECTION

To select candidate genes, a search was performed across PubMed and GEO, looking for studies that employed genome-wide analysis technologies to identify OA-related differentially expressed genes (DEG). Files were obtained from a survey that identified differentially expressed genes in a sample of 79 individuals categorized into 3 groups including 20 healthy controls, 26 OA patients, and 33 rheumatoid arthritis (RA) patients through expression microarrays on the GeneChip platform. Human Genome U133A/B from Affymetrix. Files were obtained in CEL format and corresponded to both the control and OA groups. The original files in CEL format were processed to expression values using the Robust Multi-array Average (RMA) method in the R-BiocManager environment. Probe-level data were transformed into expression values, followed by background correction and data normalization. The cut-off criteria used to select differentially expressed genes were that they had expression change values < -0.5 and > 0.5 since the change rate is expressed in Log_2 , which represents that a gene is at least twice as expressed in one condition vs another. A false discovery rate (FDR) < 0.05 was also shown as a cut-off criterion to control the false positive rate. The selection of eligible genes was conducted through a comparative analysis between the genes predicted for each

miRNA and the DEG from the microarray analysis. This set of genes was represented through a Venn diagram, ensuring that the shared genes were targets of the miRNAs and were involved in OA.

INTERACTION NETWORK BETWEEN miRNAs AND TARGET GENES

Once the list of genes involved in the signaling pathways of interest was available, an interaction network between miRNAs and target genes was developed using the Cytoscape v3.7.2 software. In Cytoscape, the default damping criterion for setting the dissipation coefficient is the probability of termination (dissipation). This requires a value between 0 and 1, which sets the dissipation directly on average. Therefore, in this study, we used a local clustering index of 0.592, set as an optimal probability value by the same software. These interactions allow the identification of potential miRNAs and candidate genes whose changes in their expression profiles could affect bone metabolism.

RESULTS

IDENTIFICATION OF miRNAs INVOLVED IN THE PATHOGENESIS OF OA

Through the search for miRNA expression data in different databases, 3 groups including a total of 453 differentially expressed miRNAs were identified corresponding to the work where the miRCURY LNA microRNA Array, 7th generation (QIAGEN, San Diego, USA) technology was used (10), 211 differentially expressed miRNAs where high-throughput Seq-RNA technology was used through the DNBSEQ platform (BGI-Shenzhen, China) (11) and 136 miRNAs from a literature review (12) (Fig. 1A).

miRNA TARGET GENE PREDICTION

The prediction of the potential target genes of the miRNAs (mRNA) was conducted based on their presence in, at least, 3 of the 5 databases used for the analysis, identifying a total of 723 target genes for miR-485, 1030 genes for miR-940, 821 genes for miR-107 and 1133 genes for miR-142-5p, which were unified into a single list, eliminating repeats (Fig. 1B).

ELIGIBLE GENE SELECTION

Data from GEOs with accession No. GSE55235 were analyzed to analyze OA-related GDE. Data were re-

trieved in CEL format from the GeneChip Human Genome U133A/B expression microarray. Differential expression analysis showed 199 downregulated genes and 2123 upregulated genes that met the < -0.5 and > 0.5 -Fold-Change cutoff criteria with a p -value < 0.05 (Fig. 1C). The list of the GDE from the microarray was compared with the unified list of target genes of the miRNAs through a Venn diagram where it is observed that 379 genes involved in OA are shared and that they are targets of the selected miRNAs (Fig. 1D). The genes recovered from this analysis were used to identify the signaling pathways involved in the development of OA.

OA-RELATED SIGNALING PATHWAYS

The genes shared between microarrays and target genes were analyzed for signaling pathways using the KEGG tool in the ShinyGO software. This tool identifies the signaling pathways associated with a given set of genes by referencing an online database of genomes, enzymatic pathways, and cellular biomolecules, as well as their specific variants in different organisms. The analysis identified nine signaling pathways related

to OA development (Table I). An interaction network between these pathways was generated (Fig. 2), and an enrichment analysis of the involved genes revealed 20 OA-related diseases (Fig. 3).

INTERACTION NETWORK BETWEEN TARGET GENES AND miRNAs

From the 185 genes identified in the OA-related signaling pathways, an interaction network was generated along with the 4 selected miRNAs (Fig. 4). From this interaction network, a total of 12 genes were selected that play an essential role in bone metabolism and that, based on literature review, are associated with the development of OA: Colony Stimulating Factor 1 (CSF1), C-X-C Motif Chemokine Ligand 3 (CXCL3), Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit (FOS), Interleukin 6 (IL6), Interleukin 6 Receptor (IL6R), KRAS Proto-Oncogene, GTPase (KRAS), Nuclear Factor Of Activated T Cells 1 (NFATC1), Nuclear Factor Kappa B Subunit 1 (NFKB1), Nuclear Factor Kappa B Subunit 2 (NFKB2), Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPARG), Thrombospondin 1 (THBS1), and Tumor Necrosis Factor (TNF).

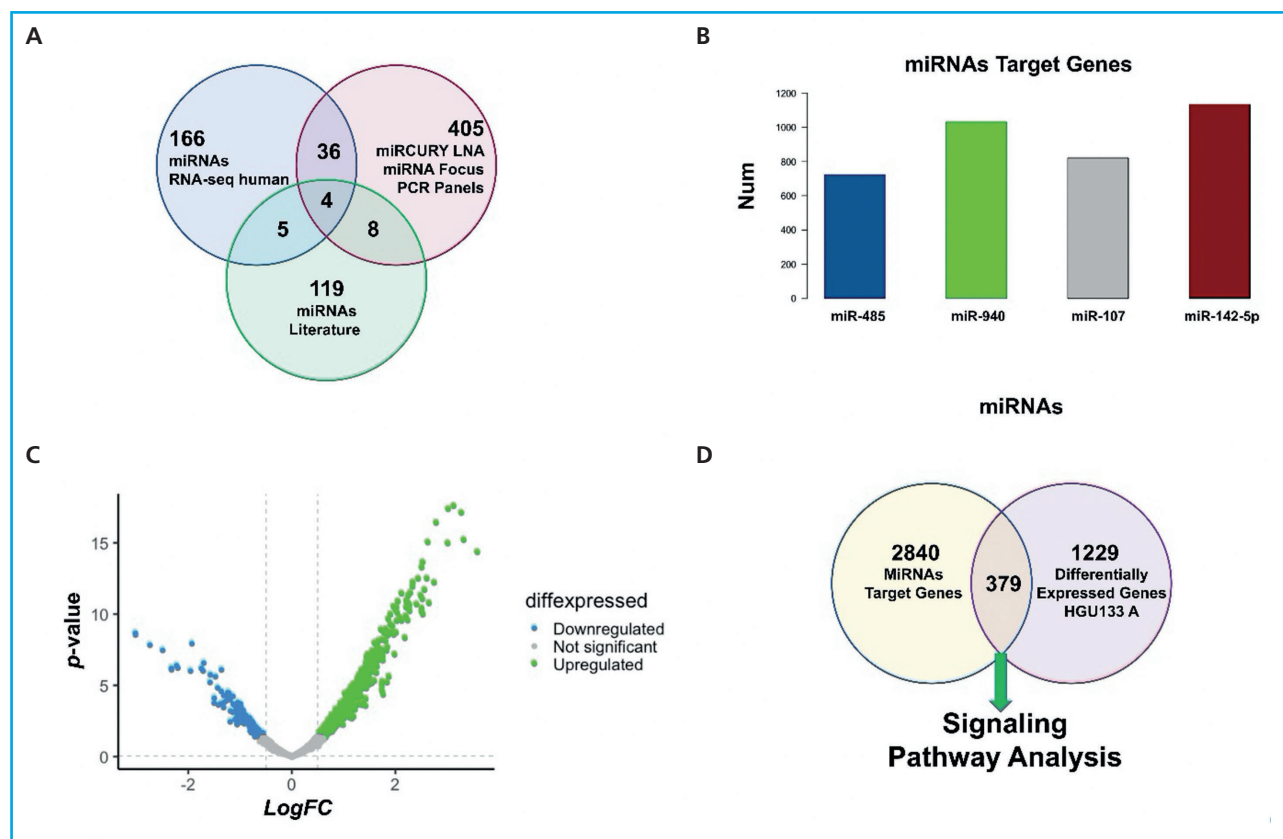


Figure 1. Analysis of miRNA selection and potential target genes. A. Venn diagram between groups of miRNAs from seqRNA, microarrays, and systematic literature review. B. No. of target genes present in, at least, 3 databases identified for each miRNA. C. Volcano diagram of differentially expressed genes from the HGU133A/B expression microarray analysis. D. Venn diagram between the group of target genes of each miRNA and the differentially expressed genes from the HGU133A/B microarray analysis.

Table I. Osteoarthritis-related signaling pathways

Pathways	nGenes	Total pathway genes	Enrichment FDR
PI3K-Akt signaling pathway	70	354	3.81E-14
MAPK signaling pathway	57	294	1.45E-11
TNF signaling pathway	40	212	1.20E-16
FoxO signaling pathway	35	131	3.05E-11
Osteoclast differentiation	32	200	9.18E-10
JAK-STAT signaling pathway	28	232	1.84E-05
Rheumatoid arthritis	27	231	8.65E-10
NF-kappa B signaling pathway	25	126	1.79E-07
AMPK signaling pathway	23	156	2.18E-05

FDR: false discovery rate. nGenes: no. of genes.

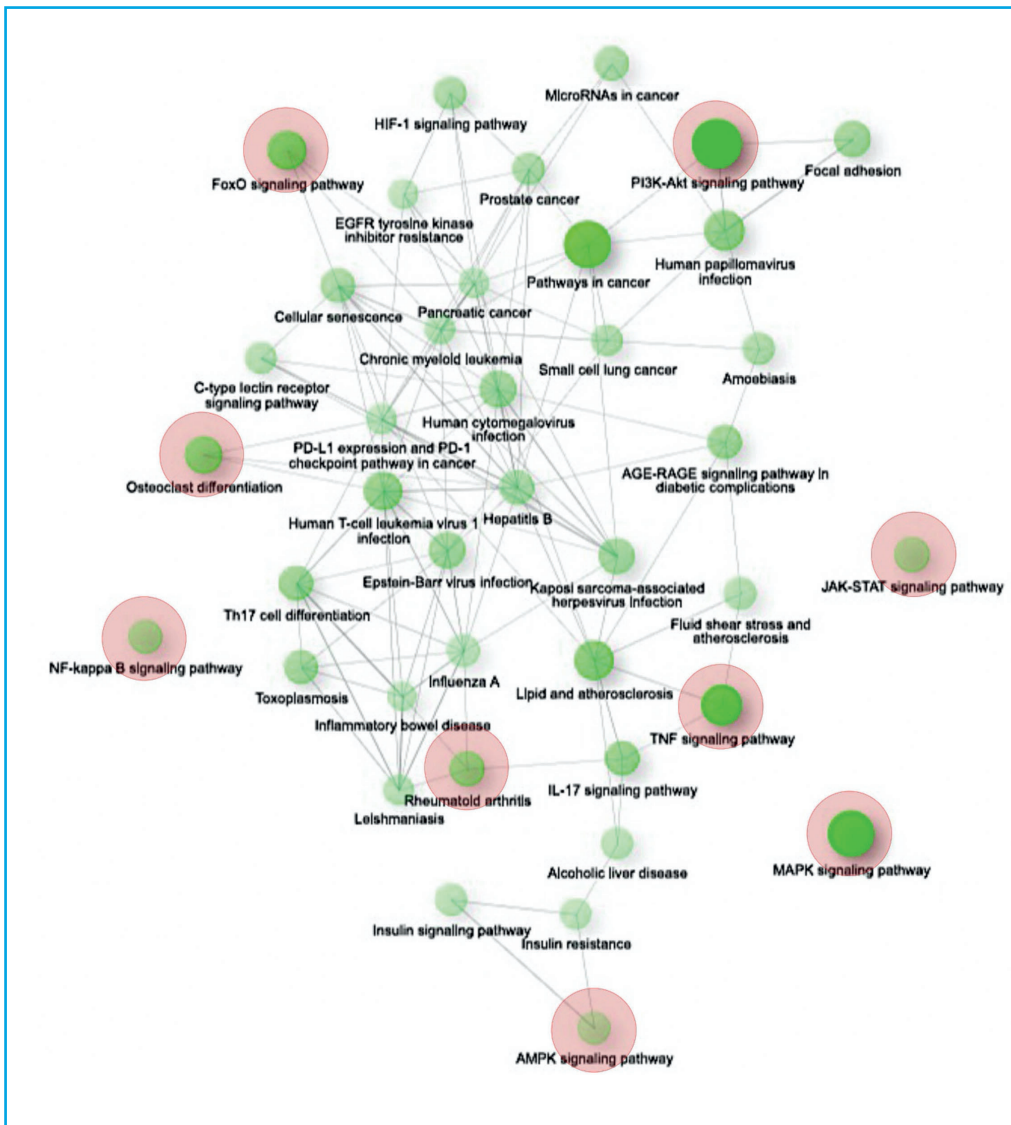


Figure 2. Analysis of interaction networks between the selected signaling pathways. Pathways involved in the development and progression of OA are highlighted in red. PI3K-Akt signaling pathway, MAPK pathway, TNF signaling, FOX signaling pathway, osteoclast differentiation, JAK-STAT signaling pathway, rheumatoid arthritis, NF-kappa B signaling pathway, and AMPK signaling pathway.

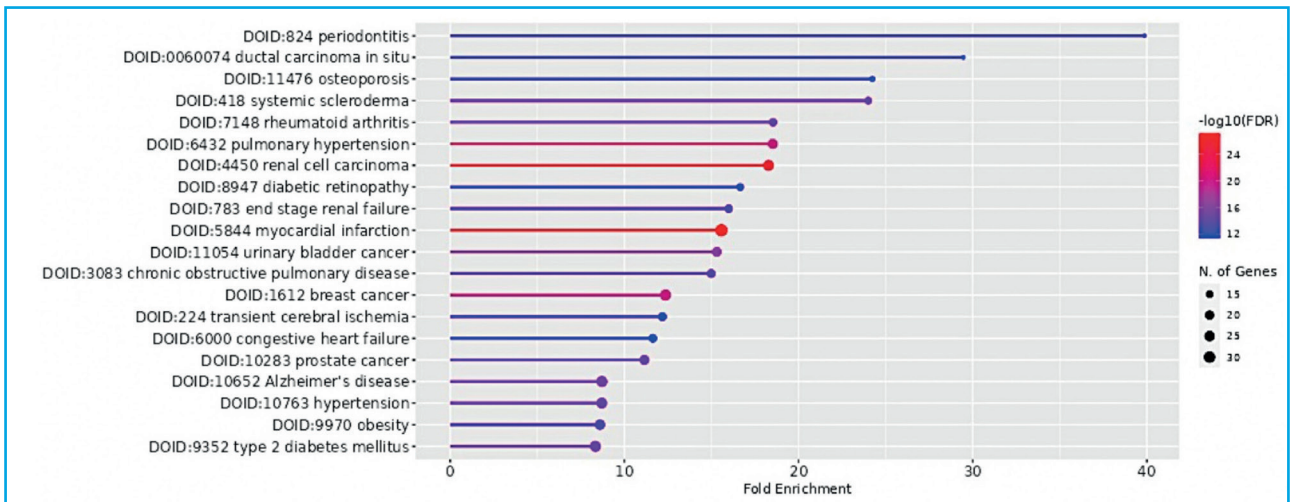


Figure 3. Chart of OA-related conditions. The different comorbidities associated with the development and progression of OA are shown.

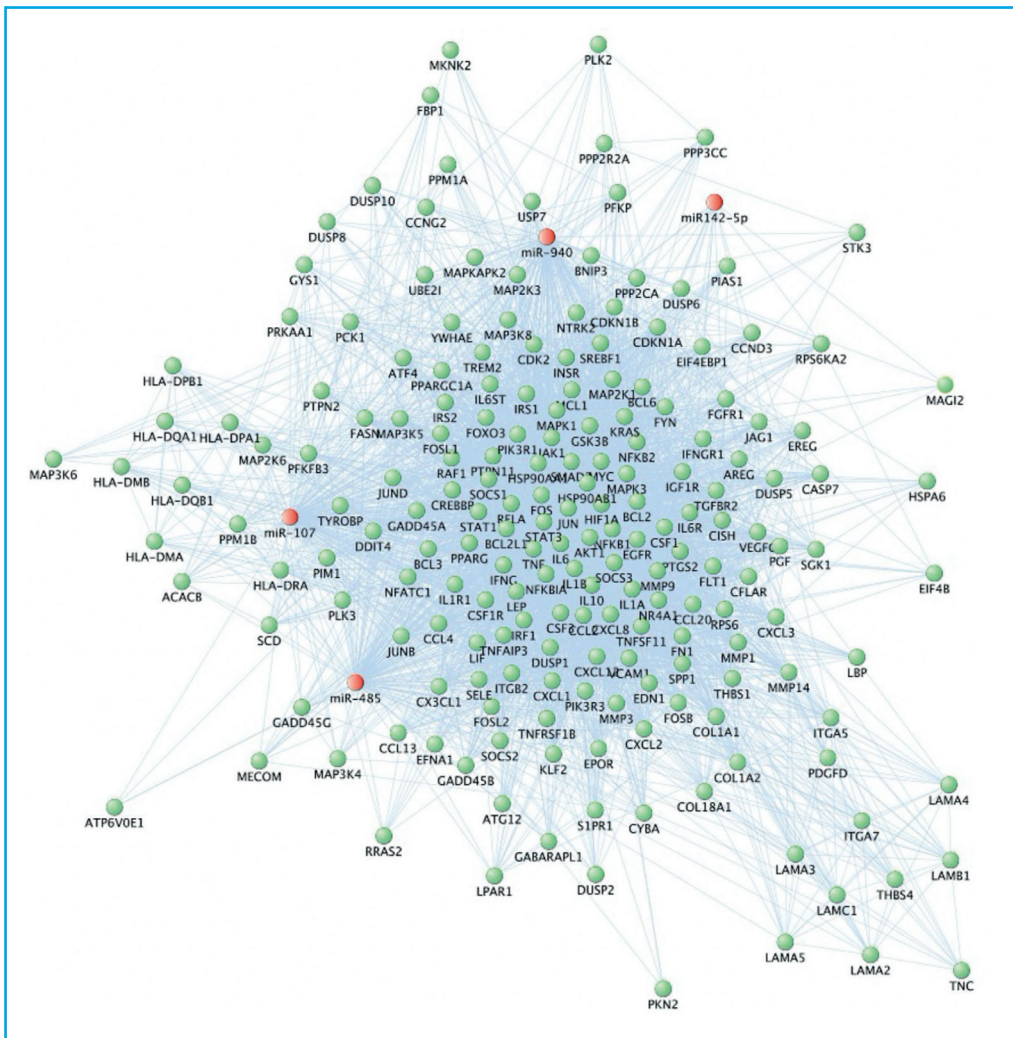


Figure 4. Interaction network between miRNA and target genes. Genes marked in red were selected for their participation in OA-related signaling pathways. They are targets of miRNAs miR-485, miR-940, miR-107, and miR-142-5p and present interaction with multiple signaling pathways.

The expression profile of this set of genes was represented through a heat map showing the downregulated and upregulated genes in OA (Fig. 5).

DISCUSSION

Our study presents an *in-silico* analysis focused on evaluating the expression signatures of human miRNAs involved in the regulation of genes that participate in different signaling pathways whose alterations can lead to the development of OA. Based on the bioinformatics search, 4 miRNAs involved in OA were identified: miR-485/miR-142 is down-regulated, and miR-940/miR-107 is up-regulated. MiR-485 has been associated with the development of OA through the inhibition of the Notch2 and NF- κ B signaling pathways, promoting chondrocyte proliferation in OA and inhibiting apoptosis (14). MiR-142 has a protective effect against OA by competing with the lncRNA XIST that regulates chondrocyte growth and apoptosis (15). MiR-940 regulates the expression of genes such as MyD88, which induces a level of inflammation and simultaneously stimulates the NF- κ B signaling pathway mechanism (16). MiR-107 affects cartilage matrix degradation in the pathogenesis of OA through the regulation of caspase 1, positively regulating chondrocyte proliferation (17). However, although these miRNAs have been linked to the development of OA, their role as potential biomarkers in bone metabolism and related diseases is yet to be elucidated.

Our analysis revealed a total of 9 bone metabolism-related signaling pathways whose dysregulation is associated with the development of OA. PI3K-Akt

signaling pathway involves different molecules that regulate diverse biological processes. In cartilage, it regulates synovial inflammation, subchondral bone sclerosis, extracellular matrix homeostasis, chondrocyte proliferation, apoptosis, autophagy, and inflammation (18). MAPK pathway transmits extracellular signals to cells through a cascade reaction involving kinases in articular chondrocytes and inducing phosphorylation cascades. These stimuli include inflammatory factors, cytokines in the joint fluid, changes in osmotic pressure, and changes in biological stress (19). TNF signaling is tightly regulated by post-translational ubiquitination, an essential mechanism for the regulation of many biological processes. The role of inflammatory factors such as IL-1, TNF, and caspase-8/3 are involved in chondrocyte apoptosis, leading to further degenerative changes in cartilage (20). FOX signaling pathway is related to cell fate and promotes chondrocyte homeostasis (21). Osteoclast differentiation is a biological process responsible for the resorption of bone tissue, its role is well established in average bone turnover. However, osteoclasts play key roles in other diseases, such as progressive joint destruction. It has been reported that the degradation of the cartilage and osteochondral junction compartments of the joint is carried out by the action of osteoclast-derived metalloproteinases (MMPs) so that changes to the differentiation pathway of these cells could be constitutively activated, leading to the resorption of cartilage tissue, and favoring the development of OA (22). JAK-STAT signaling pathway is responsible for regulating cellular responses to cytokines such as IL-6 and epidermal growth factor (EGF) and biological processes such as cell proliferation, cell differentiation, and apoptosis. One study suggests that *CXCL8* and *CXCL11* may be involved in apoptosis and inhibit primary chondrocyte

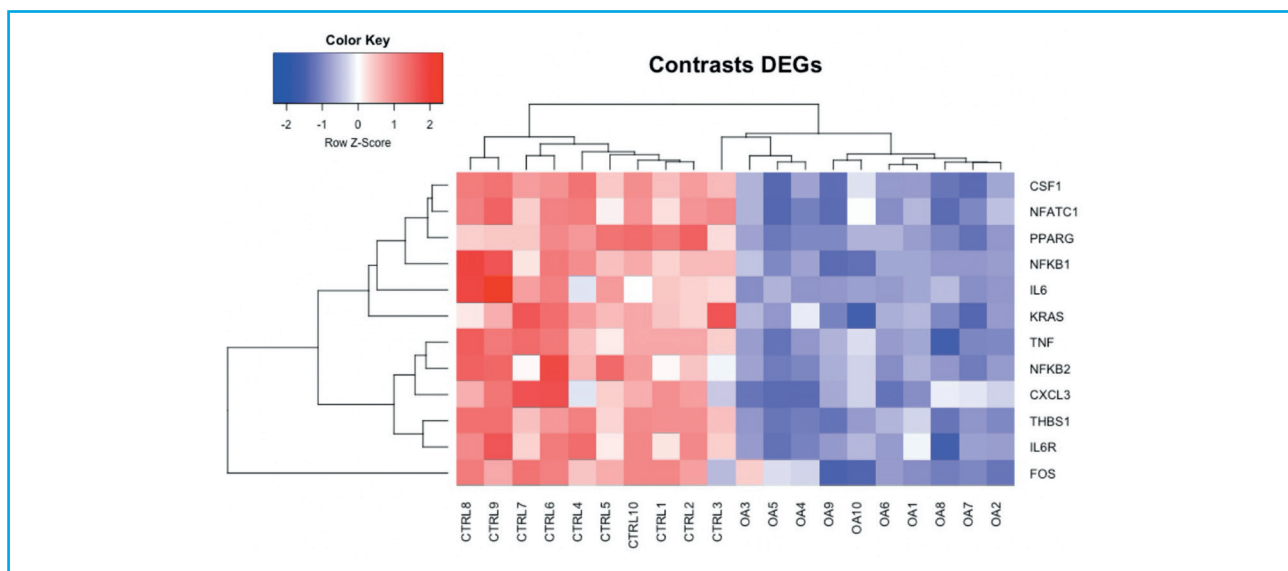


Figure 5. Differential expression analysis. Heatmap showing the expression profiles of genes involved in the development and progression of OA. Down-regulated genes are shown in blue, and up-regulated genes in red.

proliferation by regulating the expression of phosphorylated *STAT3*, leading to the development of OA (23). Rheumatoid arthritis is a disease that affects the joints and induces inflammation, which causes thickening of the tissues surrounding the joints, resulting in joint failure and pain (24). The TNF-kappa B signaling pathway regulates the expression of proinflammatory genes. It has been reported that this signaling pathway regulates the activation of osteoclast differentiation, activates the inflammatory response, and promotes the expression of catabolic factors such as MMPs that induce the destruction of articular cartilage (25). The AMPK signaling pathway plays a role in regulating growth and reprogramming metabolism. AMPK proteins are essential mediators of AMPK signaling activities and could provide energy for the inflammatory reactions that promote the development of OA (26).

Interestingly, we have observed that the miRNAs identified in this study, as well as their potential target genes involved in the described signaling pathways, play a key role in the activation and differentiation of osteoclasts. The *CSF1* gene encodes an essential cytokine for osteoclastogenesis that promotes the proliferation, survival, and differentiation of monocytes/macrophages and is regulated by miR-485, miR-940, and miR-107. Its negative regulation inhibits the formation of mature osteoclasts. However, when miR-485 is deregulated, it could allow the expression of *CSF1* and, therefore, the differentiation of osteoclasts (27,28). On the other hand, the *CXCL3* gene can recruit and activate various immune cells such as monocytes/macrophages, neutrophils, T cells, natural killer (NK) cells, fibroblasts, and endothelial cells involved in the pathogenesis of OA (29). This gene is regulated by miR-485 and miR-940; these miRNAs could play a vital role in the recruitment of cells such as monocytes, which have a fundamental role in the progression of OA, given their participation in inflammatory responses and their ability to differentiate into osteoclasts (30). The *NFkB1/NFkB2* genes are precursors of NF- κ B, which, along with *FOS*, are transcription factors that are activated in immune cells and activated in osteoclast precursors. These genes are regulated by miR-485, while the *FOS* gene is regulated by miR-107, so these miRNAs could play a key role in regulating the differentiation of osteoclasts capable of degrading cartilage in OA. Another cytokine involved is IL6, which is present in elevated levels of synovial fluid of individuals with a confirmed clinical diagnosis of OA, and its mechanism of action has been shown to involve its ability to interact with its receptor IL6R. This interaction significantly suppresses the synthesis of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the immortalized human chondrocyte line, C28/I2 (31). Keeping this in mind, here, we report that NGAL regulates the activity of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), whose activity is crucial in OA for the destruction of articular cartilage (32). MiR-485, miR-940, and miR-107 could regulate the expression of *IL6*, while *IL6R* is

targeted by miR-485, miR-940, miR-107, and miR-142-5p so that these miRNAs could play a vital role in the secretion of MMPs by osteoclasts in individuals with OA. *KRAS* gene is a small GTPase that functions as a signal transducer from cell surface receptors activated by extracellular stimuli to various well-regulated cytoplasmic signaling networks, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Although the role of *KRAS* in bone metabolism remains unclear, studies in mice have shown that mutations in this gene are associated with an increase in the number of osteoclasts and, therefore, in bone resorption (33). *KRAS* is targeted by miR-485, miR-940, miR-107, and miR-142-5p so that these miRNAs could be involved in the activation of osteoclast differentiation. The *NFATC1* gene plays the role of the master regulator of osteoclast differentiation transcription. Its activation allows the differentiation of cells of the monocyte/macrophage lineage after stimulation by the two essential cytokines, CSF1 and RANKL. This gene is the target of miR-485, so deregulation of this miRNA could promote osteoclast differentiation and increase cartilage and bone tissue resorption. *PPARG* is a gene that regulates chondrocyte apoptosis in individuals with OA through the caspase-3-dependent mitochondrial pathway, and PPARG-mediated autophagy activation alleviates inflammation in rheumatoid arthritis (34). MiR-485, miR-940, and miR-107 regulate this gene, and these miRNAs might play a role in regulating chondrocyte cell death. The *THBS1* gene is involved in chondrogenesis; its primary known function is its antiangiogenic and anti-inflammatory effect in several models, mainly in cancers and heart diseases. *THBS1* exerts an antiproliferative role in T lymphocytes, exerting an anti-inflammatory effect, which demonstrates that this gene has a chondroprotective effect (35). Such gene is targeted by miR-485, miR-940, miR-107, and miR-142-5p, so the regulation mediated by these miRNAs could be associated with the development of OA. TNF is a proinflammatory cytokine and, together with other cytokines, is a catabolic factor for cartilage; this cytokine promotes the release of matrix metalloproteinases (MMPs) from synovial fibroblasts, resulting in cartilage destruction, and inhibits chondrogenesis through the nuclear factor-kB (NF-kB) pathway by downregulating SOX production (36). MiR-485, miR-940, and miR-107 regulate a TNF, which means that the function of these miRNAs could be related to cartilage formation and maintenance.

Based on bioinformatics analysis and literature search on the role of miRNAs and their potential target genes involved in the development of OA, we propose a model that represents the role of the genes involved in the identified signaling pathways and their miRNA-induced regulation (Figure 6). On the other hand, changes to the expression profiles of miRNAs and target genes identified in this study are also related to other diseases that may be risk factors promoting the development of OA. Recent studies from

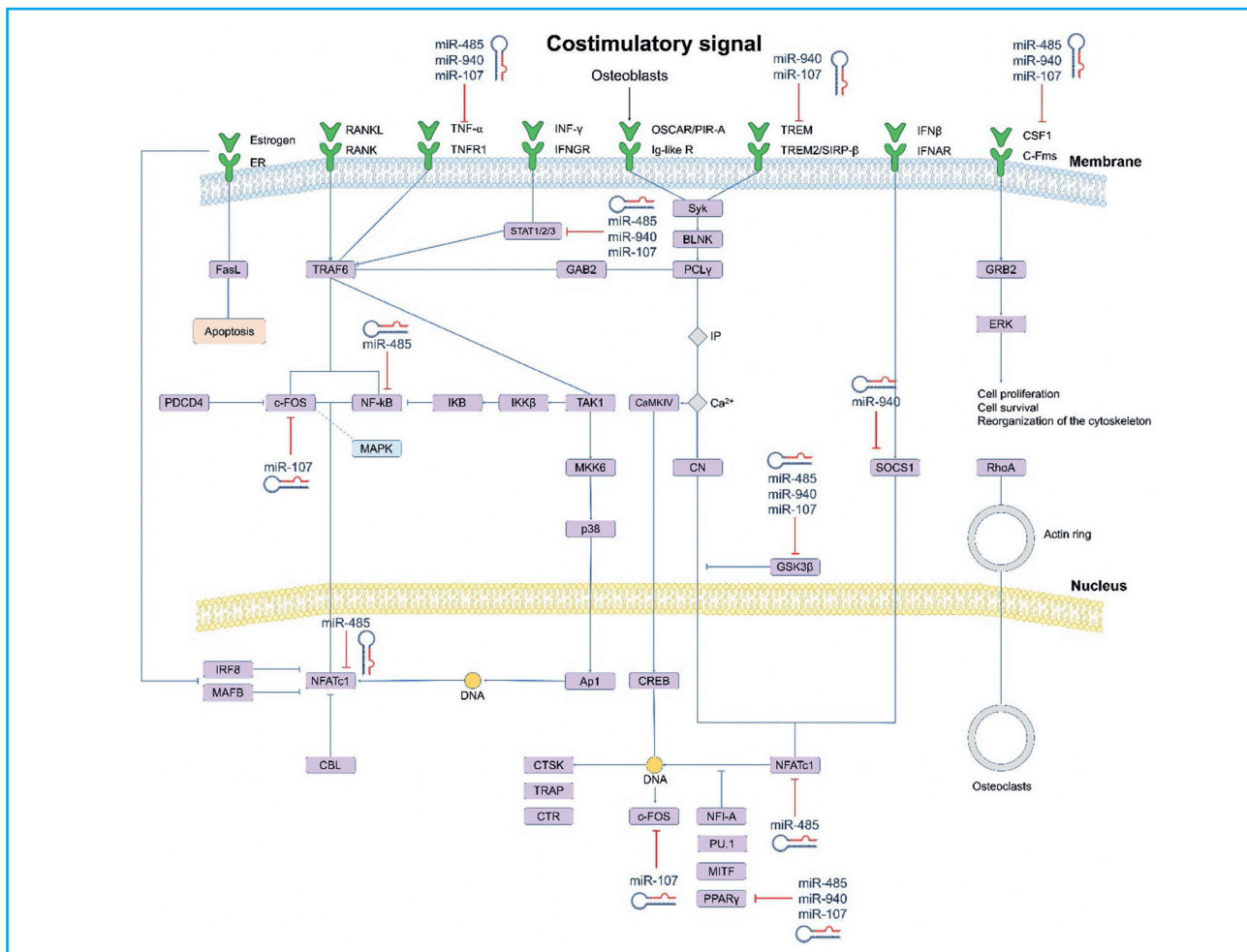


Figure 6. Schematic of the signaling networks involved in OA development and their miRNA-induced regulation. It is shown that miRNAs directly (solid lines) or indirectly (dashed lines) inhibit vital genes and transcription factors in osteoclast differentiation.

Finnish population suggest that periodontitis and osteoarthritis are related in a bidirectional pattern (37). Other studies have analyzed the relationship between osteoporosis and OA, where the role of common and divergent factors has been identified, leading to new findings on the role of BMD. It has been reported that the relationship between BMD and OA depends on the stage, definition, location, and way in which BMD is measured, suggesting that OA should be further specified in terms of bone involvement. Therefore, the osteoporotic and erosive phenotypes would be candidates for bone-targeting drugs. At the same time, the bone-forming subtype, which refers to bone-forming tumors that can be benign or malignant and are characterized by abnormal proliferation of bone cells, could be studied (38).

Cases of osteoarticular signs are commonly present in patients with systemic sclerosis and have a significant impact on the patient's quality of life (39). A study analyzed the risk of mortality and cardiovascular morbidity in patients with OA. Authors compared the rate

and prevalence of hypertension between rheumatoid arthritis and OA. Their results showed no inter-group differences in the rate or prevalence of hypertension. Only patients with rheumatoid arthritis with long-term remission had a marginally lower prevalence of hypertension (40). In obesity, OA is related to excessive joint loading with impaired biomechanical patterns along with hormonal and cytokine deregulation. In OA, weight loss can bring clinically significant improvements in pain and delay the progression of structural joint damage. On the other hand, the coexistence of type 2 diabetes *mellitus* in patients with OA has been associated with the development and progression of the disease. Furthermore, DM is associated with a higher degree of osteoarthritic pain. Numerous risk factors are common to both DM and OA, such as, obesity, hypertension, and dyslipidemia (41). Finally, this work presents strengths and weaknesses. Of note, the identification of new therapeutic targets and signaling pathways involved in joint metabolism is essential to elucidate the mechanisms that lead to the development of OA and thus propose new molecules

that can be used as potential biomarkers for drug monitoring or early detection of the disease. The use of standardized methods for identifying miRNA target genes while conducting microarray analysis enhances the reproducibility of results. Additionally, by utilizing data from patient samples analyzed through various technologies, the study ensures a robust association of the selected miRNAs with OA. These methodological strengths support the reliability and validity of the findings, providing a solid foundation for future research. However, the study also has limitations. Results may not be generalizable due to potential variability in the samples analyzed, impacted by factors such as diet, lifestyle, environmental conditions, and genetic differences among populations. Additionally, while bioinformatics methods are consistent across reports, variations in the number of samples, platforms used, and specific analysis techniques can lead to differing outcomes. Therefore, biological validation assays are necessary to confirm the bioinformatics predictions. Furthermore, we consider that the expression of these miRNAs could be analyzed in different biological fluids, such as plasma, serum, urine, and saliva, to better support their use as potential noninvasive biomarkers for the early detection of OA.

CONCLUSIONS

miRNAs play an essential role in the pathogenesis of OA. Downregulation of miR-485/miR-142, as well as upregulation of miR-940/miR-107, affects different pathways involved in the pathogenesis of this disease, increasing the expression of enzymes that degrade the cartilage of articular chondrocytes, decreasing the production of matrix components or facilitating the apoptosis of these cells. In addition, miRNAs also participate in the production of proinflammatory cytokines and the induction of joint inflammation, and in pathways associated with OA progression. Given the critical role of miRNAs in the development of this disease, these molecules could be proposed as potential biomarkers for the early detection of OA. However, further studies are needed to validate the specificity and sensitivity of these molecules across different populations.

REFERENCES

- Safari R, Jackson J, Sheffield D. Digital self-management interventions for people with osteoarthritis: Systematic review with meta-analysis. *J Med Internet Res* 2020;22(7):e15365. DOI: 10.2196/15365
- Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2012;4(4):269-85. DOI: 10.1177/1759720X12448454
- Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest* 2008;118(2):429-38. DOI: 10.1172/JCI34174
- Jing Y, Jing J, Ye L, Liu X, Harris SE, Hinton RJ, Feng JQ. Chondrogenesis and osteogenesis are one continuous developmental and lineage defined biological process. *Sci Rep* 2017;7(1):10020. DOI: 10.1038/s41598-017-10048-z
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(1):46-62. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.06.009
- Ortega N, Behonick DJ, Werb Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 2004;14(2):86-93. DOI: 10.1016/j.tcb.2003.12.003
- Yao Q, Wu X, Tao C, Gong W, Chen M, Qu M, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):56. DOI: 10.1038/s41392-023-01330-w
- Zepeda-Quiroz I, Guzmán-Martín CA, Peña-Peña M, Juárez-Villa JD, Soto-Abraham MV, Vázquez-Toledo MA, et al. Plasma miR-150-5p in Renal Transplant Recipients with Acute Antibody-Mediated Rejection. *J Clin Med* 2024;13(6):1600. DOI: 10.3390/jcm13061600
- Alva-Partida I, Espinosa-Zavala LI, Jiménez-Ortega RF. Biogenesis de miARN y su papel como biomarcadores en la detección de la nefropatía diabética. *Rev ALAD* 2022;12(1):15-25. DOI: 10.24875/ALAD.22000003
- De-Ugarte L, Yoskovitz G, Balcells S, Güerri-Fernández R, Martínez-Díaz S, Mellibovsky L, et al. miRNA profiling of whole trabecular bone: identification of osteoporosis-related changes in miRNAs in human hip bones. *BMC Med Genomics* 2015;8:75. DOI: 10.1186/s12920-015-0149-2
- Xiao X, Yang X, Ren S, Meng C, Yang Z. Construction and analysis of a lncRNA-miRNA-mRNA competing endogenous RNA network from inflamed and normal synovial tissues after anterior cruciate ligament and/or meniscus injuries. *Front Genet* 2022;13:983020. DOI: 10.3389/fgene.2022.983020
- Cong L, Zhu Y, Tu G. A bioinformatic analysis of microRNAs role in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25(8):1362-71. DOI: 10.1016/j.joca.2017.03.012
- Lee YJ, Kim V, Muth DC, Witwer KW. Validated MicroRNA Target Databases: An Evaluation. *Drug Dev Res* 2015;76(7):389-96. DOI: 10.1002/ddr.21278
- Zhou Y, Zhao Z, Yan L, Yang J. MiR-485-3p promotes proliferation of osteoarthritis chondrocytes and inhibits apoptosis via Notch2 and the NF- κ B pathway. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2021;43(3):370-9. DOI: 10.1080/08923973.2021.1918150
- Sun P, Wu Y, Li X, Jia Y. miR-142-5p protects against osteoarthritis through competing with lncRNA XIST. *J Gene Med* 2020;22(4):e3158. DOI: 10.1002/jgm.3158
- Cao J, Liu Z, Zhang L, Li J. miR-940 regulates the inflammatory response of chondrocytes by targeting MyD88 in osteoarthritis. *Mol Cell Biochem* 2019;461(1-2):183-93. DOI: 10.1007/s11010-019-03601-z
- Qian J, Fu P, Li S, Li X, Chen Y, Lin Z. miR-107 affects cartilage matrix degradation in the pathogenesis of knee osteoarthritis by regulating caspase-1. *J Orthop Surg Res* 2021;16(1):40. DOI: 10.1186/s13018-020-02121-7
- Sun K, Luo J, Guo J, Yao X, Jing X, Guo F. The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage* 2020;28(4):400-9. DOI: 10.1016/j.joca.2020.02.027

19. Li Z, Dai A, Yang M, Chen S, Deng Z, Li L. p38MAPK Signaling Pathway in Osteoarthritis: Pathological and Therapeutic Aspects. *J Inflamm Res* 2022;15:723-34. DOI: 10.2147/JIR.S348491
20. Qin J, Shang L, Ping AS, Li J, Li XJ, Yu H, et al. TNF/TNFR signal transduction pathway-mediated anti-apoptosis and anti-inflammatory effects of sodium ferulate on IL-1 β -induced rat osteoarthritis chondrocytes in vitro. *Arthritis Res Ther* 2012;14(6):R242. DOI: 10.1186/ar4085
21. Yue J, Aobulikasimu A, Sun W, Liu S, Xie W, Sun W. Targeted regulation of FoxO1 in chondrocytes prevents age-related osteoarthritis via autophagy mechanism. *J Cell Mol Med* 2022;26(11):3075-82. DOI: 10.1111/jcmm.17319
22. Löfvall H, Newbould H, Karsdal MA, Dziejgiel MH, Richter J, Henriksen K, et al. Osteoclasts degrade bone and cartilage knee joint compartments through different resorption processes. *Arthritis Res Ther* 2018;20(1):67. DOI: 10.1186/s13075-018-1564-5
23. Yang P, Tan J, Yuan Z, Meng G, Bi L, Liu J. Expression profile of cytokines and chemokines in osteoarthritis patients: Pro-inflammatory roles for CXCL8 and CXCL11 to chondrocytes. *Int Immunopharmacol* 2016;40:16-23. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.08.005
24. Mohammed A, Alshamrri T, Adeyeye T, Lazariu V, McNutt LA, Carpenter DO. A comparison of risk factors for osteo- and rheumatoid arthritis using NHANES data. *Prev Med Rep* 2020;20:101242. DOI: 10.1016/j.pmedr.2020.101242
25. Ye Y, Zhou J. The protective activity of natural flavonoids against osteoarthritis by targeting NF- κ B signaling pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14:1117489. DOI: 10.3389/fendo.2023.1117489
26. Yi D, Yu H, Lu K, Ruan C, Ding C, Tong L, et al. AMPK Signaling in Energy Control, Cartilage Biology y Osteoarthritis. *Célula delante- ra Dev Biol* 2021;9:696602. DOI: 10.3389/fcell.2021
27. Zhong L, Lu J, Fang J, Yao L, Yu W, Gui T, et al. Csf1 from marrow adipogenic precursors is required for osteoclast formation and hematopoiesis in bone. *Elife* 2023;12:e82112. DOI: 10.7554/eLife.82112
28. Jiménez-Ortega RF, Ortega-Meléndez AI, Patiño N, Rivera-Paredes B, Hidalgo-Bravo A, Velázquez-Cruz R. The Involvement of microRNAs in Bone Remodeling Signaling Pathways and Their Role in the Development of Osteoporosis. *Biology (Basel)* 2024;13(7):505. DOI: 10.3390/biology13070505
29. Guillem-Llobat P, Marín M, Rouleau M, Silvestre A, Blin-Wakkach C, Ferrándiz ML, et al. New Insights into the Pro-Inflammatory and Osteoclastogenic Profile of Circulating Monocytes in Osteoarthritis Patients. *Int J Mol Sci* 2024;25(3):1710. DOI: 10.3390/ijms25031710
30. Boyce BF, Yamashita T, Yao Z, Zhang Q, Li F, Xing L. Roles for NF-kappaB and c-Fos in osteoclasts. *J Bone Miner Metab* 2005;23 Suppl:11-5. DOI: 10.1007/BF03026317
31. Meszaros EC, Dahoud W, Mesiano S, Malesud CJ. Blockade of recombinant human IL-6 by tocilizumab suppresses matrix metalloproteinase-9 production in the C28/I2 immortalized human chondrocyte cell line. *Integr Mol Med* 2015;2(5):304-10. DOI: 10.15761/IMM.1000158
32. Akesson G, Malesud CJ. A Role for Soluble IL-6 Receptor in Osteoarthritis. *J Funct Morphol Kinesiol* 2017;2(3):27. DOI: 10.3390/jfkm2030027
33. Nandi S, Chennappan S, Andrasch Y, Fidan M, Engler M, Ahmad M, et al. Increased osteoclastogenesis contributes to bone loss in the Costello syndrome *Hras G12V* mouse model. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:1000575. DOI: 10.3389/fcell.2022.1000575
34. Vasheghani F, Zhang Y, Li YH, Blati M, Fahmi H, Lussier B, et al. PPAR γ deficiency results in severe, accelerated osteoarthritis associated with aberrant mTOR signalling in the articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 2015;74(3):569-78. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-205743
35. Maumus M, Manferdini C, Toupet K, Chuchana P, Casteilla L, Gachet M, et al. Thrombospondin-1 Partly Mediates the Cartilage Protective Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis. *Front Immunol* 2017;8:1638. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01638
36. Chisari E, Yaghmour KM, Khan WS. The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies. *Osteoarthritis Cartilage* 2020;28(5):708-18. DOI: 10.1016/j.joca.2019.09.008
37. Ma KS, Lai JN, Thota E, Yip HT, Chin NC, Wei JC, et al. Bidirectional Relationship Between Osteoarthritis and Periodontitis: A Population-Based Cohort Study Over a 15-year Follow-Up. *Front Immunol* 2022;13:909783. DOI: 10.3389/fimmu.2022.909783
38. Geusens PP, van den Bergh JP. Osteoporosis and osteoarthritis: shared mechanisms and epidemiology. *Curr Opin Rheumatol* 2016;28(2):97-103. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000256
39. Molina-Rios S, Ordoñez E, Quintana-López G. Osteoarticular manifestations of systemic sclerosis: a systematic review of the literature. *Rev Colomb Reumatol* 2020;27(S1):85-110. DOI:10.1016/j.rcreu.2019.11.006
40. Bedeković D, Kirner D, Bošnjak I, Kibel A, Šarić S, Novak S, et al. The Influence of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis on the Occurrence of Arterial Hypertension: An 8-Year Prospective Clinical Observational Cohort Study. *J Clin Med* 2023;12(22):7158. DOI:10.3390/jcm12227158
41. King LK, March L, Anandacoomarasamy A. Obesity & Osteoarthritis. *Indian J Med Res* 2013;138(2):185-93.

Original

Las vesículas extracelulares circulantes modifican la diferenciación de células estromales mesenquimales y angiogénesis. Potencial uso en regeneración ósea

Sara Oliva-Lozano¹, Victoria Pulido-Escribano¹, Bárbara Torrecillas-Baena¹, Alfonso Calañas-Continente^{1,2}, Feliciano Priego-Capote^{3,4}, Marta Camacho-Cardenosa¹, Antonio Casado-Díaz^{1,2,4}

¹Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Córdoba. ²Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. ³Departamento de Química Analítica. Campus Rabanales. Universidad de Córdoba. Córdoba. ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Córdoba

Resumen

Introducción: el uso de vesículas extracelulares (VE) tiene un alto potencial en medicina regenerativa. Aunque principalmente se han estudiado las derivadas de células estromales mesenquimales (MSC), las VE circulantes de sangre de cordón umbilical (veCU) o de adultos jóvenes sanos (veAD), también contienen factores que pueden favorecer la regeneración tisular. Este estudio evalúa el efecto de veCU y veAD sobre la diferenciación de MSC a osteoblastos y adipocitos, y la angiogénesis de células endoteliales.

Material y métodos: las VE fueron aisladas por cromatografía de exclusión de tamaño, caracterizadas y cuantificadas. Cultivos de MSC fueron tratados con veCU y veAD durante la diferenciación a osteoblastos o adipocitos. En ellas se estudió la expresión de genes osteoblásticos o adipogénicos, la mineralización y la formación de vesículas de grasa. Fueron evaluadas células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) en ensayos de angiogénesis.

Resultados: VeCU y veAD no afectaron a la viabilidad de las MSC, pero veAD aumentó la de HUVEC. En osteoblastos, aumentó la expresión de colágeno alfa-1 tipo I (COL1A1) con veAD, pero la mineralización no se afectó. En adipocitos se inhibió la expresión de adipo-triglicérido-lipasa (ATGL) y la proteína 4 de unión a ácido graso (FABP4), y disminuyó la formación de vesículas de grasa con ambos tipos de VE. En HUVEC, veCU y veAD indujeron la angiogénesis.

Conclusión: los resultados sugieren que ambos tipos de VE, procedentes de fuentes abundantes, sin aspectos éticos importantes y fáciles de aislar, tienen un alto potencial en medicina regenerativa aplicada al hueso, inhibiendo la adiposidad de la médula ósea y favoreciendo la angiogénesis.

Palabras clave:

Células estromales mesenquimales.
Adipocitos.
Osteoblastos.
Vesículas extracelulares circulantes.
Exosomas.
Angiogénesis.

Recibido: 01/11/2024 • Aceptado: 09/02/2025

Sara Oliva-Lozano y Victoria Pulido-Escribano han contribuido de igual modo.

Marta Camacho-Cardenosa y Antonio Casado-Díaz son los autores de correspondencia de este artículo.

Financiación: esta investigación ha sido financiada por el CIBER "Fragilidad y Envejecimiento Saludable" (CIBERFES, CB16/10/00501) y el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, PI21/01935), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), España, y la Unión Europea (UE).

Aspectos éticos: este estudio ha sido desarrollado cumpliendo con la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio.

Agradecimientos: beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2022.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Oliva-Lozano S, Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Calañas-Continente A, Priego-Capote F, Camacho-Cardenosa M, Casado-Díaz A. Las vesículas extracelulares circulantes modifican la diferenciación de células estromales mesenquimales y angiogénesis. Potencial uso en regeneración ósea. Rev Osteoporos Metab Miner 2025;17(1):19-30

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00066

Correspondencia:

Antonio Casado-Díaz. Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Reina Sofía. Edificio IMIBIC. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba
e-mail: bb1cadia@uco.es

INTRODUCCIÓN

El sistema óseo depende de un equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea. Cuando este equilibrio se ve interrumpido por un traumatismo en forma de fractura ósea, este tejido tiene la capacidad de autorrenovación (1). En este proceso de cicatrización, intervienen distintos tipos celulares, matrices extracelulares y moléculas de señalización (2), a lo largo de las tres principales fases que tienen lugar: fase de inflamación, fase reparativa y fase de remodelado. En la fase reparativa, las células osteoprogenitoras y las células mesenquimales indiferenciadas son inducidas a diferenciarse a osteoblastos, en lugar de a otros tipos celulares, como los adipocitos (3). Además, en el proceso regenerativo es fundamental la formación de nuevos vasos sanguíneos que aporten el oxígeno y nutrientes necesarios para la formación ósea (2). Sin embargo, en algunos casos, pueden producirse retrasos en la cicatrización, fracturas no consolidadas o enfermedades óseas (osteoporosis, osteonecrosis o cáncer). Las cuales, presentan una morbilidad significativa y merman sustancialmente la actividad y calidad de vida de los pacientes que las sufren. Por ello, es necesario nuevas estrategias terapéuticas que puedan reducir la inmovilización prolongada o las intervenciones quirúrgicas repetidas. Estas podrían además suponer un coste significativo para los sistemas sanitarios y la sociedad (4).

Recientes avances en la ingeniería de tejidos han propuesto la combinación de diferentes tipos celulares con biomateriales sintéticos, como alternativa a los injertos óseos. Concretamente, las células madre estromales mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea, han sido propuestas para tratar diversas patologías, debido a su capacidad de diferenciación, regenerativa e inmunomoduladora (5). Sin embargo, aunque pueden obtenerse de terceros donantes, la posibilidad de la persistencia de las MSC implantadas en los pacientes receptores o la formación de tejidos ectópicos han frenado su aplicación para la curación de lesiones óseas (6). Además, entre otras limitaciones para su aplicación se encuentran la dificultad para mantener una potencia y viabilidad óptima durante la expansión celular, y la forma de administración al paciente (7). Estudios recientes han revelado que el potencial de las MSC en la regeneración tisular está ligado a su actividad paracrina, la cual, depende en parte, de las vesículas extracelulares (VE) derivadas del secretoma. Así, se ha propuesto el uso de estas VE en medicina regenerativa como una estrategia terapéutica libre de células (8).

Las VE tienen una función de comunicación intercelular y contienen gran variedad de moléculas biológicamente activas, como proteínas, lípidos y distintos tipos de ácidos nucleicos que pueden ser relevantes en la respuesta inflamatoria y en la regeneración tisular a través de señales que se transmiten a células receptoras (9). En función de su tamaño, las VE pueden ser

clasificadas como microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos. Concretamente, los exosomas, oscilan entre 40 y 100 nm, tienen un origen endosomal y son liberados por exocitosis de cuerpos multivesiculares a través de membranas plasmáticas (7). Así, pueden ser administrados por vía intravenosa y circular a través de fluidos corporales, como la sangre, la orina o la saliva (10). Estos exosomas parecen transmitir los efectos terapéuticos de la célula de origen, a la vez que solventan las limitaciones propias del uso de células en medicina regenerativa (7,9). Pueden ser aislados de múltiples fluidos corporales como semen, sangre, orina, saliva, leche materna, líquido amniótico, ascítico o cefalorraquídeo y bilis (11). El contenido de estas VE circulantes depende del estado del organismo, por lo que son una fuente de biomarcadores y de factores que pueden ser utilizados incluso para aplicaciones terapéuticas, como alternativa a la VE derivadas de MSC. Efectivamente, la utilización de VE de MSC supone la manipulación de cultivos celulares *in vitro*, lo cual puede provocar pérdida de propiedades de las MSC e inestabilidad genética al efectuarse fuera de su nicho natural (12). Esto puede ser evitado en parte mediante líneas estables e inmortalizadas de MSC obtenidas por manipulación genética, induciendo por ejemplo la expresión de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT). Este procedimiento ha producido MSC con una alta capacidad de proliferación y expansión, manteniendo sus propiedades inmunomoduladoras, de diferenciación y regenerativas (13,14). Aunque diversos estudios en animales han mostrado que con el tiempo MSC inmortalizadas no se transforman en células tumorales y por lo tanto concluyen que pueden ser consideradas como seguras para su posible uso clínico, estos estudios tienen ciertas limitaciones. Entre ellas se encuentran la falta de ensayos clínicos y el desconocimiento aún sobre si las MSC inmortalizadas pueden acumular mutaciones no deseadas tras largos periodos de expansión. Por ello, se ha sugerido que el uso de estas células, tanto en terapia celular como en terapia libre de células basada en el uso de VE, debe estar sujeto a controles estrictos durante su cultivo (15). Esto aumenta la complejidad del procedimiento debido a la necesidad de mantener las líneas de MSC estables y el diseño de biorreactores para la producción a gran escala de VE. Por ello es interesante estudiar otras fuentes alternativas de VE con capacidad regenerativa, entre las que se encuentran las VE circulantes en sangre, las cuales pueden ser obtenidas sin necesidad de expandir y mantener células en cultivo (16). Además, la cantidad de VE obtenidas en plasma, puede ser entre 10 y más de 100 veces superior a la obtenida a partir de cultivos celulares (17). Una posible fuente es la sangre de cordón umbilical. La cual tiene una composición similar a la de la médula ósea en adultos, pero a diferencia de esta, también contiene una serie de células inmunosupresoras, que le permite reducir los niveles de citoquinas inflamatorias (18). En humanos se ha observado que las VE derivadas de sangre de cordón umbilical (veCU), en relación con las de san-

gre periférica de adultos (veAD), poseen una mayor expresión de miRNA involucrados en el embarazo, la supresión de la leucemia, la inhibición de la inflamación, la movilidad celular y el desarrollo del sistema nervioso, además de factores relacionados con el desarrollo embrionario (19,20), lo que sugiere un alto potencial regenerativo. En cuanto a las veAD, diversos estudios han mostrado su potencial terapéutico para el tratamiento de procesos isquémicos y cicatrización de heridas (21). Así, el objetivo del presente estudio ha sido evaluar los potenciales efectos veCU y veAD sobre la angiogénesis de células endoteliales y la diferenciación osteoblástica y adipogénica de MSC.

MATERIAL Y MÉTODOS

EXTRACCIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PLASMA SANGUÍNEO

Tras firma de consentimiento informado, mujeres sanas, sin patologías crónicas y en edad adulta (entre 26 y 31 años) fueron sometidas a una única extracción de sangre. La sangre de cordón umbilical fue donada por madres que cumplían los mismos criterios de inclusión que las adultas sanas, y del mismo modo, firmaron su consentimiento de participación.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm 10 minutos para la obtención del plasma. Un mililitro de plasma se pasó por columnas de cromatografías de exclusión de tamaño *PURE-EVs* (HansaBioMed Life Sciences Ltd.) utilizando disolución salina tamponada con fosfato (PBS) como vehículo. Los 3 mililitros en los que eluyeron las VE se concentraron mediante ultrafiltración con concentradores de 10 MWCO (Vivaspin 6 centrifugal concentrator, Sartorius) hasta un volumen de 300-350 μ l que se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La concentración y tamaño de los exosomas obtenidos de cada muestra se determinaron con un analizador de seguimiento de nanopartículas (Nanosight NS300) basado en la tecnología "Nanoparticle Tracking Analysis" (NTA) en el Instituto Universitario de Nanoquímica (IUNAN) de la Universidad de Córdoba.

CARACTERIZACIÓN DE LAS VE MEDIANTE WESTERN BLOT

Las VE se caracterizaron mediante *Western blot*. Para ello, 10 μ g de cada muestra fueron cargados en un gel de acrilamida 8-16 % (nUView Tris-Glycine Precast Gels, NuSeP) en condiciones desnaturalizantes y separados por electroforesis usando el sistema "Mini-Protean" (Bio-Rad). Tras ello, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilidina (PVDF) (Bio-Rad) mediante *Trans-Blot Tranfer System* (Bio-Rad). La membrana fue bloqueada con una solución al 5 % de

leche desnatada en polvo en tampón TTBS (20 nM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween) durante 1 h a temperatura ambiente y se incubó a 4 °C durante toda la noche, con los anticuerpos primarios anti-CD81 (25kDa, 1:500; ref.: 10630D), CD9 (25kDa, 1:1000; ref.: 10626D) y anti-CD63 (30-60 kDa, 1:1000; ref.: 10628D), todos ellos en 1 % en leche con TTBS. Tras ello, se lavó con TTBS y se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario anti-mouse (1:4000; ref.: 32430), en 2 % de leche con TTBS. Todos los anticuerpos utilizados fueron de Invitrogen, ThermoFisher Scientific. La detección se realizó utilizando el sustrato quimioluminiscente *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) y las imágenes se adquirieron con el sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) mediante el software Image Lab 6.1 del mismo fabricante.

CULTIVOS CELULARES DE MSC Y HUVEC

Las MSC utilizadas se aislaron a partir de células mononucleares criopreservadas comerciales (Stemcell Technologies, Colonia, Alemania) según el protocolo descrito previamente por nuestro grupo (22). Fueron expandidas en medio esencial mínimo alfa (α MEM) de Biowest (Nuaille, Francia), que contenía 2 mM de ultraglutamina (Biowest), 10 % de suero bovino fetal (FBS; Gibco-Thermo Fisher Scientific), 100 U de penicilina, 0,1 mg de estreptomina/ml y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.). Las células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) de Lonza (Basilea, Suiza) fueron crecidas en medio basal endotelial (EBM), con suplementos y factores de crecimiento, conocido como medio de crecimiento endotelial (EGM) de Lonza. Este contenía 10 % de FBS, hidrocortisona, gentamicina, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y extracto de cerebro bovino.

Tanto los cultivos de MSC como de HUVEC se incubaron a 37 °C con 95 % de humedad y 5 % de CO₂. Cuando alcanzaron el 90 % de confluencia, las células fueron levantadas con tripsina-EDTA (Gibco) y sembradas en placas de cultivo (Nalgene-Nunc-Thermo Fisher Scientific) de 12 (P12), 24 (P24) o 96 pocillos (P96) para los diferentes experimentos.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich). Las MSC y HUVEC se sembraron en P96, a una densidad de 4000 y 8000 células por pocillo, respectivamente, en el medio de cultivo correspondiente a cada tipo celular, según lo descrito en el apartado anterior. Tras 24 horas, el medio se sustituyó por medio con FBS libre de exosomas, suplementado con distintas concentraciones de veCU o veAD (10 \times 10⁶, 20 \times 10⁶, 40 \times 10⁶, 80 \times 10⁶ y 160 \times 10⁶ partículas/ml). Después de 72 h, se retiró el medio y se

añadieron 50 µl/pocillo de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin rojo fenol suplementado con 1 mg de MTT/ml (ambos de Sigma-Aldrich). Después de 2 h de incubación, el medio fue retirado y, los cristales de formazán producidos, disueltos en isopropanol. En la solución resultante, se midió la absorbancia a 570 nm, utilizando la absorbancia a 650 nm como referencia, con un espectrofotómetro de microplacas PowerWave XS de BioTek Instruments (Winooski, VT, EE. UU.).

ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

La migración se estudió mediante el ensayo *Scratch* en P24. En cultivos en confluencia, se generó una zona libre de células utilizando la punta de una pipeta P200, y se adicionaron al medio distintas concentraciones de veCU o de veAD (10×10^6 y 160×10^6 partículas/ml). Los cultivos se mantuvieron hasta 24 h, obteniendo imágenes a distintos tiempos a través de un *IncuCyte Zoom Imain System, Sartorius*. Imágenes a 18 y 15 h de migración para MSC y HUVEC, respectivamente, fueron analizadas con el software ImageJ V1.53f51 (NIH; Bethesda, MD, USA). Los tiempos fueron seleccionados debido a que en tiempos posteriores la zona libre de células había sido totalmente ocupada por las células, lo que impedía identificar diferencias entre tratamientos. La migración se cuantificó en relación al porcentaje del área inicial no ocupada por las células.

DIFERENCIACIÓN DE MSC A OSTEÓBLASTOS Y ADIPOCITOS

En cultivos de MSC al 60-80 % de confluencia, se indujo la diferenciación a osteoblastos o adipocitos. La diferenciación osteoblástica se mantuvo durante 21 días en medio suplementado con 10 nM de dexametasona, 0,2 mM de ácido ascórbico y 10 mM de β-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich), en presencia o ausencia de las distintas concentraciones de VE evaluadas (10×10^6 y 160×10^6 partículas/ml). Por otro lado, la diferenciación hacia adipocitos fue inducida con 500 nM de dexametasona, 0,5 mM de isobutimetilxantina y 50 µM de indometacina (todos de Sigma-Aldrich), manteniéndose durante 14 días, en presencia o ausencia de las distintas concentraciones de VE.

TINCIONES CITOQUÍMICAS

La tinción con rojo de alizarina a los 21 días de la diferenciación osteoblástica se utilizó para la visualización y cuantificación de la mineralización de la matriz extracelular. Cultivos en P12 se fijaron con formaldehído al 3,7 % durante 10 min y posteriormente fueron teñidos con 40 mM de rojo de alizarina en agua, pH 4,15 (Sigma-Aldrich) durante 10 min. A continuación, los pocillos se lavaron varias veces con isopropanol al 60 %, se secaron y se visualizaron con microscopio óp-

tico. Las mediciones de depósitos de rojo de alizarina se llevaron a cabo después de la elución con ácido acético al 10 %, la neutralización con hidróxido de amonio al 10 % y la cuantificación por espectrofotometría a 405 nm de absorbancia de la solución resultante.

La formación de vesícula de grasa en los cultivos inducidos a diferenciarse en adipocitos se evaluó mediante tinción *Oil Red O*. Para ello, las células se fijaron con formaldehído 3,7 % durante 15 min, se lavaron con 60 % de isopropanol en agua y se tiñeron durante 15-20 min con una solución del 0,3 % de *Oil Red O* (peso/volumen) en 60 % de isopropanol. A continuación, las células se lavaron dos veces en agua destilada, se tiñeron con hematoxilina y se tomaron imágenes, al menos nueve por pocillo, con un microscopio óptico. La tinción de las vesículas de grasa fue cuantificada con el software ImageJ (NIH) y los valores fueron normalizados con el número de células por imagen. La acumulación de lípidos en los cultivos se expresó como: (área teñida con *Oil Red O* / n.º de células).

AISLAMIENTO DE ARN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Se tomaron muestras para el aislamiento de ARN y el posterior análisis de genes marcadores de la adipogénesis y osteoblastogénesis, de cultivos de MSC, a los 10 días de ser inducidas a diferenciarse a osteoblastos o adipocitos. El ARN se aisló siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el kit *NZY total RNA isolation* (NZYTech, Lisboa, Portugal) y cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). A continuación, 900 ng se retrotranscribieron con el kit de síntesis de ADNc iScript de Bio-Rad (Hercules, CA, EE. UU.). Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se llevaron a cabo en un CFX96 Connect (Bio-Rad). Cada reacción contenía 1 µL de ADNc, 10 pmol de cada par de cebadores (Tabla I) y SensiFAST Sybr No-Rox Mix de Bioline (Londres, Reino Unido). El programa de amplificación de PCR incluyó un ciclo a 95 °C durante 2 min (desnaturalización del ADN y activación de la ADN polimerasa) y 44 ciclos de amplificación: 95 °C durante 5 s (desnaturalización del ADN) y 65 °C durante 30 s (hibridación y extensión). Los resultados se analizaron con el software CFX Maestro V 2.3. (Bio-Rad) para la obtención de los ciclos umbrales (Ct) Como gen constitutivo se utilizó el gen codificante de la RNA polimerasa II subunidad A (POLR2A) y la expresión relativa respecto a las muestras control se expresaron como unidades arbitrarias calculadas a través del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (muestra) - ΔCt (muestra control); y ΔCt (muestra) = Ct (muestra gen interes) - Ct (muestra gen constitutivo) y ΔCt (muestra control) = Ct (muestra control gen interes) - Ct (muestra control gen constitutivo).

Tabla I. Cebadores utilizados para QRT-PCR

Gen	Secuencia (5'-->3)	Producto (pb)
Polymerase (RNA; DNA directed) II polypeptide A (POLR2A)	TTTTGGTGACGACTTGAAGTGC CCATCTGTCCACCACCTCTTC	125
Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)	TGGTTAATCTCCGAGGTCAC ACTGTGCTGAAGAGGCTGTTG	143
Osterix (SP7)	AGCCAGAAGCTGTGAAACCTC AGCTGCAAGCTCTCCATAACC	163
Integrin-binding sialoprotein (IBSP)	AGGGCAGTAGTACTCATCCG CGTCCTCTCCATAGCCCAGTGTG	171
Collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)	CGCTGGCCCCAAAGGATCTCTG GGGTCCGGGAACACCTCGCTC	263
Peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 (PPARG2)	GCGATTCCTCACTGATACTG GAGTGGGAGTGGTCTCCATTAC	136
Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2 (ATGL)	CCAACACCAGCATCCAGTTCA ATCCCTGCTGCACATCTCTC	102
Lipoprotein lipase (LPL)	AAGAAGCAGCAAATGTACCTGAAG CCTGATTGGTATGGGTTTCACTC	113
Fatty-acid-binding protein 4 (FABP4)	TCAGTGTGAATGGGGATGTGAT TCTGCACATGTACCAGGACACC	162

ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS EN HUVEC

Con el objetivo de evaluar el efecto de las veCU y veAD sobre la angiogénesis en HUVEC, se realizó un ensayo de formación de estructuras tubulares en matrigel. Células HUVEC fueron pretratadas durante 24h con distintas concentraciones de veCU o veAD (10×10^6 y 160×10^6 partículas/ml) en medio EGM + 10 % FBS sin exosomas. Para el ensayo de angiogénesis, 10 μ l de Matrigel reducido en factores de crecimiento (Corning, NY, EE. UU.) a 4 °C fue añadido a microplacas P96 de Greiner Bio-One (Kremsmunster, Austria), dejándose gelificar a temperatura ambiente. A continuación, de cada cultivo de HUVEC pretratado con las distintas VE, se añadieron 15 000 células por pocillo, resuspendidas en 70 μ l de EBM + 2 % FBS sin exosomas, suplementado con el tipo y concentración de VE correspondiente. Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 4 h a 37 °C y 5 % CO₂. Tras este periodo de tiempo, se tomaron imágenes al microscopio óptico que se analizaron con la extensión *Angiogenesis Analyzer* del software ImageJ. Como control negativo de angiogénesis, se utilizaron cultivos mantenidos en medio de cultivo sin suplementar con VE y, como control positivo, el medio fue suplementado con 30 ng/ml del inductor angiogénico factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se muestran como la media más el error estándar de la media (media \pm SEM). En todos los

experimentos el número de replicados para cada parámetro estudiado fue de al menos 3. La comparación entre los distintos tratamientos se realizó mediante la prueba ANOVA para detectar cambios significativos, seguida de una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre pares de tratamientos. Se han considerado cambios significativos para $p < 0,05$.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LAS VE CIRCULANTES DEL PLASMA SANGUÍNEO DE CORDÓN UMBILICAL O DE ADULTOS

El análisis del tamaño de las veCU y veAD por *Nanoparticle Tracking Analysis* muestra que la mayoría de las VE obtenidas tienen un diámetro comprendido entre 50 y 150 nm (Figs. 1 A y B). La concentración de partículas por ml de plasma de cordón umbilical estuvo comprendida entre $0,7 \times 10^{11}$ y $1,3 \times 10^{11}$, y la de plasma de sangre de adulto entre $3,2 \times 10^{11}$ y 1.1×10^{12} . Por otro lado, la caracterización de la expresión proteica de los marcadores CD81, CD9 y CD63, mediante *Western blot* indicó que, ambos tipos de VE, expresan dichos marcadores (Fig. 1C). Estos resultados muestran cómo tras el procesamiento de las muestras de plasma de sangre de cordón umbilical o de adulto, se obtuvieron VE circulantes.

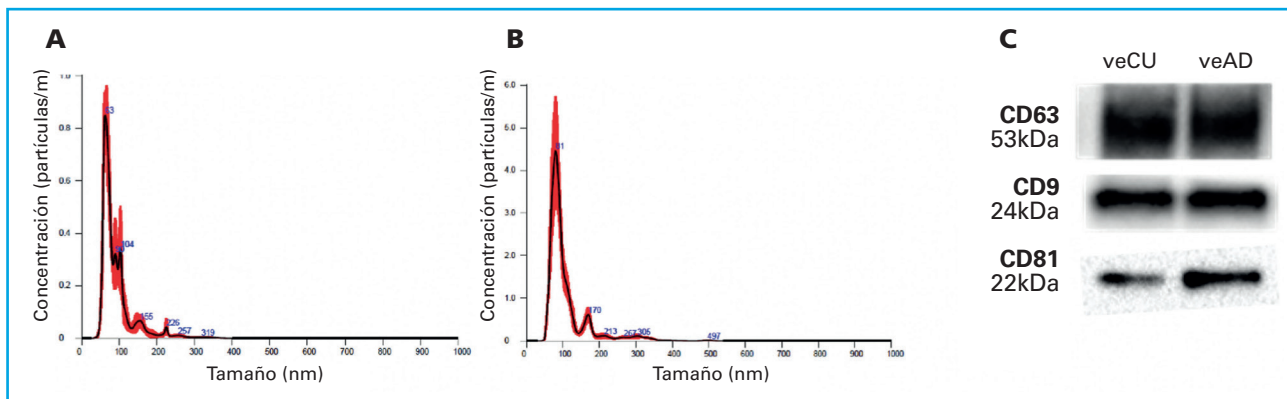


Figura 1. Cuantificación y caracterización de los exosomas circulantes aislados de plasma de sangre de cordón umbilical (veCU) o de sangre periférica de adultos sanos (veAD). A y B. Muestran el análisis mediante de la distribución del tamaño de las partículas obtenidas de veCU y veAD, respectivamente. C. Muestra la expresión proteica mediante *Western blot* de los marcadores de VE CD63, CD9 y CD81, en veCU y veAD.

EFEECTO DE LAS veCU Y veAD SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE MSC Y HUVEC

Para evaluar el efecto de veCU y veAD, en la viabilidad celular de cultivos de MSC, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de VE (10×10^6 , 20×10^6 , 40×10^6 , 80×10^6 y 160×10^6 partículas/ml) durante 48 h. Los resultados mostraron que la viabilidad no se vio afectada significativamente con ninguna de las dosis y tipo de VE (Fig. 2A). En base a estos resultados, en cultivos de HUVEC, se evaluó el efecto de la menor y mayor concentración de VE utilizadas en el estudio sobre la viabilidad en MSC (10×10^6 y 160×10^6 partículas/ml). En este caso, se observó un aumento significativo de la viabilidad cuando las células fueron tratadas con la concentración más pequeña (10×10^6) de partículas/ml de veAD (Fig. 2B).

EFEECTO DE LAS veCU Y veAD SOBRE LA MIGRACIÓN DE MSC Y HUVEC

En el ensayo de migración celular, la presencia de 10×10^6 o 160×10^6 partículas/ml de ambos tipos de VE (veCU y veAD), disminuyeron la migración en cultivos de MSC y de HUVEC, tras 18 h o 15 h, respectivamente (Fig. 3). La disminución tendió a ser mayor en presencia de veAD (Fig. 3).

EFEECTO DE LAS veCU Y veAD SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE MSC

Diferenciación osteogénica

Los resultados de mineralización de la matriz extracelular después de 21 días de diferenciación osteogénica en las MSC inducidas a diferenciarse a osteoblastos en presencia de distintas concentraciones de

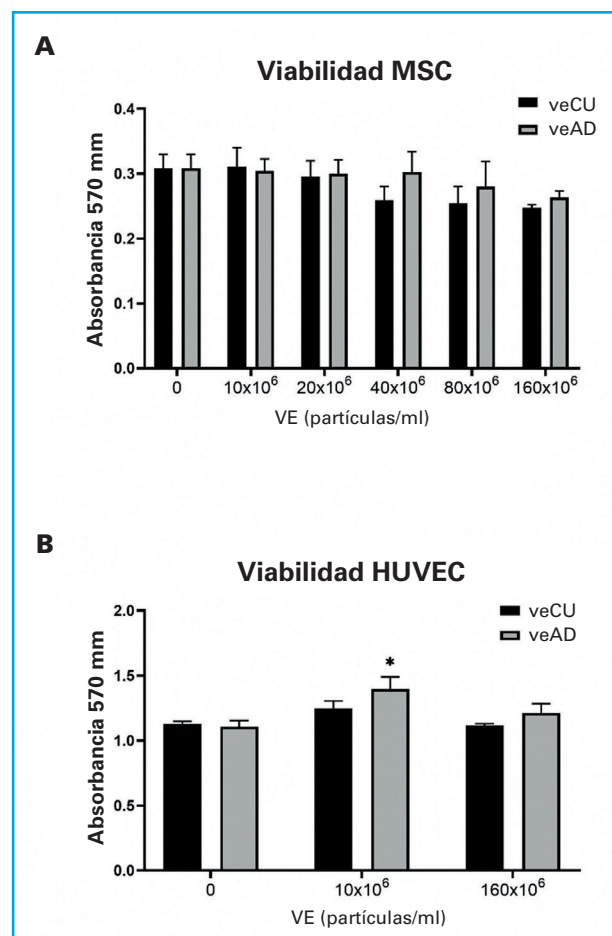


Figura 2. Cuantificación de la viabilidad celular en MSC (A) y en HUVEC (B) tratadas durante 72 horas con distintas concentraciones de veCU o veAD circulantes. * $p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control).

veCU y veAD, muestran que ninguna de las concentraciones utilizadas afectó a dicha mineralización (Figs. 4 A y B).

A los 10 días de diferenciación osteoblástica, también se estudió en estos cultivos la expresión de genes marcadores osteoblásticos como el *factor de transcripción 2 relacionado con runt* (RUNX2) y *osterix* (SP7), codificantes de dos factores de transcripción responsables de la diferenciación osteogénica, e sialoproteína de unión a integrina (IBSP) y colágeno alfa-1, tipo I (COL1A1), codificantes de proteínas de la matriz extracelular. Los resultados mostrados en la figura 4C indican que, al igual que en la mineralización, el tratamiento con los distintos tipos de VE no produjo cambios significativos en la expresión de estos genes osteoblásticos. Tan solo, en la expresión de COL1A1 se observó un aumento en los cultivos tratados con la mayor concentración de VE (Fig. 4C).

Diferenciación adipogénica

En MSC diferenciados a adipocitos, los resultados del análisis de la tinción *Oil Red O* mostró que la pre-

sencia de veCU o de veAD en el medio adipogénico, disminuyó la formación de vesículas de grasa respecto a los cultivos no tratados (Fig. 5B). En cuanto a la expresión del gen codificante del principal factor de transcripción responsable de la diferenciación adipogénica, el receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma 2 (PPARG2), no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos a los 10 días de diferenciación adipogénica. Cambios fueron observados en la expresión de genes involucrados en el metabolismo grasos, como adipo-triglicérido-lipasa (ATGL) y la proteína 4 de unión a ácido graso (FABP4). Los niveles de ARNm de ATGL disminuyeron en los cultivos tratados con 160×10^6 partículas/ml de veCU y la expresión génica de FABP4 fue inhibida con las dos concentraciones usadas de veAD (Fig. 5C). La disminución de la expresión de los genes ATGL y FABP4 pueden ser relacionados con la disminución de la formación de vesículas de grasa y con distintos mecanismos de acción de las veCU y veAD sobre los cultivos de MSC diferenciados a adipocitos.

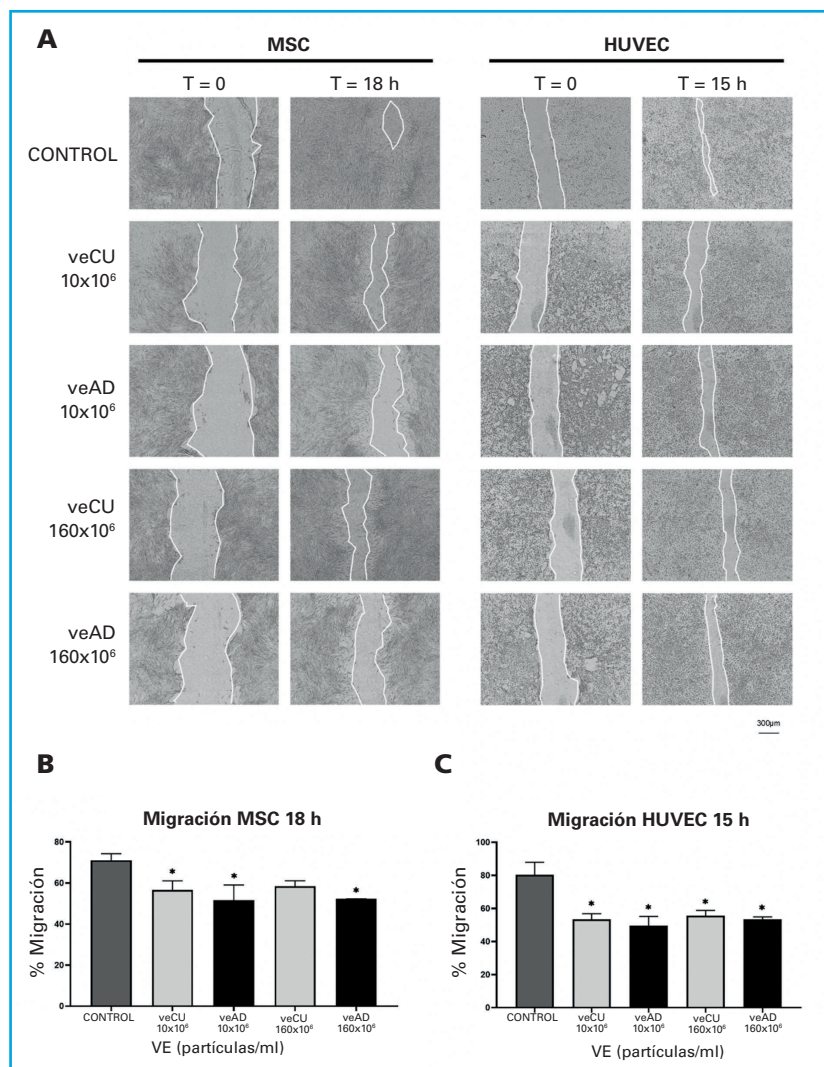


Figura 3. Efecto de veCU y veAD en la migración celular. A. Imágenes representativas de cultivos de MSC o HUVEC, en el tiempo 0 de haber realizado una línea libre de células en la placa, y a las 18 o 15 h de cultivo, respectivamente, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de veCU o veAD. B. Cuantificación del porcentaje del área de migración en MSC a las 18 h de tratamiento. C. Igual que en B, a las 15 h con HUVEC. * $p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control).

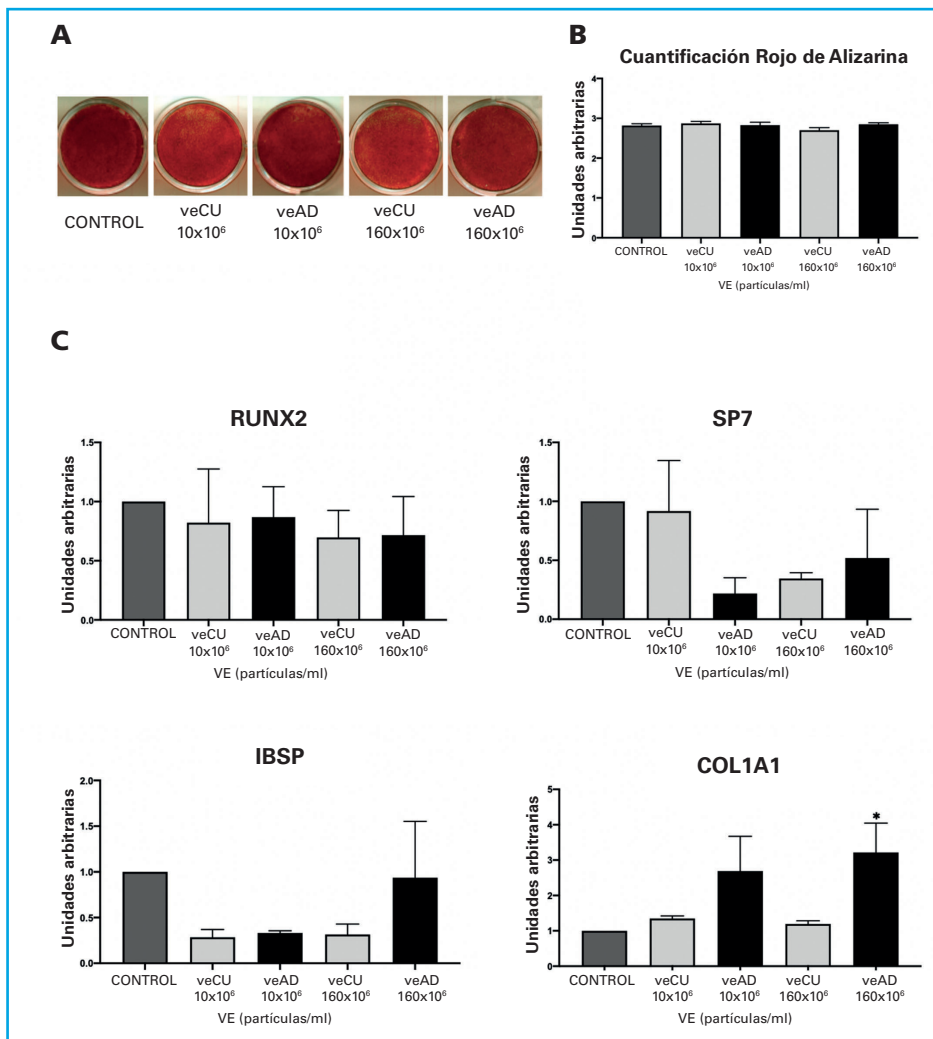


Figura 4. Estudio de la capacidad de diferenciación osteoblástica de MSC tratadas con diferentes concentraciones de veCU y veAD. A. Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina para la mineralización de la matriz extracelular, de cultivos de MSC inducidos a osteoblastos y tratados con distintas concentraciones de veCU o veAD durante 21 días. B. Cuantificación de la tinción con rojo de alizarina. C. Expresión génica de genes marcadores osteoblásticos (RUNX2, SP7, IBSP y COL1A1), de cultivos de MSC tratadas con veCU o veAD, a los 10 días de la inducción a diferenciarse a osteoblastos. * $p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control).

ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS veCU Y veAD SOBRE LA ANGIOGÉNESIS

Los resultados de la cuantificación de la longitud total de segmentos y la de estructuras tubulares indican que todos los tratamientos con VE aumentaron la angiogénesis respecto a la HUVEC no tratadas (Control -). Este aumento fue más significativo con los tratamientos con veCU (Figs. 6 B y C).

DISCUSIÓN

La medicina regenerativa aplicada al hueso tiene un gran potencial para el tratamiento de patologías como la osteoporosis, la artrosis, la osteonecrosis y las fracturas traumáticas. Aunque la terapia celular ha sido ampliamente evaluada en la regeneración ósea con resultados prometedores (23), actualmente se considera que el uso de VE derivadas de MSC como herramienta terapéutica libre de células, puede evitar los inconvenientes de la producción e implantación de cé-

lulas progenitoras con fines terapéuticos en hueso (7). Sin embargo, la obtención de VE derivadas de MSC, incluso de líneas celulares inmortalizadas, supone el establecimiento y mantenimiento de cultivos celulares estables. Lo cual, aumenta la complejidad de su aislamiento y requiere de instalaciones adecuadas para su uso clínico. Por lo tanto, es conveniente evaluar la posible capacidad terapéutica de otras fuentes de VE que cumplan que sean fácil de acceder, abundantes y su obtención no presente aspectos éticos importantes.

Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de VE derivadas de sangre de cordón umbilical y de personas adultas sanas, sobre procesos relacionados con la regeneración ósea, como la angiogénesis de células endoteliales y la diferenciación osteoblástica y adipogénica de MSC derivadas de médula ósea.

Nuestros resultados han mostrado que ambos tipos de VE no afectan significativamente a la diferenciación osteogénica, pero disminuyen la adipogénesis en MSC y aumentan la angiogénesis de HUVEC.

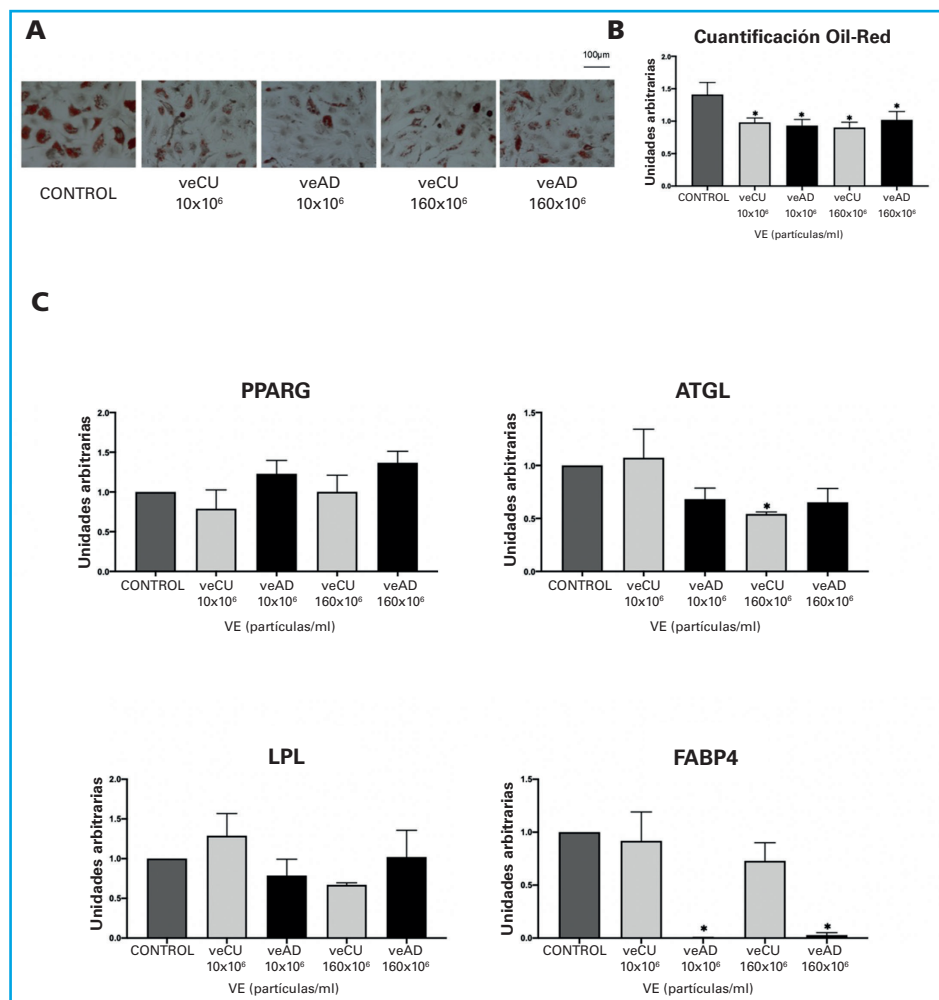


Figura 5. Estudio de la capacidad de diferenciación adipogénica de MSC tratadas con diferentes concentraciones de de veCU y veAD. A. Imágenes representativas de la tinción con "Oil Red O" de vesículas de grasa, de cultivos de MSC inducidos a adipocitos y tratados con distintas concentraciones de veCU o veAD durante 14 días. B. Cuantificación de la tinción "Oil Red O". C. Expresión génica de genes marcadores adipogénicos (PPARG, ATGL, LPL y FABP4), de cultivos de MSC tratadas con veCU o veAD, a los 10 días de la inducción a diferenciarse a adipocitos. * $p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control).

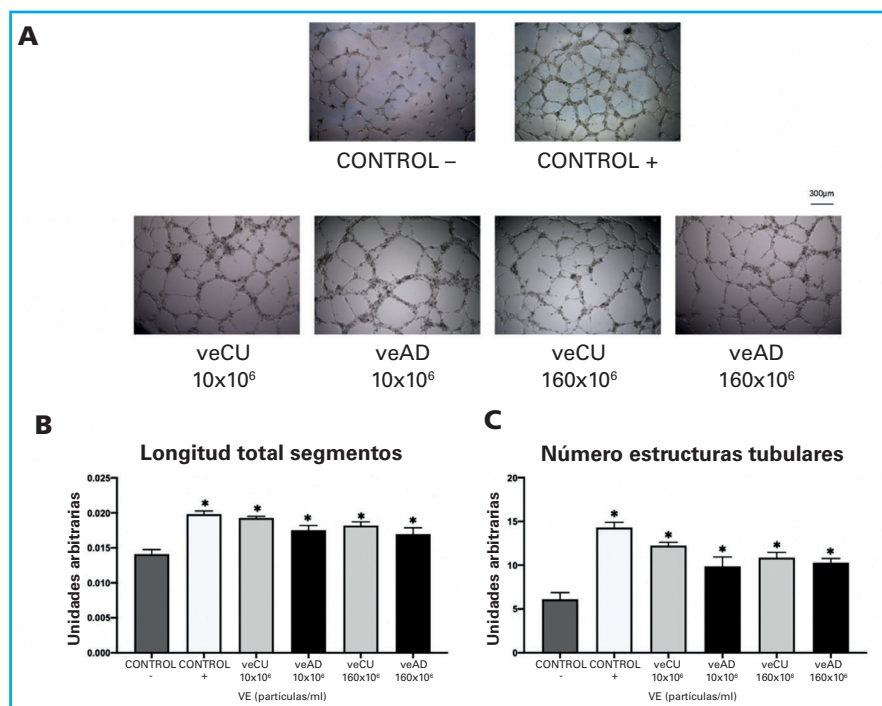


Figura 6. Estudio de la angiogénesis en cultivos de HUVEC. A. Imágenes representativas de la formación de estructuras tubulares en cultivos HUVEC sobre matrigel y tratados con diferentes concentraciones de veCU o veAD. El control (-) corresponde a cultivos no tratados y el control (+) a cultivos tratados con bFGF (30 ng/ml) como factor angiogénico. B y C. Representación gráfica de la cuantificación en el ensayo de angiogénesis de la longitud total de segmentos, y el número de estructuras tubulares, respectivamente. * $p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control [-]).

Aunque las veCU parecen favorecer más la angiogénesis y las veAD pueden intervenir de manera más significativa en el metabolismo graso, a través de su inhibición sobre FABP4, no hemos detectado otras diferencias importantes entre ambos tipos de VE. Ello podría ser en parte debido a que además de nutrientes y oxígeno procedentes de la sangre materna, la sangre de vena de cordón umbilical, transporte VE procedentes de la madre (24). Con lo cual, además de exosomas de origen fetal habría exosomas de adulto.

La respuesta a un daño tisular requiere de una serie de eventos moleculares y celulares que incluyen a la migración celular entre otras (25). Según los resultados obtenidos, la migración de MSC y HUVEC disminuyó, aunque con las veCU el descenso de la migración celular fue menor que con las veAD. Estos resultados sugieren que el contenido de ambos tipos de VE, favoreció la diferenciación, pero disminuyó la migración celular. Dicho efecto ha sido descrito previamente por otros autores, que mostraron como durante la diferenciación osteogénica y condrogénica de MSC, la migración disminuyó conforme progresaba la diferenciación (26). Además, también otros autores han descrito que VE derivados de plasma de individuos sanos inhiben la migración de células endoteliales microvasculares (27).

La diferenciación osteogénica de las MSC es un proceso complejo regulado por varios factores, como el microambiente óseo, el cual influye notablemente en la osteogénesis (28) y donde participan las VE, regulando distintos aspectos fisiológicos de las células madre (29). En este contexto, nuestros resultados han mostrado que la expresión génica del gen COL1A1 aumentó en los cultivos tratados con veAD, lo cual, podría favorecer la mineralización (30). Sin embargo, en la expresión de otros genes osteoblásticos, no se observaron cambios significativos con los tratamientos con veAD o veCU. Esto se puede relacionar con que ninguna de las VE evaluadas afectó a la mineralización de MSC diferenciadas a osteoblastos. La inducción de la formación ósea por VE derivadas de MSC se ha observado en numerosos estudios previos (31). Sin embargo, la aplicación de exosomas derivados de plasma de adolescentes sanos sobre MSC no inducidas a diferenciarse no afecta significativamente a la diferenciación osteogénica, aunque cuando se trataron cultivos primarios de osteoblastos, si se observó un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALPL) (7). No obstante, en ese estudio la mineralización no fue estudiada, por lo que no se puede concluir el posible efecto de esos exosomas sobre la maduración final de los osteoblastos tratados. En otro estudio si han demostrado que el tratamiento de cultivos de MSC derivadas de médula ósea con VE de plasma de sangre de cordón umbilical aumenta la mineralización (32). Las diferencias con los resultados obtenidos en el presente estudio podrían ser debido a la concentración de exosomas utilizada (no pueda ser comparada pues esta expresada en $\mu\text{g/ml}$) y a que las MSC proceden de ratón y no de humanos.

En relación con la diferenciación adipogénica, el tratamiento con las VE circulantes evaluadas produjo una disminución en la formación de vesículas de grasa. Ello fue acompañado por una disminución de la expresión del gen ATGL en los cultivos tratados con veCU y del FABP4 en veAD, involucrados en el metabolismo graso y en la formación de vesículas de grasa (33,34). Es interesante señalar que la expresión del gen PPAR γ , no fue afectada con los tratamientos, lo que sugiere que las VE utilizadas pueden afectar más a la maduración que a la diferenciación temprana de los adipocitos.

El hecho de que cada uno de los tipos de VE circulantes evaluadas haya afectado a la expresión de distintos genes adipogénicos, sugiere diferencias en su cargo entre las cuales podría estar el contenido en miRNA. Así, se ha demostrado que la expresión de FABP4 puede inhibirse por varios miRNA, como miR-369-5p y miR-455 (35) mientras que ATGL puede inhibirse por el hsa-miR-214-3p (36). Por lo tanto, en estudios posteriores sería interesante determinar las diferencias de cargo entre las veCU y veAD para identificar posibles mecanismos de acción sobre la diferenciación de las MSC. También hay que destacar, que sobre el efecto de las VE circulantes sobre la adipogénesis es importante conocer la naturaleza y salud de los donantes. Así, exosomas circulantes de adolescentes obesos favorecen la diferenciación adipogénica más que la osteogénica, en relación a los derivados de adolescentes sanos de peso normal (31).

Ha sido descrito que el aumento de la adiposidad de la médula ósea durante el envejecimiento es producido como consecuencias de cambios en el microambiente medular, que favorecen la diferenciación de las MSC a adipocitos en lugar de osteoblastos (37). Por lo tanto, aunque nuestros resultados no muestran un efecto de las veCU y de las veAD sobre la osteoblastogénesis, si han mostrado su capacidad de disminuir la adipogénesis. Por lo tanto, la aplicación de estas vesículas podría prevenir el aumento de la adiposidad de la médula ósea y como consecuencia favorecer la formación ósea a través de un potencial aumento de osteoprogenitores. Esto está apoyado por estudios que han mostrado que la inyección intravenosa de VE de sangre de cordón umbilical en ratones viejos durante dos meses, una vez por semana, disminuyen la pérdida de hueso relacionada con la edad, estimulando la formación e inhibiendo la resorción ósea (32).

La formación de vasos sanguíneos es fundamental en los procesos regenerativos para proporcionar el aporte de nutrientes, oxígeno y facilitar la llegada de células progenitoras e inmunitarias. Nuestros resultados indican que las VE circulantes evaluadas aumentan la angiogénesis de HUVEC. Resultados de otros autores han mostrado un efecto angiogénico de veCU en cerdos (38) y en otros modelos animales. Estudios *in vitro* han mostrado que VE derivadas de sangre de cordón umbilical y de la madre, aumentan la angiogénesis de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) (39)

y de HUVEC (40). También exosomas derivados de suero de humanos sanos de entre 20 y 30 años tienen efecto proangiogénico a través de la inhibición de la inflamación de los macrófagos. Así, la aplicación local de estos exosomas junto con injertos óseos, favoreció la regeneración de hueso en un modelo de defectos óseos mandibulares en ratas, a través de la disminución de la inflamación y el aumento de la angiogénesis (41). Por lo tanto, nuestros resultados están en línea con estos estudios y apoyan que tanto la sangre de adultos sanos como la de cordón umbilical podrían suponer una fuente abundante de VE con fines terapéuticos. Entre las posibles aplicaciones terapéuticas se encontrarían los relacionados con la formación ósea, debido a sus efectos sobre la diferenciación de MSC y la inducción de la angiogénesis.

CONCLUSIONES

En conclusión, ambos tipos de VE no afectaron a la mineralización en MSC diferenciadas a osteoblastos, pero disminuyeron la adipogénesis en MSC y aumentaron la angiogénesis de HUVEC. Así, estos hallazgos sugieren que ambos tipos de VE, procedentes de fuentes abundantes, sin aspectos éticos importantes y fáciles de aislar, tienen un alto potencial en medicina regenerativa aplicada al hueso, inhibiendo la adiposidad de la médula ósea y favoreciendo la angiogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

- Schmidt-Bleek K, Petersen A, Dienelt A, Schwarz C, Duda GN. Initiation and early control of tissue regeneration – bone healing as a model system for tissue regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14(2):247-59. DOI: 10.1517/14712598.2014.857653
- Marzona L, Pavolini B. Play and players in bone fracture healing match. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2009;6(2):159-62.
- Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(355 Suppl):S73-81. DOI: 10.1097/00003086-199810001-00009
- Kirkham AM, Bailey AJM, Tieu A, Maganti HB, Montroy J, Shorr R, et al. MSC-Derived Extracellular Vesicles in Preclinical Animal Models of Bone Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stem Cell Rev Rep* 2022;18(3):1054-66. DOI: 10.1007/s12015-021-10208-9
- Stanovici J, Le Nail LR, Brennan MA, Vidal L, Trichet V, Rosset P, et al. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Curr Res Transl Med* 2016;64(2):83-90. DOI: 10.1016/j.retram.2016.04.006
- Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy* 2010;12(5):576-8. DOI: 10.3109/14653249.2010.507330
- Torrecillas-Baena B, Pulido-Escribano V, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Camacho-Cardenosa M, Casado-Díaz A. Clinical Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Bone Regeneration. *J Clin Med* 2023;12(13):4385. DOI: 10.3390/jcm12134385
- Marolt Presen D, Traweger A, Gimona M, Redl H. Mesenchymal Stromal Cell-Based Bone Regeneration Therapies: From Cell Transplantation and Tissue Engineering to Therapeutic Secretomes and Extracellular Vesicles. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:352. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00352
- Park KS, Bandeira E, Shelke GV, Lässer C, Lötvall J. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Res Ther* 2019;10(1):288. DOI: 10.1186/s13287-019-1398-3
- Di C, Zhang Q, Wang Y, Wang F, Chen Y, Gan L, et al. Exosomes as drug carriers for clinical application. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46(sup3):S564-70. DOI: 10.1080/21691401.2018.1501381
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200(4):373-83. DOI: 10.1083/jcb.201211138
- Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. *Stem Cells International* 2013;2013(1):130763. DOI: 10.1155/2013/130763
- Zhang Y, Liu J, Mo Y, Chen Z, Chen T, Li Y, et al. Immortalized Mesenchymal Stem Cells: A Safe Cell Source for Cellular or Cell Membrane-Based Treatment of Glioma. *Stem Cells International* 2022;2022(1):6430565. DOI: 10.1155/2022/6430565
- Chen Q, Jin M, Wang S, Wang K, Chen L, Zhu X, et al. Establishing an hTERT-driven immortalized umbilical cord-derived mesenchymal stem cell line and its therapeutic application in mice with liver failure. *J Tissue Eng* 2023;14. DOI: 10.1177/20417314231200328
- Yamaguchi N, Horio E, Sonoda J, Yamagishi M, Miyakawa S, Murakami F, et al. Immortalization of Mesenchymal Stem Cells for Application in Regenerative Medicine and Their Potential Risks of Tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2024;25(24):13562. DOI: 10.3390/ijms252413562
- De Boer HC, Hovens MM, Van Oeveren-Rietdijk AM, Snoep JD, De Koning EJP, Tamsma JT, et al. Human CD34+/KDR+ cells are generated from circulating CD34+ cells after immobilization on activated platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(2):408-15. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.216879
- Dong L, Zieren RC, Horie K, Kim CJ, Mallick E, Jing Y, et al. Comprehensive evaluation of methods for small extracellular vesicles separation from human plasma, urine and cell culture medium. *J Extracell Vesicles* 2020;10(2):e12044. DOI: 10.1002/jev2.12044
- Liu J, Sun W, Liu C, Na Q. Umbilical Cord Blood-Derived Exosomes in Maternal-Fetal Disease: a Review. *Reprod Sci* 2023;30(1):54-61. DOI: 10.1007/s43032-022-00879-1
- Cleys ER, Halleran JL, McWhorter E, Hergenreder J, Enriquez VA, da Silveira JC, et al. Identification of microRNAs in exosomes isolated from serum and umbilical cord blood, as well as placentomes of gestational day 90 pregnant sheep. *Mol Reprod Dev* 2014;81(11):983-93. DOI: 10.1002/mrd.22420
- Huang S, Tang Z, Wang Y, Chen D, Li J, Zhou C, et al. Comparative profiling of exosomal miRNAs in human adult peripheral and umbilical cord blood plasma by deep sequencing. *Epigenomics* 2020;12(10):825-42. DOI: 10.2217/epi-2019-0213
- de Boer C, Davies NH. Blood derived extracellular vesicles as regenerative medicine therapeutics. *Biochimie* 2022;196:203-15. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.10.009

22. Casado-Díaz A, Santiago-Mora R, Jiménez R, Caballero-Villarraso J, Herrera C, Torres A, et al. Cryopreserved human bone marrow mononuclear cells as a source of mesenchymal stromal cells: application in osteoporosis research. *Cytotherapy* 2008;10(5):460-8. DOI: 10.1080/14653240802192644
23. Lin H, Sohn J, Shen H, Langhans MT, Tuan RS. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials* 2019;203:96-110. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.026
24. Nakahara A, Nair S, Ormazabal V, Elfeky O, Garvey CE, Longo S, et al. Circulating Placental Extracellular Vesicles and Their Potential Roles During Pregnancy. *Ochsner J* 2020;20(4):439. DOI: 10.31486/toj.20.0049
25. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009;37(5):1528-42. DOI: 10.1177/147323000903700531
26. Sliogeryte K, Thorpe SD, Lee DA, Botto L, Knight MM. Stem cell differentiation increases membrane-actin adhesion regulating cell blebability, migration and mechanics. *Sci Rep* 2014;4:7307. DOI: 10.1038/srep07307
27. Ramakrishnan DP, Hajj-Ali RA, Chen Y, Silverstein RL. Extracellular Vesicles Activate a CD36-Dependent Signaling Pathway to Inhibit Microvascular Endothelial Cell Migration and Tube Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(3):534-44. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.307085
28. Li J, Liu X, Zuo B, Zhang L. The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. *Aging Dis* 2016;7(4):514-25. DOI: 10.14336/AD.2015.1206
29. Hou Y, Liu Y, Liang S, Ding R, Mo S, Yan D, et al. The novel target exosomes derived from M2 macrophage. *Int Rev Immunol* 2021;40(3):183-96. DOI: 10.1080/08830185.2020.1800687
30. Veis A, Dorvee JR. Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue Int* 2013;93(4):307-15. DOI: 10.1007/s00223-012-9678-2
31. Peruzzi B, Urciuoli E, Mariani M, Chioma L, Tomao L, Montano I, et al. Circulating Extracellular Vesicles Impair Mesenchymal Stromal Cell Differentiation Favoring Adipogenic Rather than Osteogenic Differentiation in Adolescents with Obesity. *Int J Mol Sci* 2023;24(1):447. DOI: 10.3390/ijms24010447
32. Hu Y, Xu R, Chen CY, Rao SS, Xia K, Huang J, et al. Extracellular vesicles from human umbilical cord blood ameliorate bone loss in senile osteoporotic mice. *Metabolism* 2019;95:93-101. DOI: 10.1016/j.metabol.2019.01.009
33. Kershaw EE, Schupp M, Guan HP, Gardner NP, Lazar MA, Flier JS. PPAR γ regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293(6):E1736-45. DOI: 10.1152/ajpendo.00122.2007
34. Qian SW, Li X, Zhang YY, Huang HY, Liu Y, Sun X, et al. Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. *BMC Dev Biol* 2010;10:47. DOI: 10.1186/1471-213X-10-47
35. Tang W, Chen O, Yao F, Cui L. miR-455 targets FABP4 to protect human endometrial stromal cells from cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Mol Med Rep* 2019;20(6):4781-90. DOI: 10.3892/mmr.2019.10727
36. Li Y, Yuan S, Wu W, Zhou J, Zhang P, Li D, et al. The hsa-miR-214-3p/ATGL axis regulates aberrant lipolysis to promote acute myeloid leukemia progression via PPAR α in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2022;608:73-81. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.03.140
37. Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, Gohlke S, Jank AM, Bocian C, et al. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell* 2017;20(6):771-784.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2017.02.009
38. Luo J, Fan Y, Shen L, Niu L, Zhao Y, Jiang D, et al. The Pro-angiogenesis Of Exosomes Derived From Umbilical Cord Blood Of Intrauterine Growth Restriction Pigs Was Repressed Associated With miRNAs. *Int J Biol Sci* 2018;14(11):1426-36. DOI: 10.7150/ijbs.27029
39. Hu Y, Rao SS, Wang ZX, Cao J, Tan YJ, Luo J, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. *Theranostics* 2018;8(1):169-84. DOI: 10.7150/thno.21234
40. Jia L, Zhou X, Huang X, Xu X, Jia Y, Wu Y, et al. Maternal and umbilical cord serum-derived exosomes enhance endothelial cell proliferation and migration. *FASEB J* 2018;32(8):4534-43. DOI: 10.1096/fj.201701337RR
41. Xiang X, Pathak JL, Wu W, Li J, Huang W, Wu Q, et al. Human serum-derived exosomes modulate macrophage inflammation to promote VCAM1-mediated angiogenesis and bone regeneration. *J Cell Mol Med* 2023;27(8):1131-43. DOI: 10.1111/jcmm.17727

Revisión

Biogénesis de RNA circulares, funciones biológicas y su papel en el desarrollo de la osteoartritis

Sergio Rafael Carrillo-Patiño^{1,2}, Fiordaliso Carolina Román-Carraro³, Brenda Anabel López-Ruiz⁴, Juan Fernando Montes-García^{2,5}, Martha Alicia Ballinas-Verdugo⁶, Emma López-Espinosa⁷, Rogelio Frank Jiménez-Ortega^{1,7}

¹Laboratorio de Genómica del Metabolismo Óseo. Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Ciudad de México, México. ²Unidad Académica de Ciencias de la Salud. Universidad ETAC campus Coacalco. Coacalco de Berrizobal, Estado de México, México. ³Departamento de Procesos y Tecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Cuajimalpa. Ciudad México, México. ⁴Jardín Botánico. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. ⁵Laboratorio de Genética. Unidad de Morfología y Función. Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM. Tlalnepantla de Baz, Estado de México, México. ⁶Departamento de Inmunología. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Ciudad de México, México. ⁷Unidad de Acupuntura Humana Rehabilitatoria. Universidad Estatal del Valle de Ecatepec (UNEVE). Ecatepec de Morelos, Estado de México, México

Resumen

La osteoartritis (OA) es la enfermedad articular más común en todo el mundo y su progresión es irreversible. Actualmente los procesos que conducen al desarrollo de esta condición no son del todo comprendidos. Sin embargo, la evidencia sugiere que mecanismos epigenéticos podrían desempeñar un papel clave en el desarrollo de esta patología. Entre estos mecanismos se encuentran los RNA no codificantes (ncRNA), que incluyen a los RNA circulares (circRNA), una clase de RNA con una estructura de bucle cerrado covalentemente que es altamente estable y conservada. La mayoría de los circRNA presentan características de abundancia, estabilidad, conservación y, a menudo, exhiben una manera específica de tejido o etapa de desarrollo con estructuras únicas, su desregulación se ha asociado con la alteración de diversos procesos biológicos como la tumorigénesis, el crecimiento, la invasión, la metástasis, apoptosis y vascularización, favoreciendo el desarrollo de distintas enfermedades incluida la OA. Estudios recientes sugieren que los circRNA desempeñan papeles clave al actuar como esponjas de microRNA (miRNA) o andamios proteicos, lo que los propone como prometedores biomarcadores con potencial para la prevención, diagnóstico y blancos terapéuticos en el tratamiento de la OA. Por lo tanto, en esta revisión se presenta el concepto, las características principales de los circRNA y se describen las principales funciones biológicas y la relevancia clínica de este tipo de RNA, así como las expresiones y sus mecanismos reguladores, lo cual proporciona evidencia de las posibles utilidades en el diagnóstico y tratamiento de la OA.

Palabras clave:

Osteoartritis.
circRNA. ceRNA.
miRNA. Splicing.
Metabolismo óseo.

Recibido: 12/10/2024 • Aceptado: 09/02/2025

Agradecimientos: Rogelio Frank Jiménez-Ortega es parte del programa de investigadoras e investigadores COMECYT con número de folio CAT2024-0036.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Carrillo-Patiño SR, Román-Carraro FC, López-Ruiz BA, Montes-García JF, Ballinas-Verdugo MA, López-Espinosa E, Jiménez-Ortega RF. Biogénesis de RNA circulares, funciones biológicas y su papel en el desarrollo de la osteoartritis. Rev Osteoporos Metab Miner 2025;17(1):31-41

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00065

Correspondencia:

Rogelio Frank Jiménez-Ortega. Unidad de Acupuntura Humana Rehabilitatoria. Universidad Estatal del Valle de Ecatepec (UNEVE). Ecatepec de Morelos, Estado de México, México
e-mail: rogeliofrank.jimenez@uneve.edu.mx

INTRODUCCIÓN

Los huesos son órganos dinámicos que presentan cambios constantes a lo largo de la vida de los vertebrados. Este proceso se conoce como remodelado óseo y se encarga de mantener la integridad estructural del sistema esquelético además de contribuir metabólicamente con la absorción de calcio y fósforo en el cuerpo. El mecanismo de remodelado óseo bajo condiciones normales implica el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo fosfocálcico, aunque también puede ser inducido por daño tisular lo que activa el proceso de resorción de hueso dañado o deteriorado seguido de la formación y el depósito de material óseo nuevo (1). Ambos procesos están funcionalmente equilibrados en la creación y mantenimiento de una estructura funcional óptima del sistema esquelético de acuerdo con las demandas funcionales. Sin embargo, las alteraciones en el equilibrio fisiológico de estos procesos pueden manifestarse en un estado de osteogénesis patológica, tales como el crecimiento anormal del hueso o protuberancias óseas en las superficies articulares conocidas como osteofitos los cuales pueden afectar las articulaciones conduciendo al desarrollo de OA (2). La osteogénesis fisiológica y patológica son procesos similares que se basan en los principios básicos de la biología del tejido óseo: la osteoinducción y la osteoconducción. El principio de la osteoinducción se basa en factores moleculares que actúan sobre la proliferación y diferenciación del fenotipo celular óseo (3), mientras que la osteoconducción se basa en la reconstrucción interna continua del tejido óseo y el tejido esquelético durante toda la vida. La osteoconducción tiene como objetivo mantener una arquitectura esquelética óptima de acuerdo con circunstancias mecánicas, estáticas y humorales durante las etapas prenatal, neonatal e infantil, que son periodos donde los huesos se desarrollan y crecen (4). Para conocer el inicio de la progresión de la OA a través del remodelado óseo, es necesario conocer los límites y diferencias fisiológicas entre los compartimientos del hueso subcondral, los cuales se describen a continuación. El hueso subcondral se refiere a cualquier hueso que se encuentra distal al cartílago calcificado, debajo del cual hay una placa de hueso corticalizado de 1 a 3 mm de espesor que es idéntico al hueso cortical en otras ubicaciones esqueléticas, pero menos rígida que el hueso cortical diafisario (5). El hueso subcondral se encuentra localizado de forma distal al hueso esponjoso subcondral que es más poroso, metabólicamente activo y con menor volumen, densidad y rigidez que la placa cortical. Por lo que el hueso subcondral se refiere tanto al hueso esponjoso subcondral como a la placa cortical sin hacer una distinción adecuada entre sus diferencias (6) (Fig. 1A). Por lo tanto, es importante distinguir entre ambas regiones óseas ya que en etapas avanzadas de la OA los cambios que ocurren en la placa cortical subcondral son diferentes de los que ocurren en el hueso esponjoso (7). En la OA se ha observado que el cartílago calcificado que separa el hueso cortical subcondral del cartílago arti-

cular no mineralizado, puede contribuir al desarrollo de esclerosis la cual se observa en etapas avanzadas de esta enfermedad y se le denomina "marca de marea" (8). Con la progresión de la OA se establece el proceso de osificación endocondral en la marca de marea, que puede ser detectado histológicamente a través de la presencia de múltiples marcas. Como resultado de este proceso de desarrollo renovado, el cartílago se calcifica más que el hueso, volviéndose más grueso, lo que provoca que la capa subyacente del cartílago trabecular no sea capaz de producir suficiente cartílago nuevo para mantener su volumen y por consecuencia esta capa se vuelve más delgada (9). En humanos adultos aproximadamente el 25 % de tejido óseo esponjoso y cerca del 3 % del tejido óseo compacto se reemplaza a través del remodelado óseo cada año, lo que permite que el hueso se renueve y responda a mediano y largo plazo a necesidades mecánicas y metabólicas del organismo para optimizar la arquitectura del sistema esquelético y adaptarlo a condiciones biomecánicas, este proceso ocurre durante toda la vida pero es hasta la tercera década cuando existe la máxima masa ósea, la cual se mantiene con ligeras variaciones hasta los 50 años (10,11). Actualmente, la ausencia de una firma molecular específica con importancia pronóstica en los tratamientos de OA motiva a la comunidad científica a identificar nuevos biomarcadores para el desarrollo de estrategias terapéuticas y de diagnóstico más afectivas. En la última década se han reportado diversos estudios que demuestran que la osteoclastogénesis, osteoblastogénesis y condrogénesis pueden estar reguladas no solo por factores genéticos, sino también por factores epigenéticos donde alteraciones en estos mecanismos pueden estar en la base de enfermedades asociadas con cambios en el remodelado óseo (12). La epigenética se refiere al estudio de los cambios hereditarios y reversibles en la expresión genética que no afectan las secuencias de DNA los cuales incluyen mecanismos como la metilación del DNA, remodelado de histonas y los ncRNA entre los que se encuentran los circRNA (13). Los circRNA son una clase de ncRNA, que se producen a través de un evento de corte y empalme (*splicing*) no canónico llamado "backsplicing" o empalme inverso durante el cual un sitio donante de empalme aguas abajo se une covalentemente a un sitio aceptor de empalme aguas arriba, lo que origina un circRNA (Fig. 1B). Algunos circRNA han sido identificados a través de tecnologías de alto rendimiento como la secuenciación de RNA (RNA-seq) y herramientas bioinformáticas específicas encargadas de relacionar patrones de expresión en tejido específico. Gran parte de los circRNA se originan a partir de genes que codifican proteínas y constan de uno o múltiples exones. Los productos de RNA resultantes de los tipos de empalme alternativo lineal se pueden encontrar dentro de los circRNA algunos de los cuales contienen exones que no están incluidos en las transcripciones lineales (14). Los circRNA son moléculas que no poseen poliadenilación (*Poly A*), ni la metilación del carbono 7 de una guanosina (7mG) y al igual que los RNA mensajeros (mRNA),

los circRNA se localizan en el citoplasma (15). Durante el *proceso* de empalme, la retención interna de intrones derivada de una falla en la desramificación de los lazos intrónicos durante la vía canónica, puede conducir a la producción de circRNA que contienen secuencias derivadas tanto de exones como de intrones y recientemente se han descrito circRNA que contienen ambos tipos de secuencias (circRNA exón-intrón) como se muestra en la figura 1C (16).

En los últimos años se ha demostrado que los circRNA funcionan como esponjas de micro RNA (miRNA), lo que implica un nivel de regulación mayor, ya que los miRNA son reguladores negativos de diversos genes, tales como genes que codifican para factores de transcripción. Sin embargo, el uso práctico de circRNA como

reguladores de miRNA específicos aún se encuentra en desarrollo, ya que, a pesar de su alta presencia en la naturaleza, la mayoría de los mamíferos muestran bajos niveles de circRNA lo que representa entre el 5-10 % del RNA total lineal, lo que implica relativamente menos sitios de unión de miRNA (17).

Recientemente se han identificado numerosos circRNA asociados con OA, lo que sugiere que estas moléculas podrían desempeñar un papel importante en el inicio y progresión de esta enfermedad, además de que podrían tener aplicaciones clínicas como potenciales marcadores de la progresión de la OA. Por lo tanto, en esta revisión se describen los avances más recientes sobre la biogénesis y la biología de los circRNA, así como los procesos biológicos donde se encuentran implicados.

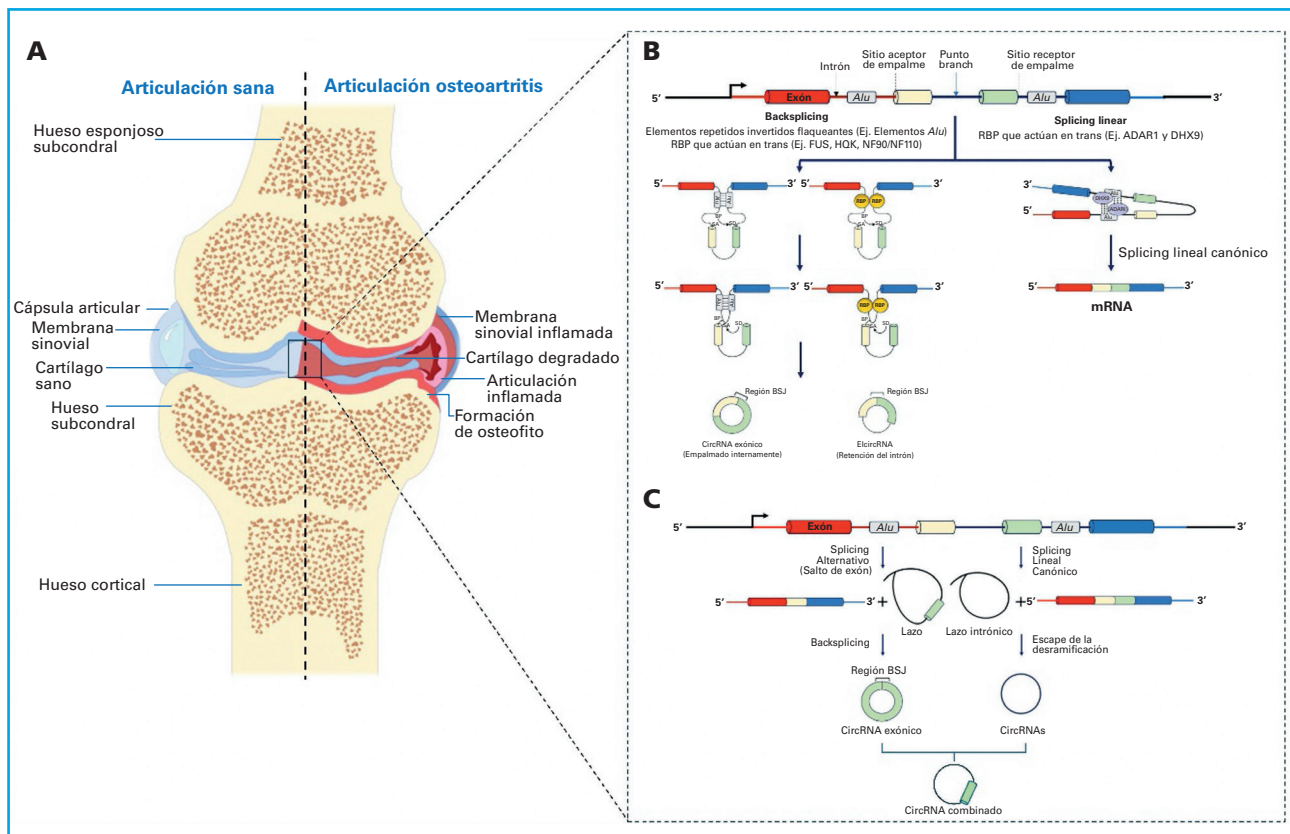


Figura 1. Estructura del cartílago y biogénesis de circRNA implicados en OA. A. Diferentes estímulos estresantes que pueden activar a los condrocitos, lo que conduce a la pérdida de estabilidad fenotípica y degradación de la matriz extracelular del cartílago. A la izquierda se muestran las estructuras que componen a una articulación sana, mientras que a la derecha se muestran las estructuras afectadas en una articulación con OA como la inflamación y degradación del cartílago. B. Se muestra la biogénesis de los circRNA, donde a la izquierda se encuentra el mecanismo del *backsplicing* y a la derecha el empalme lineal. El *backsplicing* ocurre durante la transcripción de la mayoría de los genes humanos y se ve favorecido por intrones flanqueantes largos, elementos de repetición invertida (elementos Alu) y proteínas de unión al RNA (RBP) los cuales actúan en trans. La proteína de unión al RNA FUS, la proteína *quaking* (HQK), NF90 y NF10 son productos proteicos del gen del factor de unión al potenciador de la interleucina que favorecen el *backsplicing*. Por otro lado, el empalme lineal canónico (derecha) se ve favorecido por los exones rodeados por intrones flanqueantes cortos y por intrones unidos por las RBP que actúan en trans, la adenosina desaminasa específica de RNA bicatenario (ADAR1) y la helicasa A de RNA dependiente de ATP (DHX9). Las proteínas RBP interrumpen el apareamiento de bases entre elementos repetidos invertidos, lo que permite que la maquinaria de empalme pueda generar un mRNA lineal. C. Los circRNA pueden generarse a partir de intermediarios de empalme conocidos como precursores de lazo que se crean por un evento de omisión de exón durante el empalme lineal (izquierda) o a partir de precursores de lazo intrónicos que escapan del paso de desramificación del empalme lineal canónico (derecha).

PROPIEDADES DE LOS circRNA

De acuerdo con su tipo de formación, los circRNA pueden dividirse en tres categorías principales: circRNA exónicos (EciRNA), circRNA exón-intrón (ElciRNA) y circRNA intrónicos circulares (ciRNA) (18,19). Los circRNA se derivan de sitios de empalme canónicos y esto se demuestra a través de análisis mutacionales en vectores de expresión de circRNA, donde a través de la inhibición del ensamblaje del espliceosoma, se ha observado que la biogénesis de circRNA es dependiente de la maquinaria de empalme canónica (20). La mayoría de los circRNA son de tipo EciRNA, los cuales son moléculas no colineales de cadena sencilla compuestas de uno o varios exones (22). Los circRNA se expresan en niveles más bajos que los RNA lineales, por lo que la relevancia biológica de los circRNA fue subestimada hasta la llegada de tecnologías como la secuenciación de nueva generación (SNG) que permitió su eficiente detección. Algunas de las características de los circRNA es que presentan alto grado de estabilidad, conservación y especificidad tisular (22), por lo que es factible pensar que estas moléculas podrían ser propuestas como biomarcadores para la detección oportuna de algunas enfermedades como la OA y por su potencial como blancos en la investigación clínica.

BIOGÉNESIS DE LOS circRNA

Los circRNA son moléculas derivadas de sitios de empalme canónicos que dependen de la maquinaria de corte-empalme del splicing y se ha demostrado que la inhibición de espliceosoma a través de la disminución de elementos de ribonucleoproteína nuclear pequeña U2 (snRNP U2), la cual es un componente del espliceosoma e incrementa notablemente la proporción de circRNA a RNA lineales (23). Por lo tanto, cuando los eventos de procesamiento del pre-mRNA se ralentizan, el RNA naciente puede dirigirse a vías alternativas que facilitan el empalme inverso. Este mecanismo fue apoyado por un estudio en *Drosophila melanogaster* donde se demostró que la pérdida de factores de empalme aumenta la formación de circRNA (24). El *backsplicing* consiste en la formación de bucles de las secuencias de intrones que flanquean el sitio donador de empalme aguas arriba de estos sitios. Estas formaciones pueden estar reguladas por el apareamiento de bases entre elementos repetidos invertidos (elementos Alu) que se encuentran en los intrones aguas arriba y aguas abajo o debido a la dimerización de las proteínas de unión al RNA (RBP) entre las que se encuentran la proteína *quaking* (HQB) o la proteína de unión al RNA FUS45 que se une a sitios específicos en los intrones flanqueantes (25,26). Sin embargo, el trabajo en *D. melanogaster* sugiere que la biogénesis de muchos circRNA se debe a una combinación de elementos en *cis*, así como factores de empalme que actúan en *trans*, incluidas las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP) y las proteínas que contienen largas repeticiones de residuos de los aminoácidos

de serina y arginina (SR) (24). Por otro lado, las enzimas adenosina desaminasa (ADAR) impide la activación del sistema inmunitario innato editando la adenosina a inosina en el RNA de doble cadena (dsRNA) endógeno (27), mientras que la helicasa A de RNA dependiente de ATP 9 (DHX9) suprime la biogénesis de los circRNA que dependen del apareamiento de bases entre repeticiones invertidas, específicamente la edición de adenosina a inosina y el desarrollo de las estructuras helicoidales de dsRNA impiden la formación de bucles en las secuencias de intrones (Fig. 1B) (28). Por otro lado, los productos proteicos del factor de unión al potenciador de la interleucina 3 (ILF3) denominados como NF90 y NF110 participan en mecanismos antivirales del huésped y pueden promover la producción de circRNA a través de la estabilización de pares de RNA intrónicos (29). Un evento durante el cual los exones alternativos se eliminan del producto final del mRNA y terminan contenidos dentro del lazo escindido se denomina "omisión de exones", donde el lazo sufre un empalme inverso interno conduciendo a la formación de RNA circular (30). Finalmente, los lazos intrónicos que se liberan de la desramificación pueden conducir a la formación de circRNA.

Los circRNA más abundantes usualmente tienen intrones largos que flanquean los exones involucrados en el empalme inverso y a menudo se derivan de genes con promotores constitutivos (31) (Fig. 1C). Además, cambios en mecanismos epigenéticos dentro de las histonas y los cuerpos de los genes pueden afectar el empalme alternativo y generar un impacto directo en la biogénesis de los circRNA (32). Se ha reportado que la eliminación de la DNA metiltransferasa 3B (DNMT3B), genera cambios en la expresión genética de genes hospederos en forma lineal (33), por lo que la metilación puede modificar la expresión genética durante la biogénesis de los circRNA de acuerdo con el contexto genético. En este sentido, los circRNA pueden influir directamente en los mecanismos de regulación epigenéticos de las regiones promotoras de sus genes hospederos, se ha demostrado que a través del factor de transcripción *Friend leukaemia integration 1* (FLI1), se produce el circRNA FLI1, que es un RNA exónico circular (FECR1) relacionado con el desarrollo del cáncer de mama que induce la desmetilación de los sitios CpG en *cis* a través del reclutamiento de la metilcitosina dioxigenasa (TET1), la cual es una dioxigenasa dependiente de Fe(II)/2-oxoglutarato que induce la desmetilación activa del DNA (34). Finalmente, se ha reportado que la tasa media de elongación de la transcripción es mucho mayor en genes productores de circRNA que en genes que no los producen (35).

FUNCIÓN DE LOS circRNA COMO ESPONJAS

La localización de los circRNA dentro del citoplasma y la estabilidad celular sugiere que estas moléculas pueden actuar como RNA endógenos competitivos (ceRNA). En un estudio reciente se reportó que el gen de

la proteína 1 de RNA antisentido relacionada con la degeneración cerebelosa (CDR1as) está involucrada en la degeneración de las neuronas del cerebelo y produce alrededor de 70 sitios diana de miRNA altamente conservados con la capacidad de inhibir la actividad de mRNA (Fig. 2A) demostrando que los circRNA pueden funcionar como esponjas de miRNA, así como de proteínas dependientes de RBP (36) (Fig. 2B).

Se ha observado que el gen CDR1as presenta sitios de unión al miR-7, cuya interacción resulta en la regulación positiva de la expresión del gen diana que se encuentra aguas abajo del miR-7, mientras que la supresión de circCDR1as resulta en la regulación negativa de los genes diana aguas abajo de miR-7, entre los que se encuentra la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (37), el cual juega un papel clave en el tejido subcondral de ratón con OA promoviendo la diferenciación osteogénica y la proliferación osteoblástica, dando como resultado la formación de tejido óseo aberrante (38,39).

circRNA COMO POTENCIADORES DE LA FUNCIÓN PROTEICA

La mayoría de los circRNA se pueden localizar en el citoplasma en forma de exones. Sin embargo, otro tipo de circRNA con propiedades distintas como los ElciRNA tienden a enriquecerse en el núcleo para promover la transcripción a través de la RNA Pol II. Por ejemplo, *ci-ankrd52* promueve la transcripción a través de su unión con la RNA Pol II, mientras que su supresión resulta en la reducción de la expresión de su gen parental (40). Por otro lado, los ElciRNA como *CircEIF3J* y *CircPAIP2* que se encuentran ubicados en el núcleo tienden a unirse a la ribonucleoproteína *U-small* y posteriormente a la RNA pol II para regular la expresión genética (41) (Fig. 2C). Además, diversos reportes han demostrado que los circRNA pueden reclutar proteínas a localizaciones específicas y tener efectos *cis*-reguladores en la transcripción de genes codificantes (42) (Fig. 2D). En los últimos años avances en la investigación de los circRNA han demostrado que estas moléculas juegan un papel importante en la patogénesis de la OA, especialmente en los mecanismos endógenos competitivos regulados por circRNA.

MECANISMO DE TRADUCCIÓN INDEPENDIENTE

Algunos circRNA son traducibles de forma independiente a través de dos mecanismos principales, incluso sin la presencia del Cap 7mG-5' (43). El primer mecanismo implica el sitio de entrada ribosomal interno (IRES) que es un segmento de secuencia de RNA relativamente corto que regula la unión del ribosoma al RNA sin depender del 7mG-5'. Se ha reportado que *circFBXW7* contiene un marco de lectura abierto (ORF)

iniciado por IRES que permite el inicio de la traducción independientemente de la presencia del 7mG-5', esta traducción aumenta la expresión del gen supresor de tumores llamado: proteína que contiene dominios caja F y repeticiones WD tipo 7 (FBXW7) lo que induce la degradación de la ubiquitinación de c-Myc en cáncer de mama (44) (Fig. 2E). El segundo mecanismo involucra una forma dependiente de N6-metiladenosina (m6A) de los circRNA que es posible traducir incluso sin secuencias IRES. La metilación en la posición N6 de la adenosina del RNA es una modificación dinámica y reversible de las cuales se han identificado 499 asociaciones relacionadas con circRNA de los cuales 25 fueron validados por seq-RNA (45). Se demostró que la traducción del RNA es promovida por circRNA mediante la desmetilación del gen de la proteína asociada a la masa grasa y la obesidad (FTO). Por lo tanto, se ha sugerido que la función traduccional de los circRNA puede ser común en el transcriptoma humano. Sin embargo, en función de la estructura circular específica de los circRNA es necesario abordar estos mecanismos de traducción inducidos por IRES y m6A (Fig. 2F).

MECANISMOS IMPLICADOS EN OA REGULADOS POR circRNA

Inicialmente se pensaba que la OA era el resultado de lesiones articulares anatómicas y funcionales, derivadas de la degradación del cartilago. Recientemente se ha reportado que mediadores inflamatorios producidos por la membrana sinovial, el cartilago y el hueso subcondral son responsables de la patogénesis de la OA (46). También, se ha reportado que las articulaciones sinoviales se llenan de células inflamatorias, incluidas las células T y B que interactúan junto con otras células articulares, lo que constituye un círculo vicioso en el que durante las primeras etapas de la OA los condrocitos son activados de manera compensatoria para mejorar la síntesis de la matriz extracelular. Además, producen y liberan citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), los cuales dañan las células y la matriz extracelular, mientras que los productos de degradación estimulan la inflamación. En este punto los circRNA pueden regular las reacciones inflamatorias a través de mecanismos inducidos por ceRNA que participan en la OA combinando la apoptosis, estrés oxidativo, autofagia, el estrés mecánico y la proliferación celular (47).

circRNA SOBRRREGULADOS IMPLICADOS EN OA

circ-NFKB1

Este circRNA se deriva de un empalme inverso de los exones 2, 3, 4 y 5 del gen que codifica al factor nuclear NF-kappa B (*NFKB*) en el cromosoma 4, no posee

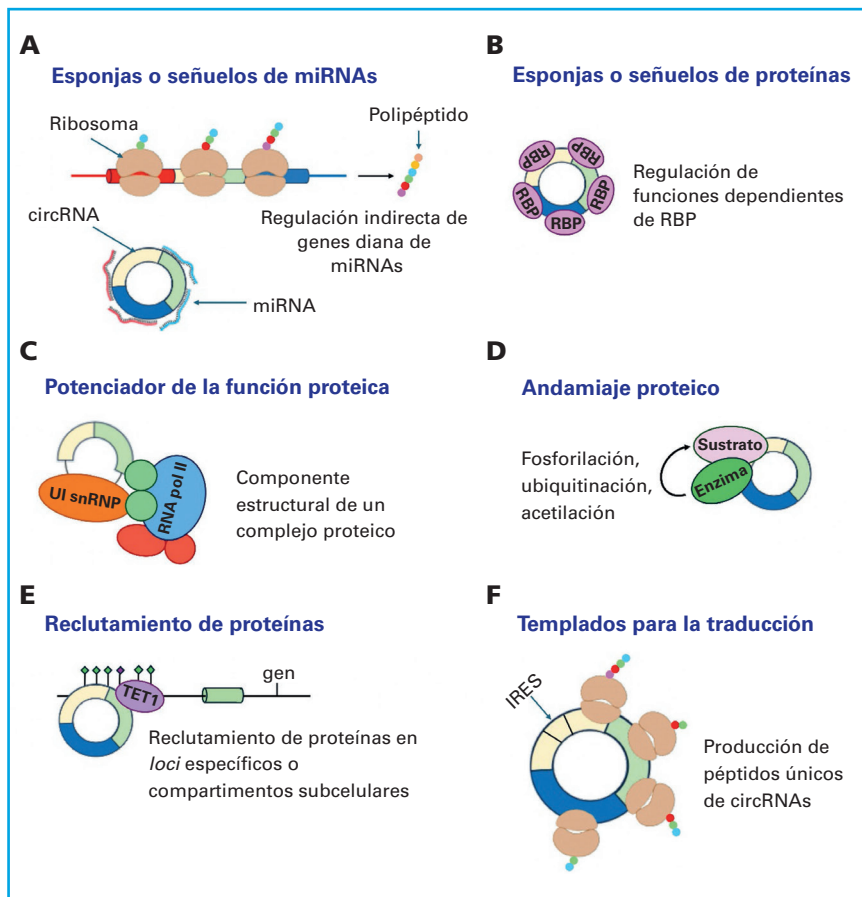


Figura 2. Mecanismos de las funciones de los circRNA. A. Los circRNA pueden funcionar como esponjas o señuelos de miRNA, manteniendo protegidos a los mRNA blancos de la degradación inducida por estas moléculas. B. Los circRNA contienen regiones de unión a RBP las cuales pueden funcionar como esponjas o señuelos de estas proteínas y regular directamente sus funciones. C. Los circRNA pueden interactuar con proteínas particulares y mejorar su función. La RNA polimerasa II contiene ribonucleoproteína nuclear pequeña U1 (snRNP). D. Algunos circRNA funcionan como andamios proteicos, facilitando la localización de enzimas (fosfatasa, acetilasa y ligasa de ubiquitina) y sus sustratos para influir en la cinética de la reacción. E. Los circRNA pueden reclutar proteínas específicas en ciertos loci o compartimentos subcelulares. Por ejemplo, el circRNA FLI1 (FECR1) recluta la metilcitosina dioxigenasa TET1 en la región promotora de su propio gen huésped. F. Los circRNA con elementos del sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) y sitios AUG pueden traducirse en determinadas circunstancias, dando lugar a péptidos únicos.

cola de poli A y recientemente se ha reportado que circ-NFKB1 se encuentra regulado al alza y está implicado en la regulación de la vía de señalización del NFKB en condrocitos inflamados y cartílago con OA. La inhibición de circ-NFKB1 previene el catabolismo de la matriz extracelular (ECM) y restaura el anabolismo de la ECM deteriorada por la actividad de IL-1 β , mientras que la expresión ectópica de circ-NFKB1 promueve la degradación de los condrocitos *in vitro*. En modelos murinos se ha observado que inyecciones intraarticulares de adenovirus circ-NFKB1 en ratones desencadenan la pérdida espontánea de cartílago, promoviendo el desarrollo de OA. Por lo tanto, se sugiere que circ-NFKB1 interactúa con la α -enolasa (ENO1), regulando la expresión de su gen parental, NFKB1 manteniendo la activación de la vía de señalización NF- κ B en los condrocitos (48).

circMELK

Este circRNA presenta una expresión anormal al alza que se ha reportado que promueve la autofagia y apoptosis en condrocitos humanos conduciendo al desarrollo de OA. Mientras que la inhibición de *circMELK* inhibe la apoptosis y mejora la autofagia de condrocitos previniendo la progresión de la OA en el cartílago articular, lo que podría ser una estrategia terapéutica prometido-

ra para el tratamiento de la OA. En el trabajo realizado por Zhang y cols. (2022) se reportó que *circMELK* es una esponja de miR-497-5p que a su vez regula la expresión de MYD88 en condrocitos estimulados con IL-1 β . Se observó que la expresión al alza de MYD88 desencadena la activación de la vía NF- κ B promoviendo la apoptosis e inhibiendo la autofagia de los condrocitos dando pie al desarrollo de la OA. Por lo tanto, la expresión de *circMELK* promueve la apoptosis de los condrocitos e inhibe la autofagia en la OA activando el eje de señalización MYD88/NF- κ B a través de miR-497-5p (49).

circ_0136474

Este circRNA ha sido implicado con el desarrollo de OA. Cheng y cols. (2023) reportaron que la expresión al alza de este circRNA inhibe la proliferación celular, restringe la apoptosis, la degradación de la ECM y la respuesta inflamatoria al regular el eje miR-140-3p/MECP2 en células CHON-001 estimuladas con IL-1 β . Los autores observaron un incremento en los niveles de expresión de circ_0136474 en muestras de tejido de cartílago con OA y sugieren que IL-1 β puede modular la inflamación en el desarrollo de OA. Por otro lado, la inhibición de la expresión de circ_0136474 promovió la proliferación celular y redujo la apoptosis, la degra-

dación de la ECM y la respuesta inflamatoria en condrocitos con OA. Por lo que este podría ser un nuevo mecanismo que ayude a comprender la patogénesis de la OA y proporcione un posible blanco terapéutico o potencial biomarcador (50).

circ_0022383

Este circRNA se encuentra implicado con el desarrollo de OA. Es predominantemente en el citoplasma de los condrocitos y funciona como esponja del miR-3619-5p formando un bucle de retroalimentación, circ_0022383/miR-3619-5p/SIRT1. En un estudio realizado por Qian y cols. (2022) se observó que la inhibición de miR-3619-5p protege a los condrocitos de lesiones provocadas por IL-1β, mientras que la regulación positiva de miR-3619-5p inhibe la acción protectora de circ_0022383 sobre la función de los condrocitos. SIRT1 es una desacetilasa dependiente de NAD+, que participa en la regulación de muchas actividades fisiológicas, incluida la senescencia celular, la inflamación, la apoptosis y el metabolismo, promoviendo la longevidad y contrarrestando el efecto de las enfermedades asociadas con la edad (51,52). Es importante destacar que muchos estudios han demostrado un papel condroprotector de SIRT1. Sin embargo, su haploinsuficiencia podría causar la aparición de OA al inducir una apoptosis excesiva y respuestas catabólicas. Los autores explican que una disminución de SIRT1

en pacientes con OA y condrocitos primarios estimulados con IL-1β contrarresta la acción inhibitoria de la deleción de miR-3619-5p en la degradación, inflamación y apoptosis de la ECM de los condrocitos, lo que indica la posible participación del eje miR-3619-5p/SIRT1 en el proceso de OA (53). Otros circRNA sobrerregulados que han sido relacionados con el desarrollo de OA se muestran en la tabla I (48-58).

circRNA SUBREGULADOS IMPLICADOS EN OA

circ_0114876

Es un circRNA que se deriva del empalme inverso de la transcripción del receptor de la proteína tirosina fosfatasa tipo A (PTPRA), su regulación negativa se asocia con la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, y promoción de la respuesta inflamatoria. En un estudio realizado por Ou y cols. (2023) se exploró el mecanismo de acción de circ_0114876 y se observó que este circRNA comparte algunos sitios de unión con miR-1227-3p que tiene como blanco a ADAM10 un gen involucrado en la regulación de la lesión de los condrocitos y la pérdida de la matriz extracelular, aliviando parcialmente los efectos de miR-1227-3p. Por lo tanto, la regulación a la baja de circ_0114876 podría favorecer el desarrollo de OA (59).

Tabla I. RNA circulares sobrerregulados implicados en el desarrollo de OA en humanos				
circRNA	Mecanismo	Efecto	Modelo	Referencia
circ_0008012	NFKB1	Degradación de condrocitos	Condrocitos humanos	(48)
circ_0009127	miR-497- 5p/MYD88/NF-κB	Inducción de apoptosis, inflamación y autofagia de condrocitos	Condrocitos humanos	(49)
circ_0136474	miR-766-3p/DNMT3A miR-140-3p/MECP2	Inducción de apoptosis y estrés oxidativo en condrocitos	CHON-001	(50)
circ_0022383	miR-3619-5p/SIRT1	Inhibición de apoptosis y degradación de la matriz extracelular	Condrocitos humanos	(51,52)
circ_0092516	miR-337-3p/PTEN	Diferenciación de condrocitos e inhibición de apoptosis	Condrocitos humanos	(53)
circ_0000205	miR-766-3p/ADAMS5	Reducción de la proliferación e inhibición de apoptosis	Condrocitos humanos	(54)
circ_0032131	miR-502-5p/ADAMTS5 miR-145/HGF/c-MET miR-140-3p/ADAM10	Inhibición de la proliferación y migración	Condrocitos humanos	(55)
circ_0043947	miR-671-5p/RTN3	Inducción de apoptosis y respuesta inflamatoria	Condrocitos humanos con daño inducido (IL-1β)	(56)
circ_0005526	miR-142-5p/TCF4	Inducción de apoptosis, respuesta inflamatoria	Condrocitos humanos con OA	(57)
circ_SPG11	miR-337-3p/ADAMTS5 miR-665-3pGREM1	Inducción de apoptosis y degradación de la matriz extracelular	Condrocitos humanos con OA	(58)

circ_0004662

Este circRNA está implicado en la progresión de OA, ya que en condrocitos humanos se ha observado que circ_0004662 regula la expresión de miR-424-5p el cual tiene como blanco al factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA), el cual es crucial para la supervivencia de condrocitos, por lo que la regulación negativa de este circRNA permitiría la expresión de miR-424-5p y por lo tanto la regulación negativa de VEGFA, favoreciendo el desarrollo y progresión de la OA (60).

circCDK14

La regulación negativa de circCDK14 ha sido implicada con el desarrollo de OA, ya que este presenta sitios de unión para miR-1183 el cual regula la expresión del factor similar a Kruppel 5 (KLF5), un gen que participa en varias funciones celulares, incluidas la proliferación, la apoptosis, la autofagia, la pluripotencia, la invasión y la migración. Su desregulación se ha relacionado con el proceso patológico de los huesos y las articulaciones. Por lo que la regulación negativa de circCDK14, permitiría la expresión de miR-1183, induciendo la regulación negativa de KLF5, favoreciendo el desarrollo de OA (61).

circ_0020093

La regulación negativa de circ_0020093 en condrocitos ha sido relacionada con el desarrollo de OA. En un modelo celular C28/I2 se observó que circ_0020093 regula la expresión de miR-181a-5p el cual tiene como blanco al gen relacionado con la transformación específica de eritroblastos (ERG). Este gen se ha asociado con la for-

mación de articulaciones ya que conduce a los condrocitos a una vía de desarrollo permanente convirtiéndolos en células formadoras de articulaciones. Por lo tanto, la regulación negativa de circ_0020093 podría permitir la regulación al alza de miR-181a-5p regulando negativamente a ERG y disminuyendo la formación de cartílago (62). Otros circRNA subregulados que han sido relacionados con el desarrollo de OA se muestran en la tabla II (59-64).

CONCLUSIÓN

Actualmente se han reportado un gran número de estudios sobre el papel funcional de los circRNA en el desarrollo de la OA, los cuales buscan demostrar su desempeño como moléculas reguladoras de esta patología. Sin embargo, aún existen muchas deficiencias en las investigaciones actuales. Por ejemplo, el hecho de que las funciones de los circRNA han sido limitadas en actuar como esponjas de miRNA, sin tomar en cuenta las características de diversas enfermedades. A pesar de estas limitaciones, el potencial de los circRNA se ha confirmado en diversas condiciones, lo que nos indica la dirección para estudiar el papel de los circRNA en padecimientos relacionados con el metabolismo óseo. Los circRNA son inhibidores competitivos esenciales de los miRNA y su alto nivel de conservación y estabilidad podría permitir tratar la OA de manera más efectiva. Sin embargo, el mecanismo de los circRNA no debe limitarse a ceRNA, ya que pueden desempeñar otras funciones como: la interacción con proteínas y como reguladores de la transcripción/traducción. Por lo tanto, los circRNA pueden ser reguladores de procesos biológicos como la proliferación, la apoptosis, la diferenciación, la autofagia de los condrocitos, la degradación de la matriz extracelular, la regulación

Tabla II. RNA circulares subregulados implicados en el desarrollo de OA en humanos

circRNA	Mecanismo	Efecto	Modelo	Referencia
circ_0114876	ADAM10 y miR-1227p	Regulación de proliferación y apoptosis	Condrocitos de pacientes con OA	(59)
circ_0004662	miR-424-5p/VEGFA	Regulación de la proliferación e inhibición de la apoptosis	Condrocitos humanos con daño inducido por IL-1 β	(60)
circ_0001721 (circCDK14)	miR-1183/KLF5	Regulación de la proliferación e inhibición de la apoptosis	Condrocitos humanos con daño inducido por IL-1 β	(61)
circ_0020093	181a-5p/ERG	Regulación de apoptosis y degradación de la matriz extracelular	Condrocitos humanos con daño inducido por IL-1 β	(62)
circPDE4D	miR-4306/SOX9	Regulación de apoptosis y degradación de la matriz extracelular	Condrocitos humanos	(63)
circ_0072688 (circADAMTS6)	miR-324-5p/PI3K/AKT/mTOR	Regulación de la proliferación y degradación de la matriz extracelular	Condrocitos de pacientes con OA	(64)

de los procesos de estrés oxidativo y procesos inflamatorios, los cuales están relacionados con la OA. Por otro lado, los circRNA también pueden modular el entorno intraarticular, como la membrana sinovial, el menisco y el hueso subcondral, por lo que se pueden considerar como potenciales biomarcadores en procedimientos como la biopsia líquida empleada en la detección de la OA. Finalmente, a pesar de que existen múltiples estudios disponibles, aún quedan muchas deficiencias con respecto a los mecanismos, la construcción en modelos animales y la heterogeneidad de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Dudaric L, Dumic-Cule I, Divjak E, Cengic T, Brkljacic B, Ivanac G. Bone Remodeling in Osteoarthritis-Biological and Radiological Aspects. *Medicina (Kaunas)* 2023;59(9):1613. DOI: 10.3390/medicina59091613
- Burr DB, Gallant MA. Bone remodelling in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8(11):665-73. DOI: 10.1038/nrrheum.2012.130
- Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 2001;10(Suppl 2):S96-101. DOI: 10.1007/s005860100282
- Khan WS, Rayan F, Dhinsa BS, Marsh D. An osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic tissue-engineered product for trauma and orthopaedic surgery: how far are we? *Stem Cells Int* 2012;2012:236231. DOI: 10.1155/2012/236231
- Stewart HL, Kawcak CE. The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Front Vet Sci* 2018;5:178. DOI: 10.3389/fvets.2018.00178
- Zhu X, Chan YT, Yung PSH, Tuan RS, Jiang Y. Subchondral Bone Remodeling: A Therapeutic Target for Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol* 2021;8:607764. DOI: 10.3389/fcell.2020.607764
- Hu W, Chen Y, Dou C, Dong S. Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2021;80(4):413-22. DOI: 10.1136/annrheum-dis-2020-218089
- Wang W, Ye R, Xie W, Zhang Y, An S, Li Y, et al. Roles of the calcified cartilage layer and its tissue engineering reconstruction in osteoarthritis treatment. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:911281. DOI: 10.3389/fbioe.2022.911281
- Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res* 2022;10(1):48. DOI: 10.1038/s41413-022-00219-8
- Zhu X, Chan YT, Yung PSH, Tuan RS, Jiang Y. Subchondral Bone Remodeling: A Therapeutic Target for Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol* 2021;8:607764. DOI: 10.3389/fcell.2020.607764
- Becker KL. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, PA, USA; 2001.
- Caldo D, Massarini E, Rucci M, Deaglio S, Ferracini R. Epigenetics in Knee Osteoarthritis: A 2020-2023 Update Systematic Review. *Life (Basel)* 2024;14(2):269. DOI: 10.3390/life14020269
- Li Z, Lu J. CircRNAs in osteoarthritis: research status and prospect. *Front Genet* 2023;14:1173812. DOI: 10.3389/fgene.2023.1173812
- Guo JU, Agarwal V, Guo H, Bartel DP. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol* 2014;15(7):409. DOI: 10.1186/s13059-014-0409-z
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 2013;495(7441):333-8. DOI: 10.1038/nature11928
- Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* 2015;22(3):256-64. DOI: 10.1038/nsmb.2959
- Bosson AD, Zamudio JR, Sharp PA. Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. *Mol Cell* 2014;56(3):347-59. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.09.018
- Zhang XO, Wang HB, Zhang Y, Lu X, Chen LL, Yang L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* 2014;159(1):134-47. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.001
- Liu J, Liu T, Wang X, He A. Circles reshaping the RNA world: from waste to treasure. *Mol Cancer* 2017;16(1):58. DOI: 10.1186/s12943-017-0630-y
- Zhang Y, Liu L, Liu K, Wang M, Su X, Wang J. Regulatory mechanism of circular RNA involvement in osteoarthritis. *Front Surg* 2023;9:1049513. DOI: 10.3389/fsurg.2022.1049513
- Lee Y, Rio DC. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem* 2015;84:291-323. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316
- Busa VF, Leung AKL. Thrown for a (stem) loop: How RNA structure impacts circular RNA regulation and function. *Methods* 2021;196:56-67. DOI: 10.1016/j.ymeth.2021.02.019
- Liang D, Tatomer DC, Luo Z, Wu H, Yang L, Chen LL, et al. The Output of Protein-Coding Genes Shifts to Circular RNAs When the Pre-mRNA Processing Machinery Is Limiting. *Mol Cell* 2017;68(5):940-54.e3. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.10.034
- Kramer MC, Liang D, Tatomer DC, Gold B, March ZM, Cherry S, et al. Combinatorial control of Drosophila circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins. *Genes Dev* 2015;29(20):2168-82. DOI: 10.1101/gad.270421.115
- Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, Conn VM, Salmandis M, Phillips CA, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell* 2015;160(6):1125-34. DOI: 10.1016/j.cell.2015.02.014
- Errichelli L, Dini Modigliani S, Laneve P, Colantoni A, Legnini I, Caputo D, et al. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nat Commun* 2017;8:14741. DOI: 10.1038/ncomms14741
- Koh HR, Xing L, Kleiman L, Myong S. Repetitive RNA unwinding by RNA helicase A facilitates RNA annealing. *Nucleic Acids Res* 2014;42(13):8556-64. DOI: 10.1093/nar/gku523
- Aktaş T, Avşar Ilik İ, Maticzka D, Bhardwaj V, Pessoa Rodrigues C, Mittler G, et al. DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome. *Nature* 2017;544(7648):115-9. DOI: 10.1038/nature21715
- Li X, Liu CX, Xue W, Zhang Y, Jiang S, Yin QF, et al. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. *Mol Cell* 2017;67(2):214-27.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.05.023
- Eger N, Schoppe L, Schuster S, Laufs U, Boeckel JN. Circular RNA Splicing. *Adv Exp Med Biol* 2018;1087:41-52. DOI: 10.1007/978-981-13-1426-1_4

31. Ferreira HJ, Davalos V, de Moura MC, Soler M, Perez-Salvia M, Bueno-Costa A, et al. Circular RNA CpG island hypermethylation-associated silencing in human cancer. *Oncotarget* 2018;9(49):29208-19. DOI: 10.18632/oncotarget.25673
32. Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 2011;479(7371):74-9. DOI: 10.1038/nature10442
33. Kristensen LS, Okholm TLH, Venø MT, Kjems J. Circular RNAs are abundantly expressed and upregulated during human epidermal stem cell differentiation. *RNA Bio.* 2018;15(2):280-91. DOI: 10.1080/15476286.2017.1409931
34. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 2011;333(6047):1303-7. DOI: 10.1126/science.1210944
35. Zhang Y, Xue W, Li X, Zhang J, Chen S, Zhang JL, et al. The Biogenesis of Nascent Circular RNAs. *Cell Rep* 2016;15(3):611-24. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.03.058
36. Xiao J, Joseph S, Xia M, Teng F, Chen X, Huang R, et al. Circular RNAs Acting as miRNAs' Sponges and Their Roles in Stem Cells. *J Clin Med* 2022;11(10):2909. DOI: 10.3390/jcm11102909
37. Zhou X, Li J, Zhou Y, Yang Z, Yang H, Li D, et al. Down-regulated ciRS-7/up-regulated miR-7 axis aggravated cartilage degradation and autophagy defect by PI3K/AKT/mTOR activation mediated by IL-17A in osteoarthritis. *Aging (Albany NY)* 2020;12(20):20163-83. DOI: 10.18632/aging.103731
38. Xue JF, Shi ZM, Zou J, Li XL. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis. *Biomed Pharmacother* 2017;89:1252-61. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.01.130
39. Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, Jens M, Pino N, Giusti S, et al. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol Cell* 2015;58(5):870-85. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.03.027
40. Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, et al. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell* 2013;51(6):792-806. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.017
41. Shao T, Pan YH, Xiong XD. Circular RNA: an important player with multiple facets to regulate its parental gene expression. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020;23:369-76. DOI: 10.1016/j.omtn.2020.11.008
42. Zhang MX, Wang JL, Mo CQ, Mao XP, Feng ZH, Li JY, et al. CircME1 promotes aerobic glycolysis and sunitinib resistance of clear cell renal cell carcinoma through cis-regulation of ME1. *Oncogene* 2022;41(33):3979-90. DOI: 10.1038/s41388-022-02386-8
43. Ho-Xuan H, Glažar P, Latini C, Heizler K, Haase J, Hett R, et al. Comprehensive analysis of translation from overexpressed circular RNAs reveals pervasive translation from linear transcripts. *Nucleic Acids Res* 2020;48(18):10368-82. DOI: 10.1093/nar/gkaa704
44. Ye F, Gao G, Zou Y, Zheng S, Zhang L, Ou X, et al. circFBXW7 Inhibits Malignant Progression by Sponging miR-197-3p and Encoding a 185-aa Protein in Triple-Negative Breast Cancer. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;18:88-98. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.07.023
45. Yang Y, Fan X, Mao M, Song X, Wu P, Zhang Y, et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. *Cell Res* 2017;27(5):626-41. DOI: 10.1038/cr.2017.31
46. Motta F, Barone E, Sica A, Selmi C. Inflammaging and Osteoarthritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2023;64(2):222-38. DOI: 10.1007/s12016-022-08941-1
47. Nedunchezhiyan U, Varughese I, Sun AR, Wu X, Crawford R, Prasadam I. Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Front Immunol* 2022;13:907750. DOI: 10.3389/fimmu.2022.907750
48. Tang S, Nie X, Ruan J, Cao Y, Kang J, Ding C. El RNA circular circNFKB1 promueve la progresión de la osteoartritis mediante la interacción con la ENO1 y el mantenimiento de la señalización NF-κB. *Celta Muerte Dis* 2022;13(8):695. DOI: 10.1038/s41419-022-05148-2
49. Zhang Y, Lu R, Huang X, Yin E, Yang Y, Yi C, et al. Circular RNA MELK Promotes Chondrocyte Apoptosis and Inhibits Autophagy in Osteoarthritis by Regulating MYD88/NF-κB Signaling Axis through MicroRNA-497-5p. *Contrast Media Mol Imaging* 2022;2022:7614497. DOI: 10.1155/2022/7614497
50. Cheng S, Nie Z, Cao J, Peng H. Circ_0136474 promotes the progression of osteoarthritis by sponging mir-140-3p and upregulating MECP2. *J Mol Histol* 2023;54(1):1-12. DOI: 10.1007/s10735-022-10100-x
51. Jiao F, Gong X. The Beneficial Roles of SIRT1 in Neuroinflammation-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:6782872. DOI: 10.1155/2020/6782872
52. Qian L, Yu B, Chen T, Chen K, Ma Z, Wang Y, et al. El apoptosis inducido por IL-1o, inflamación y degeneración de matriz extracelular en el modelo de celda de osteoartritis por miR-3619-5p/SIRT1. *Int Immunopharmacol* 2022;112:109289. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109289
53. Huang Z, Ma W, Xiao J, Dai X, Ling W. CircRNA_0092516 regulates chondrocyte proliferation and apoptosis in osteoarthritis through the miR-337-3p/PTEN axis. *J Biochem* 2021;169(4):467-75. DOI: 10.1093/jb/mvaa119
54. Li G, Luo H, Ding Z, Liang H, Lai Z, Chen S, et al. Silencing of circ_0000205 mitigates interleukin-1β-induced apoptosis and extracellular matrix degradation in chondrocytes via targeting miR-766-3p/ADAMTS5 axis. *Innate Immun* 2022;28(2):79-90. DOI: 10.1177/17534259221077078
55. Que W, Liu H, Yang Q. CircPRKCH modulates extracellular matrix formation and metabolism by regulating the miR-145/HGF axis in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2022;24(1):216. DOI: 10.1186/s13075-022-02893-9
56. He M, Jia Z, Wen Y, Chen X. Circ_0043947 contributes to interleukin 1β-induced injury in chondrocytes by sponging miR-671-5p to up-regulate RTN3 expression in osteoarthritis pathology. *J Orthop Surg Res* 2022;17(1):177. DOI: 10.1186/s13018-022-02970-4
57. Wahafu P, Xu A, Zhao B, Tuo Y, Yang J. Circ_0005526 contributes to interleukin-1β-induced chondrocyte injury in osteoarthritis via upregulating transcription factor 4 by interacting with miR-142-5p. *Bioengineered* 2022;13(4):8407-18. DOI: 10.1080/21655979.2022.2048773
58. Ouyang X, Ding Y, Yu L, Xin F, Yang X, Liu X, et al. Circ_SPG11 plays contributing effects on IL-1β-induced chondrocyte apoptosis and ECM degradation via miR-665 inhibition-mediated GREM1 upregulation. *Clin Immunol* 2021;233:108889. DOI: 10.1016/j.clim.2021.108889
59. Ou L, Huang W, Zhang T, Xu D, Kong D, Meng Y. Circular RNA circ_0114876 regulates osteoarthritis through upregula-

- ting ADAM10 via targeting miR-1227-3p. *Transpl Immunol* 2023;77:101747. DOI: 10.1016/j.trim.2022.101747
60. Xie W, Jiang L, Huang X, You W, Sun W. Hsa_circ_0004662 Accelerates the Progression of Osteoarthritis *via* the microRNA-424-5p/VEGFA Axis. *Curr Mol Med* 2024;24(2):217-25. DOI: 10.2174/1566524023666221103161203
61. Lai X, Song Y, Tian J. CircCDK14 ameliorates interleukin-1 β -induced chondrocyte damage by the miR-1183/KLF5 pathway in osteoarthritis. *Autoimmunity* 2022;55(6):408-17. DOI: 10.1080/08916934.2022.2081843
62. Zhu J, Guo Y. Circ_0020093 Overexpression Alleviates Interleukin-1 Beta-induced Inflammation, Apoptosis and Extracellular Matrix Degradation in Human Chondrocytes by Targeting the miR-181a-5p/ERG Pathway. *Immunol Invest* 2022;51(6):1660-77. DOI: 10.1080/08820139.2021.2021938
63. Gao L, Wang X, Xiong J, Ma Y. Circular RNA from phosphodiesterase 4D can attenuate chondrocyte apoptosis and matrix degradation under OA milieu induced by IL-1 β via circPDE4D/miR-4306/SOX9 Cascade. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2022;44(5):682-92. DOI: 10.1080/08923973.2022.2077215
64. Shen L, Ji C, Lin J, Yang H. Regulation of circADAMTS6-miR-324-5p-PIK3R3 ceRNA pathway may be a novel mechanism of IL-1 β -induced osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Miner Metab* 2022;40(3):389-401. DOI: 10.1007/s00774-021-01308-0

Artículo Especial

Consenso Delphi sobre el manejo de pacientes con osteoporosis en atención primaria

Cristina Carbonell-Abella¹, Rafael Manuel Micó-Pérez², Francisco Vargas Negrín³, José Carlos Bastida-Calvo⁴, Pilar Aguado Acín⁵

¹Medicina Familiar y Comunitaria. Centro de Salud Vía Roma. Universitat de Barcelona. Barcelona. ²Medicina Familiar y Comunitaria. Centro Fontanars dels Alforins. Departamento de salud Xàtiva-Ontinyent. Valencia. Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMergen).

³Medicina de Familia. Centro de Salud Dr. Guigou. Tenerife. Grupo de Trabajo de Enfermedades Reumáticas y Musculoesqueléticas. Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (semFYC). ⁴Medicina Familiar y Comunitaria. Centro de Saúde Marín. Pontevedra. Coordinador Nacional Grupo Patología Osteoarticular/Osteoporosis Sociedad Española de Médicos Generales y de Familia (SEMG). ⁵Servicio de Reumatología. Hospital Universitario La Paz. Madrid. Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM)

Resumen

Introducción: existen numerosas guías clínicas sobre la identificación, tratamiento y seguimiento de pacientes con osteoporosis, pero presentan diferencias significativas en sus recomendaciones, lo que a menudo genera confusión e incertidumbre entre los profesionales sanitarios.

Objetivo: consensuar y unificar criterios en torno a la identificación, evaluación, tratamiento, seguimiento y papel de pacientes con osteoporosis.

Métodos: tras la revisión de las principales guías sobre el manejo de la osteoporosis, un comité de expertos identificó aquellos aspectos con mayor controversia o menor evidencia y elaboró un cuestionario Delphi con 92 aseveraciones agrupadas en los siguientes bloques: 1. Identificación y evaluación; 2. Tratamiento; 3. Monitorización y seguimiento; 4. Criterios de derivación; y 5. Punto de vista del paciente.

Resultados: se alcanzó consenso en 77 aseveraciones (83,7 %). Los panelistas coincidieron en la importancia de identificar adecuadamente esta condición, estratificando a los pacientes según su riesgo de fractura, para lo que se ha de tener en cuenta factores como la densidad mineral ósea, edad, sexo, riesgo de caídas, antecedentes familiares y personales de fractura, y otros factores clínicos. También se hizo hincapié en la importancia del ejercicio y la nutrición, así como el momento de inicio, duración y posibles vacaciones terapéuticas del tratamiento farmacológico, individualizando cada caso según sea necesario.

Conclusiones: los médicos de familia son conscientes de identificar, evaluar, tratar y monitorizar adecuadamente los pacientes con osteoporosis para poder reducir el riesgo de fracturas por fragilidad. Sin embargo, todavía existen aspectos que generan confusión en los que es necesaria una mayor evidencia científica.

Palabras clave:

Atención primaria.
Consenso. Delphi.
Osteoporosis.
Paciente.

Recibido: 15/01/2025 • Aceptado: 24/01/2025

Financiación: Amgen, Grünenthal, Rubió, Stada y Theramex han patrocinado este proyecto sin participar en modo alguno en el diseño, el análisis de datos o la redacción de este artículo.

Conflictos de interés: Cristina Carbonell-Abella no tiene ningún conflicto de intereses en relación con la investigación, la autoría y/o la publicación de este artículo. Pilar Aguado Acín ha sido ponente en actividades formativas patrocinadas por Abbvie, Alexion, Amgen, FAES, Gedeon Richter Ibérica, GP Pharm, Kyowa Kirin, Lilly, MSD, Rubió, Stada y Theramex; y ha participado en asesorías puntuales para Alexion, Amgen, AstraZeneca, Kyowa Kirin y Theramex. José Carlos Bastida-Calvo ha recibido financiación para asistencia de congresos y honorarios (directamente o a través de diferentes sociedades científicas) como ponente y/o consultor, cursos de formación, trabajos de investigación de: Abbott, Almirall, Amgen, Bayer, Boehringer Ingelheim, Chiesi, Esteve, FAES, Grünenthal Pharma, GSK, Italfarmaco, Lilly, Menarini, MSD, Pfizer, Recordati, Rovi y Servier. Rafael Manuel Micó-Pérez ha participado como ponente en actividades formativas patrocinadas por Amgen y FAES, y como asesor puntual para Amgen. Francisco Vargas Negrín ha participado en actividades (de formación y revisión) organizadas por Grünenthal Pharma y Amgen.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Carbonell-Abella C, Micó-Pérez RM, Vargas Negrín F, Bastida-Calvo JC, Aguado Acín P. Consenso Delphi sobre el manejo de pacientes con osteoporosis en atención primaria. Rev Osteoporos Metab Miner 2025;17(1):42-55

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00074

Correspondencia:

Cristina Carbonell-Abella. Medicina Familiar y Comunitaria. Centro de Salud Vía Roma. Barcelona
e-mail: ccarbonell@ub.edu

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis afecta a millones de personas en todo el mundo y se espera que su prevalencia aumente a medida que la población envejece. En España representa un desafío significativo, con un número considerable de personas en riesgo de sufrir fracturas y sus complicaciones, lo que supone importantes costes de salud, económicos y sociales.

A pesar de su gravedad, las guías clínicas sobre identificación, tratamiento y seguimiento de pacientes con osteoporosis emitidas por las sociedades científicas relacionadas con la osteoporosis en todo el mundo, presentan diferencias significativas en sus recomendaciones, lo que puede generar confusión e incertidumbre entre los profesionales sanitarios y, en última instancia, afectar al manejo y a la calidad de la atención sanitaria que reciben los pacientes (1-5).

Por este motivo se ha creado este consenso Delphi, para discutir, consensuar y unificar criterios en torno a la identificación, evaluación, tratamiento y seguimiento de pacientes con osteoporosis, así como la relación de atención primaria con atención hospitalaria o segundo nivel asistencial.

MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio se diseñó empleando el método Delphi, una técnica de comunicación estructurada que permite recoger opiniones sobre un determinado tema complejo o controvertido para el que no se dispone de suficiente evidencia o su conocimiento es incompleto o incierto (6,7). Además, gracias a este método se pueden explorar y unificar las opiniones de un grupo de expertos sin las dificultades e inconvenientes inherentes a los consensos presenciales, como los sesgos de influencia o interacción no confidencial.

El estudio fue llevado a cabo en varias fases: 1) creación de un comité científico de expertos con representantes de la Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN), Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (semFYC), Sociedad Española de Médicos Generales y de Familia (SEMG) y Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM); 2) revisión de las principales guías nacionales e internacionales de referencia sobre el diagnóstico y tratamiento de la osteoporosis por parte del comité científico para identificar aquellos aspectos más controvertidos o con menor evidencia; 3) creación de un cuestionario Delphi con aseveraciones relativas a los aspectos identificados en el punto anterior; 4) dos rondas sucesivas en las que un panel de expertos mostró su grado de acuerdo con las aseveraciones propuestas; y 5) recopilación, análisis y discusión de los resultados.

PARTICIPANTES

En el estudio participó un comité científico, un panel de expertos y un equipo técnico. El comité científico constó de 1 coordinador y 4 expertos en el tratamiento de la osteoporosis. El panel de expertos fue elegido por el comité científico a partir de los socios de las sociedades médicas procurando disponer de una adecuada representación territorial de todas las comunidades autónomas de España. Las sociedades médicas participantes fueron: SEMERGEN, semFYC, SEMG y SEIOMM. Esta última fue la impulsora del proyecto. El panel estaba constituido principalmente por médicos de atención primaria y otras especialidades relacionadas con la investigación y atención a pacientes con osteoporosis y fractura por fragilidad.

CUESTIONARIO DELPHI

Tras revisar y debatir los aspectos más controvertidos o con menos evidencia de las principales guías de práctica clínica, el comité científico elaboró un cuestionario Delphi de 92 aseveraciones agrupadas en los siguientes bloques: 1. Identificación y evaluación (20 aseveraciones); 2. Tratamiento (47 aseveraciones), dividido, a su vez, en varios subapartados: ejercicio (3 aseveraciones), nutrición (8 aseveraciones), farmacoterapia (12 aseveraciones), inicio del tratamiento (15 aseveraciones), duración del tratamiento (2 aseveraciones), vacaciones terapéuticas (7 aseveraciones); 3. Monitorización y seguimiento (8 aseveraciones); 4. Criterios de derivación (11 aseveraciones); y 5. Punto de vista del paciente (6 aseveraciones).

Para la valoración del cuestionario se propuso una escala Likert de 9 puntos (7). Esta escala fue estructurada en tres grupos según el nivel de acuerdo-desacuerdo con la aseveración: de 1 a 3, interpretado como desacuerdo; de 4 a 6, interpretado como sin acuerdo o sin desacuerdo; y de 7 a 9, interpretado como expresión de acuerdo.

FASES DEL CONSENSO DELPHI

Siguiendo el procedimiento de la metodología Delphi (8), el cuestionario fue enviado al panel de expertos para que respondieran mostrando su grado de acuerdo con las aseveraciones. En la primera ronda (mayo-junio 2024), los panelistas respondieron al cuestionario *online* y se les ofreció la posibilidad de añadir su opinión en texto abierto. El equipo técnico evaluó y presentó mediante gráficos de barras los resultados de la primera ronda para facilitar los comentarios y aclaraciones de cada participante. Las aseveraciones no consensuadas fueron enviadas de nuevo a los panelistas para que fueran valoradas en una segunda ronda (junio-julio 2024). Los resultados de esta segunda ronda fueron tabulados y presentados de forma descriptiva. El proyecto se cerró con una reunión del comité científico para debatir y analizar los resultados.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para analizar la opinión del panel de expertos y el tipo de consenso alcanzado sobre cada aseveración, se empleó la mediana y el intervalo intercuartílico de las puntuaciones obtenidas para cada aseveración. Se consideró que hubo consenso en cualquiera de ellas cuando dos tercios o más de los encuestados ($\geq 66,7\%$) puntuaban dentro del intervalo de 3 puntos (1-3 o 7-9) que contiene la mediana. El tipo de consenso alcanzado en cada aseveración se determinó por el valor de la mediana de la puntuación. Había consenso en el acuerdo si la mediana era ≥ 7 y había consenso en el desacuerdo si la mediana era ≤ 3 . Se consideró que no hubo consenso cuando las puntuaciones de un tercio o más de los panelistas ($\geq 33,3\%$) se situaban en el intervalo 1-3 y otro tercio o más en el intervalo 7-9. Cuando la mediana de la puntuación se situaba entre el intervalo 4-6, las aseveraciones eran consideradas como inciertas para una mayoría representativa del grupo.

RESULTADOS

CONSENSO DELPHI

De los 76 expertos consultados, 72 completaron la primera ronda y 66 la segunda ronda del consenso Delphi.

phi sin proponer nuevas aseveraciones. En la primera ronda se alcanzó consenso en 61 de las 92 aseveraciones, todas ellas en el acuerdo. Las 31 aseveraciones restantes que quedaron sin consensuar fueron reenviadas a los panelistas para su reconsideración en una segunda ronda, en la que 16 fueron consensuadas: 15 en el acuerdo y una en el desacuerdo. Tras 2 rondas, se alcanzó un consenso en 77 aseveraciones (83,7 %): 76 en el acuerdo (82,6 %) y una en el desacuerdo (1,1 %). Las 15 aseveraciones restantes (16,3 %) quedaron sin consensuar. La figura 1 muestra los resultados de las 2 rondas y las tablas I a V los resultados globales de todas las aseveraciones analizadas.

BLOQUE 1. IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN

De las 20 aseveraciones propuestas sobre identificación y evaluación de la osteoporosis, tras 2 rondas fueron consensuadas 18, todas ellas en el acuerdo (Tabla I).

Los panelistas se mostraron ampliamente de acuerdo con aspectos como la falta de concienciación o interés sobre la osteoporosis en atención primaria (82,9 % de acuerdo), la necesidad de estratificar a los pacientes según el riesgo de fractura (98,7 %) y la forma de evaluar este riesgo, teniendo en cuenta la densidad mineral ósea (DMO) y otros factores como la edad, el riesgo de caídas y otros factores clínicos (> 93 %).

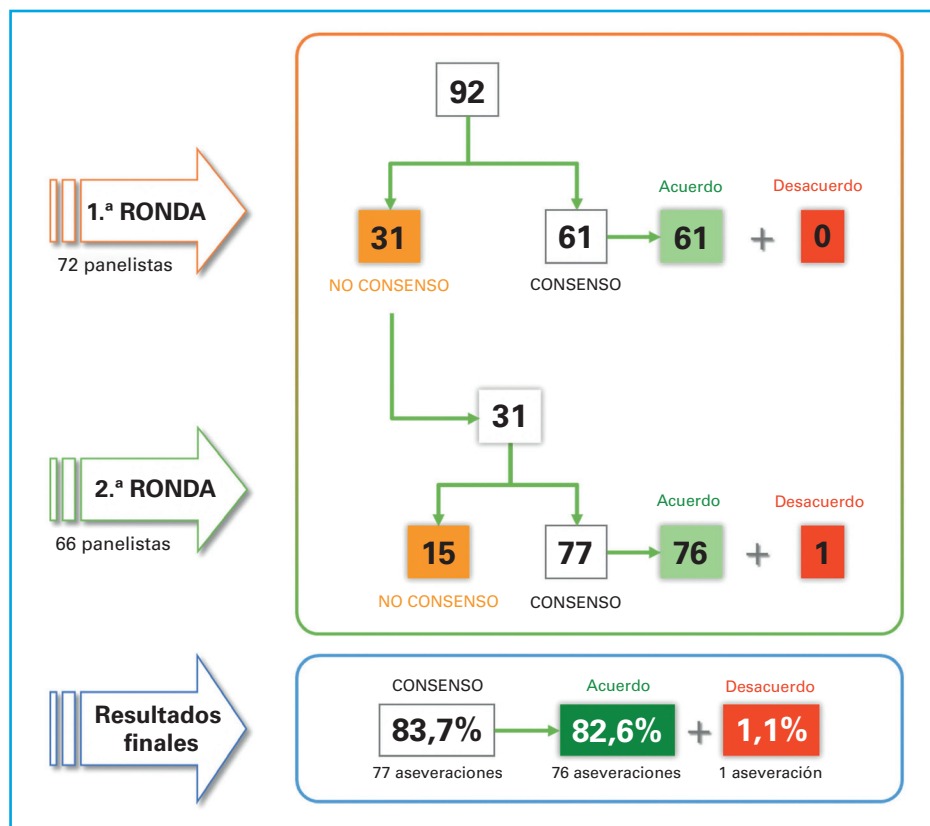


Figura 1. Resultados principales del consenso Delphi.

Tabla I. Resultados obtenidos por el panel de expertos tras dos rondas de consultas para el bloque de "Identificación y evaluación"

Aseveraciones	Me	IIQ	% acuerdo
1. Hay falta de concienciación de la osteoporosis, falta de interés o incluso desconocimiento de los protocolos existentes para su manejo en atención primaria	8	2	82,9 %
2. Es fundamental estratificar a los pacientes según el riesgo de fractura en muy alto, alto y moderado	9	1	98,7 %
3. La evaluación del riesgo de fractura por fragilidad tiene en cuenta tanto la densidad mineral ósea como los factores de riesgo clínicos	9	1	94,7 %
4. La evaluación del riesgo de fractura debe hacerse por edad y factores de riesgo	8	2	93,4 %
5. La evaluación del riesgo de caídas es relevante para la valoración del riesgo de fractura	8	2	96,1 %
6. La herramienta FRAX, con o sin evaluación de la densidad mineral ósea, es útil para clasificar a los pacientes según el riesgo de fractura	7	3	68,7 %
7. La herramienta FRAX es útil para evaluar el riesgo de fractura de cadera tanto en hombres como en mujeres	7	3	61,2 %
8. La herramienta FRAX infraestima el riesgo de fracturas osteoporóticas principales en España	7	3	72,4 %
9. La herramienta FRAX no debe sustituir el criterio y el juicio clínico del médico que valora todos los factores de riesgo del paciente en su conjunto	8	2	92,1 %
10. Se considera alto riesgo de fractura un valor de FRAX en fractura principal ≥ 10	7	5	69,7 %
11. Se considera alto riesgo de fractura un valor de FRAX de cadera ≥ 3	8	4	83,6 %
12. Se considera alto riesgo de fractura cuando existen al menos dos factores de riesgo clínicos fuertemente asociados a la fractura	8	2	85,5 %
13. Si existen factores de riesgo clínicos, la edad apropiada para realizar una densitometría ósea mediante DXA (absorciometría dual de rayos X) para medir el riesgo de fractura es a partir de los 50 años	7	6	67,2 %
14. La realización de una densitometría ósea mediante DXA (absorciometría dual de rayos X) debe realizarse a partir de los 65 años	6	6	55,2 %
15. En la evaluación del paciente con osteoporosis debe realizarse un estudio analítico encaminado a descartar causas secundarias	9	2	94,7 %
16. Los marcadores del recambio óseo (p. ej. CTX y P1NP) no son necesarios en la evaluación inicial del paciente con osteoporosis, pero si convenientes en caso de poder medirlos	7	3	76,1 %
17. La radiografía lateral de columna siempre es una prueba a tener en cuenta en la evaluación del riesgo de fractura	8	6	71,1 %
18. La existencia de una fractura por fragilidad debe ser evaluada y considerada como una fractura osteoporótica y tenida en cuenta para un posible tratamiento	9	1	98,7 %
19. La existencia de una fractura en los 2 últimos años actúa como un elemento multiplicador de más fracturas	9	2	94,7 %
20. Las Unidades de Coordinación de Fracturas (FLS, Fracture Liaison Services) intervienen tanto en la identificación como en la evaluación de los pacientes con fracturas por fragilidad	8	3	88,2 %

IIQ: intervalo intercuartílico; Me: mediana. Verde: consenso en el acuerdo; naranja: sin consenso.

Además, consideraron que la herramienta FRAX (*Fracture Risk Assessment Tool*) es útil para clasificar a los pacientes según el riesgo de fractura (68,7 %), pero que no debe sustituir el criterio y juicio clínico del médico, que valora todos los factores de riesgo en su conjunto (92,1 %). También coincidieron con que FRAX infraestima el riesgo de fracturas osteoporóticas principales en España (72,4 %). Sin embargo, no llegaron a un acuerdo sobre si la utilidad de FRAX era igual para evaluar el riesgo en varones o mujeres.

Acordaron que la DXA (absorciometría dual de rayos X) para medir el riesgo de fractura ósea debe hacerse a partir de los 50 años solo si existen factores de riesgo clínicos (67,2 %), pero no hubo consenso en hacerla de forma rutinaria o sistemática a partir de los 65 años.

En la evaluación de los pacientes, coincidieron en hacer un estudio analítico para descartar causas secundarias (94,7 %), en la utilidad de la radiografía lateral de

columna (71,1 %) y que los marcadores de recambio óseo no son necesarios, pero sí convenientes en caso de poder medirlos (76,1 %).

Hubo amplio consenso en el acuerdo en que las Unidades de Coordinación de Fracturas (FLS, *Fracture Liaison Services*) intervienen tanto en la identificación como en la evaluación de los pacientes con fracturas por fragilidad (88,2 %). Otros acuerdos relevantes fueron que la existencia de una fractura por fragilidad debe ser evaluada y considerada como fractura osteoporótica y tenida en cuenta para un posible tratamiento (98,7 %) y que la existencia de la fractura en los 2 últimos años actúa como elemento multiplicador de más fracturas (94,7 %).

BLOQUE 2. TRATAMIENTO

De las 47 aseveraciones propuestas sobre el tratamiento de la osteoporosis, 37 fueron consensuadas en el acuerdo. Las 10 aseveraciones restantes no fueron con-

sensuadas. Este bloque fue dividido en 6 subapartados (Tabla II).

La mayoría de las aseveraciones propuestas contaron con un apoyo amplio por parte de los panelistas, especialmente las relativas al ejercicio y duración del tratamiento (todas fueron acordadas) y aquellas sobre el inicio del tratamiento y las vacaciones terapéuticas (solo una aseveración de cada uno de estos subapartados quedó sin consensuar). Los panelistas mostraron mayor duda con las aseveraciones relativas a la farmacoterapia.

Se destacó el papel del ejercicio para mejorar el equilibrio y la fuerza, reducir las caídas y, con ello, reducir el riesgo de fracturas. También se coincidió en el papel que desempeña la suplementación con calcio, vitamina D y proteínas, salvo que se tenga una dieta equilibrada, pero no hubo consenso sobre la utilidad de la suplementación con vitamina K y magnesio o el papel que puede desempeñar el aporte de proteínas para consolidar una fractura y conseguir una recuperación más rápida.

Tabla II. Resultados obtenidos por el panel de expertos tras dos rondas de consultas para el bloque de "Tratamiento"

Aseveraciones	Me	IIQ	% acuerdo
Ejercicio			
21. La actividad física de baja intensidad (como yoga, pilates o caminar) puede mejorar el equilibrio y la fuerza, reducir las caídas y, en consecuencia, disminuir las fracturas	8,5	2	96,1 %
22. El efecto del aporte de proteínas aislado es inferior del efecto del aporte de proteínas junto a un plan de ejercicios en cuanto al rendimiento físico	8	2	92,5 %
23. El efecto del aporte de proteínas aislado tiene un efecto inferior al aporte de proteínas junto a un plan de ejercicios en cuanto a la fuerza muscular en personas mayores	8	2	94,7 %
Nutrición			
24. El aporte necesario de calcio debe ser de entre 800-1200 mg al día	8	3	88,2 %
25. La ingesta diaria de calcio inferior a 2000 mg no aumenta el riesgo cardiovascular	7	4	74,6 %
26. La suplementación con calcio, vitamina D o proteínas probablemente tenga poco efecto en el riesgo de fracturas en personas con una dieta equilibrada sin déficit en ninguno de los tres elementos	8	3	80,6 %
27. Se debe suplementar con al menos 800 UI de vitamina D diarios a la población mayor de 65 años con riesgo de fractura y a aquellas personas con déficit de vitamina D, exposición solar limitada o un aporte inadecuado de calcio (< 700-800 mg diarios)	8	1	90,8 %
28. El calcio debe obtenerse principalmente a través de la dieta, fundamentalmente de productos lácteos	8	3	85,5 %
29. La suplementación con vitamina K y magnesio no es útil para la prevención de fracturas por fragilidad	7	5	61,2 %
30. El aporte necesario de proteínas debe ser de 1-1,5 g/kg de peso al día	8	3	81,6 %
31. La suplementación con proteínas consolida la fractura y permite una recuperación más rápida	6	4	47,8 %
Farmacoterapia			
32. Todos los tratamientos farmacológicos deben ir acompañados de un suplemento de calcio y vitamina D	8	3	80,3 %

(Continúa en página siguiente)

Tabla II (cont.). Resultados obtenidos por el panel de expertos tras dos rondas de consultas para el bloque de "Tratamiento"			
Aseveraciones	Me	IIQ	% acuerdo
Farmacoterapia			
33. Los beneficios del tratamiento farmacológico, en cuanto a eficacia antifractura o incremento de densidad mineral ósea, son iguales en mujeres que en hombres con osteoporosis primaria	6	5	53,7 %
34. Todos los tratamientos para la osteoporosis con indicación en hombres también lo tienen en mujeres, pero no todos los indicados para mujeres están aprobados en hombres	8	4	85,1 %
35. Todos los tratamientos para la osteoporosis tienen indicación para el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides	2	3	19,4 %
36. La mayoría de las mujeres posmenopáusicas < 65 años con baja masa ósea y sin fracturas y sin otros factores de riesgo de fractura no requiere tratamiento farmacológico	6	5	55,2 %
37. La eficacia de todos los osteoformadores es similar cuando el riesgo de fractura es muy alto	6	6	41,8 %
38. La eficacia de todos los antirresortivos es similar en cuanto a la mejoría de la densidad mineral ósea y la reducción del riesgo de fractura cuando el riesgo de fractura es muy alto	4	5	28,4 %
39. En pacientes oncológicos hay que tener en cuenta las contraindicaciones de los fármacos anabólicos	8	2	90,8 %
40. La opción más adecuada en pacientes > 75 años con fractura de cadera es un antirresortivo parenteral (intravenoso o subcutáneo) antes que un anabólico	5	6	41,8 %
41. La opción más adecuada en pacientes > 75 años con fractura vertebral grave o varias fracturas vertebrales es un anabólico antes que un antirresortivo	7	4	69,7 %
42. El riesgo de osteonecrosis mandibular es bajo con los antirresortivos utilizados para el tratamiento de la osteoporosis	8	4	80,3 %
43. El riesgo de osteonecrosis mandibular en los pacientes tratados con bifosfonatos intravenosos y en los pacientes oncológicos aumenta con el periodo de exposición a bisfosfonatos y con la dosis	8	4	82,9 %
Inicio del tratamiento			
44. La elección del fármaco con el que iniciar el tratamiento para la osteoporosis debe realizarse en base a la estratificación del riesgo de fractura	8	3	88,2 %
45. Tras una fractura por fragilidad, el diagnóstico de osteoporosis e inicio de tratamiento ha de hacerse tan pronto como el episodio agudo sea resuelto	8	5	82,9 %
46. El inicio del tratamiento frente a la osteoporosis debe ser consensado entre médico y paciente en mujeres posmenopáusicas < 65 años con valores de T-score < -3,0	8	2	88,1 %
47. El inicio del tratamiento frente a la osteoporosis debe ser consensado entre médico y paciente en mujeres posmenopáusicas < 65 años con fractura de radio distal, especialmente si hay dudas respecto a la intensidad del traumatismo	8	4	80,6 %
48. El inicio del tratamiento frente a la osteoporosis debe ser consensado entre médico y paciente en pacientes con deformidades vertebrales de grado 1, que no siempre son fáciles de interpretar como fracturas	8	4	79,1 %
49. Deben ser tratados aquellos pacientes que presentan una fractura por fragilidad independientemente de la densidad mineral ósea	8	3	85,5 %
50. Deben ser tratados aquellos pacientes con una T-score ≤ -2,5 en columna, cuello femoral o cadera total y con una edad ≥ 70 años	7	3	73,7 %
51. Deben ser tratados aquellos pacientes con un valor de FRAX principal ≥ 10	7	3	69,7 %
52. Deben ser tratados aquellos pacientes con un valor de FRAX de cadera ≥ 3	7	4	68,4 %
53. Deben ser tratados aquellos pacientes con osteopenia (particularmente si la T-score es ≤ -2,0) que presentan, además, alto riesgo clínico de fractura (2 factores de riesgo clínico fuertemente asociados a fractura, FRAX principal ≥ 10 y FRAX de cadera ≥ 3)	8	3	84,2 %

(Continúa en página siguiente)

Tabla II (cont.). Resultados obtenidos por el panel de expertos tras dos rondas de consultas para el bloque de "Tratamiento"

Aseveraciones	Me	IIQ	% acuerdo
Inicio del tratamiento			
54. Aquellos pacientes que reciben glucocorticoides de manera crónica (el equivalente a ≥ 5 mg/día de prednisona durante más de 3 meses) deben ser tratados con fármacos antiosteoporóticos	7,5	5	67,1 %
55. Las mujeres que reciben inhibidores de la aromatasa por cáncer de mama siempre deben ser tratadas con fármacos antiosteoporóticos si presentan factores de riesgo de fractura	8	6	77,6 %
56. Los varones bajo privación hormonal (antiandrógenos y análogos de la GnRH) por cáncer de próstata siempre deben ser tratados con fármacos antiosteoporóticos si presentan factores de riesgo de fractura	7	3	65,7 %
57. En ausencia de contraindicación o intolerancia, el tratamiento de elección en el paciente con riesgo moderado o alto de fractura (pero no de muy alto riesgo) en el que se inicia la terapia antiosteoporótica son los bisfosfonatos orales	8	4	79,1 %
58. En pacientes de muy alto riesgo de fractura, el tratamiento de elección preferente sería la terapia secuencial con inicio de un fármaco anabólico seguido de un antirresortivo	8	4	80,3 %
Duración del tratamiento			
59. La duración inicial del tratamiento dependerá del riesgo del paciente y del fármaco empleado	8	2	93,4 %
60. La duración del tratamiento ha de tener en cuenta la cronicidad de la osteoporosis	8	2	92,1 %
Vacaciones terapéuticas			
61. El riesgo de fractura atípica de fémur aumenta conforme aumenta el periodo de exposición a antirresortivos, pero disminuye rápidamente (un año) al interrumpir el tratamiento	7	5	67,2 %
62. Durante las vacaciones terapéuticas (de en torno a 2 años) de los bisfosfonatos no hay un incremento en la incidencia de fracturas	5	5	43,3 %
63. Las vacaciones terapéuticas no son obligatorias, sino una opción en aquellos pacientes que han recibido tratamiento con bisfosfonatos durante 5 años y que continúan con un riesgo moderado de fractura	8	2	78,9 %
64. Las vacaciones terapéuticas se recomiendan solamente en pacientes tratados con bisfosfonatos orales o intravenosos, no con osteoformadores u otros antirresortivos	8	4	73,7 %
65. No se recomiendan las vacaciones terapéuticas en aquellos pacientes que han recibido bisfosfonatos durante 5 años y que continúan con un riesgo alto de fractura	8	3	82,9 %
66. La interrupción temporal del tratamiento con bisfosfonatos se plantea en aquellos pacientes con ausencia de fractura incidente y <i>T-score</i> > -2,5 en el cuello femoral	8	3	75,0 %
67. En el caso de tener que interrumpir el tratamiento o durante unas vacaciones terapéuticas se recomienda repetir la DXA (absorciometría dual de rayos X) y la evaluación clínica	8	4	80,3 %

IIQ: intervalo intercuartílico; Me: mediana. Verde: consenso en el acuerdo; naranja: sin consenso.

Sobre la farmacoterapia, se consensuó el acompañar los tratamientos farmacológicos con calcio y vitamina D (80,3 % de acuerdo), que no todos los tratamientos indicados para mujeres tienen indicación para hombres (85,1 %), el tener en cuenta las contraindicaciones de los fármacos anabólicos en los pacientes oncológicos (90,8 %), el uso de anabólicos antes que antirresortivos en > 75 años con fractura vertebral grave o varias fracturas vertebrales (69,7 %) y que el riesgo de osteonecrosis mandibular con el uso de antirresortivos es bajo (80,3 %), pero que aumenta con la exposición y la dosis de bisfosfonatos en los pacientes tratados con bisfosfonatos intravenosos y en los pacientes on-

cológicos (82,9 %). Por el contrario, no hubo consenso sobre numerosos aspectos, como que los beneficios del tratamiento farmacológico, en cuanto a eficacia antifractura o incremento de DMO, son iguales en mujeres y hombres con osteoporosis primaria; que todos los tratamientos para la osteoporosis tienen indicación para el tratamiento de la osteoporosis inducida por glucocorticoides; que la mayoría de las mujeres posmenopáusicas < 65 años con baja masa ósea y sin fracturas y sin otros factores de riesgo de fractura no requiere tratamiento farmacológico; que la eficacia de todos los osteoformadores es similar cuando el riesgo de fractura es muy alto; que la eficacia de todos los

antirresortivos es similar en cuanto a la mejoría de la DMO y la reducción del riesgo de fractura cuando el riesgo de fractura es muy alto; y que la opción más adecuada en pacientes > 75 años con fractura de cadera es un antirresortivo parenteral (intravenoso o subcutáneo) antes que un anabólico.

Respecto al inicio del tratamiento, en la mayoría de las aseveraciones consensuadas se coincidió en la necesidad de estratificar el riesgo de fractura y comenzar a administrarlo tan pronto como sea posible si hay una fractura por fragilidad, además de consensuarlo entre el médico y los pacientes en aquellos casos donde la evidencia de indicación es más dudosa, es decir, mujeres posmenopáusicas < 65 años con fractura de radio distal, con deformidad vertebral grado 1 y mujeres < 65 años pero con *T-score* < -3,0 (79,1-88,2 %). También se consensuó que el inicio del tratamiento debe hacerse en todos aquellos pacientes con fractura por fragilidad, independientemente de la DMO; con 2 factores de riesgo fuertemente asociados a fractura; con *T-score* ≤ -2,5 en columna, cuello femoral o cadera total y ≥ 70 años; con una puntuación FRAX para fractura principal ≥ 10 y de cadera ≥ 3; en aquellos que reciben glucocorticoides de forma crónica; y en mujeres con inhibidores de la aromatasas por cáncer de mama y factores de riesgo de fractura (67,1-85,5 %). Así mismo, se consensuó usar bisfosfonatos orales en pacientes con riesgo moderado o alto de fractura (79,1 %) y la preferencia de terapia secuencial (anabólico seguido de un antirresortivo) en pacientes de muy alto riesgo

(80,3 %). Se estuvo muy cerca del consenso sobre la administración de antiosteoporóticos a pacientes con cáncer de próstata bajo privación hormonal si hay factores de riesgo de fractura.

Sobre la duración del tratamiento, se consensuó el tener en cuenta la cronicidad de la osteoporosis (92,1 %) y que dependerá del riesgo del paciente y del fármaco empleado (93,4 %).

Finalmente, respecto a las vacaciones terapéuticas, los panelistas se mostraron de acuerdo con que solo son opcionales en aquellos casos en los que se hayan administrado bisfosfonatos durante 5 años y tengan un riesgo moderado de fractura (78,9 %). No las consideraron indicadas en caso de recibir osteoformadores u otros antirresortivos (73,7 %) o si el paciente ha recibido bisfosfonatos durante < 5 años y tiene un riesgo alto de fractura (82,9 %). Además, se acordó repetir la DXA y la evaluación clínica en caso de interrumpir el tratamiento (80,3 %). No hubo consenso sobre que no haya un incremento en la incidencia de fracturas durante los 2 años de vacaciones terapéuticas de los bisfosfonatos.

BLOQUE 3. MONITORIZACIÓN Y SEGUIMIENTO

De las 8 aseveraciones sobre la monitorización y seguimiento de los pacientes con osteoporosis, 6 fueron consensuadas en el acuerdo (Tabla III).

Tabla III. Resultados obtenidos por el panel de expertos tras dos rondas de consultas para el bloque de "Monitorización y seguimiento"

Aseveraciones	Me	IIQ	% acuerdo
68. No existe evidencia suficiente para respaldar el uso clínico de marcadores de recambio óseo para monitorizar el riesgo de fractura en aquellos pacientes con tratamiento antiosteoporótico	7	5	67,1 %
69. No existe evidencia suficiente para respaldar el uso clínico de marcadores de recambio óseo para predecir fracturas en aquellos pacientes que inician vacaciones terapéuticas con bisfosfonatos	7	6	62,7 %
70. El empleo de marcadores de recambio óseo puede ayudar a conocer el grado de cumplimiento del tratamiento por el paciente	7	3	68,4 %
71. Una densitometría ósea mediante DXA (absorciometría dual de rayos X) y una analítica de sangre son suficientes para hacer el seguimiento de pacientes con osteoporosis	7	6	67,1 %
72. Tras una fractura de cadera hay un menor tratamiento antiosteoporótico del necesario debido al escaso seguimiento de los pacientes al alta	7,5	3	76,3 %
73. Tras una fractura, la monitorización temprana de la densidad mineral ósea (antes de los tres años de tratamiento) tiene un valor limitado en la predicción de las respuestas al tratamiento con antirresortivos, aunque tiene más valor con agentes osteoformadores	6	4	56,7 %
74. Para detectar cambios en la densidad mineral ósea con antirresortivos las pruebas han de hacerse con un intervalo lo suficientemente largo (aproximadamente cada 3-5 años)	7	5	67,1 %
75. La evaluación, el tratamiento y el seguimiento han de hacerse de forma compartida entre las Unidades de Coordinación de Fracturas (FLS, Fracture Liaison Services) (o en su ausencia, el especialista de metabolismo óseo) y en atención primaria	8	3	88,2 %

IIQ: intervalo intercuartílico; Me: mediana. Verde: consenso en el acuerdo; naranja: sin consenso.

Los panelistas se mostraron de acuerdo con que no hay suficiente evidencia para respaldar el uso de biomarcadores de recambio óseo para monitorizar el riesgo de fracturas en pacientes bajo tratamiento antiosteoporótico (67,1 % de acuerdo), pero no hubo consenso sobre su uso para predecir fracturas en pacientes durante las vacaciones terapéuticas con bisfosfonatos. Sí hubo consenso sobre la utilidad de estos marcadores para conocer el grado de cumplimiento terapéutico del paciente (68,4 %).

Se mostraron de acuerdo sobre que la DXA y la analítica de sangre son suficientes para hacer el seguimiento, en el caso de la DXA en intervalos lo suficientemente largos de tres a 5 años (67,1 %), y también coincidieron con que hay un escaso seguimiento de los pacientes al alta (76,3 %). No hubo consenso sobre que la monitorización temprana con DXA (antes de los 3 años) tiene un valor limitado en la predicción de la respuesta al tratamiento con antirresortivos, pero más valor con los osteoformadores.

Hubo un amplio acuerdo en que la evaluación, tratamiento y seguimiento ha de hacerse de forma comparada entre las FLS (o en su ausencia, el especialista de metabolismo óseo) y atención primaria (88,2 %).

BLOQUE 4. CRITERIOS DE DERIVACIÓN

De las 11 aseveraciones propuestas sobre la derivación de pacientes con osteoporosis, 9 fueron consensuadas en el acuerdo y una en el desacuerdo (Tabla IV).

Los panelistas se mostraron en contra de que la derivación de los pacientes desde atención hospitalaria a una consulta no presencial de atención primaria sea suficiente (67,2 % de desacuerdo y 10,4 % de acuerdo). Tampoco hubo consenso en considerar al paciente candidato/susceptible de prevención secundaria de fractura como criterio de derivación entre atención primaria y hospitalaria.

Los panelistas se mostraron de acuerdo con el resto de criterios de derivación propuestos, como la sospecha de osteoporosis secundaria y la respuesta inadecuada al tratamiento (93,4 %) y contemplar una e-consulta específica de osteoporosis además de la presencial (93,4 %). También coincidieron en la necesidad de coordinación entre atención primaria y hospitalaria (97,4 %) y que la primera consulta tras el alta hospitalaria siempre se haga de forma presencial en atención primaria (83,6 %).

Tabla IV. Resultados obtenidos por el panel de expertos tras dos rondas de consultas para el bloque de "Criterios de derivación"

Aseveraciones	Me	IIQ	% acuerdo
76. Es necesario establecer criterios de coordinación y derivación consensuados entre atención primaria y atención hospitalaria	9	1	97,4 %
77. Para la coordinación entre atención hospitalaria y atención primaria debe contemplarse la idoneidad de disponer de una e-consulta específica de osteoporosis, además de la posibilidad de derivación presencial	9	1	93,4 %
78. La derivación de los pacientes desde atención hospitalaria a una consulta no presencial de atención primaria es suficiente	2	2	10,4 %
79. La derivación de los pacientes desde atención hospitalaria siempre ha de hacerse a una consulta presencial de atención primaria, al menos la primera visita tras el alta hospitalaria	8	5	83,6 %
80. Es un criterio de derivación entre atención primaria y atención hospitalaria la sospecha de osteoporosis secundaria	9	2	93,4 %
81. Es un criterio de derivación entre atención primaria y atención hospitalaria la osteoporosis juvenil	9	1	98,7 %
82. Es un criterio de derivación entre atención primaria y atención hospitalaria la respuesta inadecuada al tratamiento (no debida a la falta de cumplimiento) con progresión significativa de la pérdida de densidad mineral ósea o nuevas fracturas	9	2	93,4 %
83. Es un criterio de derivación entre atención primaria y atención hospitalaria la presencia de efectos secundarios/contraindicaciones al tratamiento que dificultan el manejo terapéutico	8	4	86,8 %
84. Es un criterio de derivación entre atención primaria y atención hospitalaria la presencia de patologías concomitantes que hacen que los pacientes sean especialmente complejos para su manejo terapéutico	8	3	84,2 %
85. Es un criterio de derivación entre atención primaria y atención hospitalaria el que un paciente sea candidato/susceptible de prevención secundaria de fractura	7	6	64,2 %
86. Es un criterio de derivación entre atención primaria y atención hospitalaria una fractura vertebral aguda sintomática difícil de controlar con tratamiento analgésico habitual	8	2	89,5 %

IIQ: intervalo intercuartílico; Me: mediana. Verde: consenso en el acuerdo; rojo: consenso en el desacuerdo; naranja: sin consenso.

Tabla V. Resultados obtenidos por el panel de expertos tras dos rondas de consultas para el bloque de "Punto de vista del paciente"

Aseveraciones	Me	IIQ	% acuerdo
87. Es necesario saber el conocimiento que tiene el paciente de su patología para mejorar los resultados del tratamiento	9	2	94,7 %
88. Es importante garantizar la información se le da al paciente y en qué formato	9	1	98,7 %
89. Hay que asegurarse de que el paciente ha entendido todo lo que se le ha explicado sobre su tratamiento y autocuidados	9	1	98,7 %
90. Siempre se ha de tener en cuenta al paciente en la toma de decisiones para que sean compartidas	9	1	97,4 %
91. Siempre hay que valorar de forma periódica el cumplimiento y persistencia del tratamiento por parte del paciente	9	1	98,7 %
92. Los programas de atención al paciente en el tratamiento de la osteoporosis son muy importantes	9	1	96,1 %

IIQ: intervalo intercuartílico; Me: mediana. Verde: consenso en el acuerdo.

BLOQUE 5. PUNTO DE VISTA DEL PACIENTE

Las 6 aseveraciones sobre la derivación de pacientes con osteoporosis fueron consensuadas en el acuerdo (Tabla V).

Casi todos los panelistas se mostraron de acuerdo con que es necesario saber qué conocimiento tiene el paciente sobre su patología, en garantizar la información que se le aporta, en asegurarse que lo ha entendido todo y en tenerle en cuenta a la hora de tomar decisiones compartidas (> 94 % de acuerdo). Además, coincidieron en que siempre ha de hacerse una evaluación periódica del cumplimiento y la persistencia del tratamiento que hace el paciente (98,7 %) y destacaron el papel importante que desempeñan los programas de atención al paciente en el tratamiento de la osteoporosis (96,1 %).

DISCUSIÓN

Los resultados de este consenso Delphi muestran un alto grado de acuerdo entre especialistas de atención primaria y otras especialidades con especial interés en osteoporosis en relación con su identificación y tratamiento. Se alcanzó consenso en 77 de las 92 aseveraciones propuestas (83,7 %). Se observó una considerable dificultad en la identificación de los pacientes, especialmente en la detección de fracturas vertebrales en el contexto de la atención primaria. Sin embargo, el nivel de acuerdo alcanzado entre los expertos es notable teniendo en cuenta la existencia de numerosas guías clínicas que, aunque proporcionan recomendaciones prácticas, a menudo difieren entre sí. Esta variabilidad, junto con la baja evidencia o la controversia en algunas de las recomendaciones, puede generar confusión entre los profesionales sanitarios, particularmente aquellos con menor especialización en el área de la osteoporosis.

La osteoporosis, a pesar de su alta prevalencia y consecuencias graves, sigue siendo una patología infradiagnosticada e infratratada. En España, los estudios muestran que la mayoría de los pacientes con fractura de cadera no recibe tratamiento específico óseo: en 2021, solo el 23,7 % contaba con algún tratamiento farmacológico para la osteoporosis (9). Desde 2010, la brecha de tratamiento en pacientes con osteoporosis ha crecido un 25 % (10) y, en 2022, el estudio PREFRAOS llevado a cabo en el ámbito de la atención primaria, confirmó un bajo diagnóstico y tratamiento, especialmente en hombres (11). Por ello, es esencial establecer líneas generales de actuación que faciliten el manejo adecuado de estos pacientes, unificando criterios para que todos los médicos de atención primaria trabajen bajo un mismo enfoque y protocolo y promoviendo la coordinación entre médicos especialistas de atención primaria y del segundo nivel asistencial. Este consenso entre expertos trata de establecer unas recomendaciones comunes.

En el diagnóstico, todos los expertos están en consonancia con las guías nacionales e internacionales (1,2,12), coincidiendo en que es fundamental estratificar a los pacientes según el riesgo de fractura, clasificándolos en muy alto, alto y moderado. Para ello, es útil utilizar la herramienta FRAX, independientemente de si se ha realizado o no una evaluación de la DMO. Según el estudio SCOOP, el cribado de pacientes mediante FRAX en prevención primaria fue eficaz en la prevención de fractura de cadera, siendo además coste-efectiva (13,14). Sin embargo, en el contexto de la prevención secundaria, ante la presencia de una fractura, el inicio de tratamiento está justificado sin requerir una evaluación de la DMO o la aplicación de FRAX. Se debe tener en cuenta que FRAX puede infradiagnosticar el riesgo de fractura osteopórotica principal en España (pero no la de cadera) (1), por lo que nunca debe sustituir el juicio clínico del médico, quien debe considerar todos los factores de riesgo del paciente en su conjunto y personalizar el diagnóstico. Los expertos

no llegaron a un acuerdo en cuanto a que la utilidad del FRAX sea igual en hombres que en mujeres. La literatura científica indica que, aunque FRAX considera factores de riesgo clínicos y DMO de forma similar en ambos sexos, la mayoría de los estudios en los que se evaluó la herramienta incluyeron mayoritariamente a mujeres (2,15), siendo su uso más habitual en mujeres posmenopáusicas (3). FRAX predice de manera comparable el riesgo de fractura en adultos mayores, pero puede subestimarlos en mujeres jóvenes de > 40 años con factores de riesgo, en hombres con alta DMO (16) y en pacientes que son tratados con glucocorticoides o tienen antecedentes de fracturas (17). A día de hoy, FRAX infravalora dosis altas de glucocorticoides o puntúa por igual el tener más o menos fracturas osteoporóticas previas. El desarrollo de FRAXPLUS introduce algunos matices que permite solventar estas limitaciones (16).

Para el tratamiento de los pacientes con osteoporosis, las guías recomiendan una combinación de medidas no farmacológicas y tratamientos farmacológicos (1,2,12). La incorporación de un estilo de vida saludable (evitando fumar y el consumo moderado de alcohol) (2), la práctica de ejercicio físico regular y una nutrición adecuada contribuyen a la adquisición de un mayor pico de masa ósea durante el desarrollo y a mantenerla después (3,15). Los expertos recomiendan realizar actividad física de baja intensidad, ya que mejora el equilibrio y la fuerza y, por tanto, disminuye el riesgo de caídas y una potencial fractura. Además, en combinación con el aporte proteico, ayuda a mejorar el rendimiento físico y a aumentar la fuerza muscular en personas mayores. En cuanto a la nutrición, recomiendan una ingesta adecuada de calcio (800-1200 mg/día), proteínas (1-1,5 g/kg de peso al día) y vitamina D (al menos 800 UI/día) con la dieta, pero en caso de no alcanzar estas cantidades, habría que ajustarlas con suplementos. Sin embargo, los expertos no llegan a ponerse de acuerdo sobre la utilidad de la suplementación con vitamina K y magnesio en la prevención de fracturas. La evidencia sobre el impacto de la vitamina K en la salud ósea es limitada y contradictoria (3). Algunos estudios sugieren que una dosis de 1 mg/día podría reducir el recambio óseo en mujeres posmenopáusicas (12). Sin embargo, existen revisiones sistemáticas que no encuentran efectos significativos sobre las fracturas vertebrales ni la DMO en esta población (18). En cuanto al magnesio, no se han realizado estudios clínicos que evalúen su efecto en el riesgo de fracturas o en la DMO y la mayoría de las personas consumen cantidades adecuadas de este nutriente a través de la dieta (12).

En relación con el tratamiento farmacológico, todos los expertos están alineados con las guías europeas (1,2) y están de acuerdo en que la propuesta terapéutica de la osteoporosis se fundamenta en la estratificación del riesgo de fractura. En aquellos pacientes con muy alto riesgo de fractura se recomienda el uso de osteoformadores u osteoanabólicos, como teriparatida, romosozu-

mab y abaloparatida, recientemente disponible en Europa y España (11,12,19). En el caso de los pacientes con alto riesgo de fractura, el tratamiento recomendado incluye antirresortivos, como los bisfosfonatos y denosumab (20). Debido a la cronicidad de la osteoporosis, su tratamiento debe plantearse a medio y largo plazo. Por ello, la propuesta en los pacientes de muy alto riesgo de fractura, o riesgo inminente de fractura, es la terapia secuencial, iniciando con un osteoformador, como teriparatida, abaloparatida o romosozumab y, posteriormente, continuando con un antirresortivo, como los bisfosfonatos o denosumab (1,2,12). En el caso de que algún tratamiento no pudiera prescribirse en atención primaria, el paciente debería ser derivado a atención hospitalaria para su valoración.

Las guías de práctica clínica sugieren que, y los expertos están de acuerdo con ello, tras completar un ciclo de osteoformadores se debe continuar el tratamiento con un antirresortivo para mantener o incrementar la ganancia de DMO y, por ende, reducir el riesgo de fractura. Para los pacientes de alto riesgo que acuden a la consulta, las guías y algoritmos terapéuticos recomiendan los bisfosfonatos como primera línea terapéutica, reservando denosumab para aquellos pacientes en los que los bisfosfonatos están contraindicados o no son tolerados (4). Sin embargo, los expertos no llegan a ponerse de acuerdo en relación a la eficacia de los tratamientos antirresortivos en pacientes de muy alto riesgo y en si se deberían elegir antirresortivos parenterales más potentes. Según lo publicado en la literatura, denosumab fue más eficaz que los bisfosfonatos en mejorar la DMO en el cuello femoral, la cadera y la columna lumbar (21,22), pero los resultados son menos contundentes o contradictorios respecto al riesgo de fracturas (21,22). Por un lado, se ha visto que la reducción del riesgo de fracturas es comparable entre ácido zoledrónico y denosumab (23). Por otro lado, un estudio reciente llevado a cabo en situaciones de práctica clínica real demostró que denosumab conseguía una mayor reducción del riesgo de fractura que alendronato (20). En cualquier caso, en la práctica clínica se siguen las recomendaciones de las guías pautando los bisfosfonatos como primera opción en la mayoría de los pacientes con riesgo moderado o alto y en prevención primaria.

Asimismo, los osteoformadores tampoco son iguales en su eficacia y mecanismo de acción. Se ha visto que mujeres posmenopáusicas tratadas con abaloparatida experimentaban mayores aumentos de DMO que las tratadas con teriparatida o placebo (24,25). También se ha comprobado que romosozumab es superior a otros osteoformadores como la teriparatida en la mejora de la DMO, pero no hubo diferencias significativas en cuanto a la reducción del riesgo de fracturas (26). Esta ventaja de romosozumab en términos de DMO podría explicarse por su doble mecanismo de acción: actúa tanto en la formación ósea como en la reducción de la resorción ósea (27,28).

Los resultados del consenso también mostraron que los expertos no llegan a ponerse de acuerdo en cuanto a la eficacia del tratamiento farmacológico en función del sexo. La literatura científica evidencia que los bisfosfonatos, denosumab y teriparatida son eficaces en ambos sexos, aunque la mayor parte de los estudios se han realizado en mujeres posmenopáusicas (2,15) y sus resultados han sido extrapolados a los hombres bajo el supuesto de que son comparables (3). En el caso de alendronato, risedronato, zoledronato y teriparatida, se han encontrado beneficios específicos en fracturas vertebrales en hombres, y denosumab es eficaz en hombres con terapia de privación de andrógenos (1,29).

Los expertos están de acuerdo en que el tratamiento con osteoformadores tiene una duración específica: teriparatida se administra durante 24 meses (30), abaloparatida durante 18 meses (31) y romosozumab durante 12 meses (32). Una vez completado este periodo, y con la evidencia actual disponible, no se pueden dar más ciclos, ya que ni teriparatida ni abaloparatida pueden administrarse de nuevo, al menos en España (30,31). Aunque se discutió la posibilidad de utilizar más ciclos con romosozumab, actualmente solo existe un estudio fase II que aborda esta opción (33). Estos tratamientos están indicados para pacientes con muy alto riesgo de fractura que posteriormente deberían ser tratados con un antirresortivo: bisfosfonatos o denosumab. La principal controversia surgió sobre cuándo iniciar el uso de antirresortivos y durante cuánto tiempo. En este sentido, es necesario llegar a una recomendación común. En donde no hay duda es sobre las vacaciones terapéuticas, que solo pueden valorarse en pacientes de riesgo moderado que han sido tratados con bisfosfonatos (4).

Otro aspecto a considerar en el manejo terapéutico, y que supone un reto para el médico de atención primaria, es mantener un buen cumplimiento o adhesión al tratamiento en el paciente con osteoporosis. Para conseguir el beneficio esperado del tratamiento, la adhesión debería ser superior al 50 % como mínimo e idealmente > 70 % (19,34). El grado de adhesión o persistencia de los tratamientos farmacológicos en la osteoporosis puede variar entre 10-80 % (35-37). No obstante, varios estudios han puesto de manifiesto que la adhesión al tratamiento de la osteoporosis es generalmente baja y que en el primer año el porcentaje de abandonos se encuentra entre 30-50 % en la mayor parte de los casos (38). Por ello, es de vital importancia poner todos los medios disponibles para mejorar el cumplimiento terapéutico del paciente. Los médicos perciben que la baja adhesión terapéutica está asociada fundamentalmente a la falta de comunicación con los pacientes o entre profesionales, los efectos secundarios y la vía de administración de los fármacos (39). En este sentido, los expertos están de acuerdo en que los resultados del tratamiento mejoran asegurándose de que el paciente comprende la información sobre su

enfermedad y haciéndole partícipe de las decisiones terapéuticas. Asimismo, para obtener resultados positivos en el tratamiento, resulta beneficioso la comunicación entre profesionales (FLS, médicos especialistas de primer o segundo nivel asistencial) y la posibilidad de disponer de una e-consulta específica de osteoporosis. Los expertos recomiendan valorar de manera periódica el grado de cumplimiento del paciente. Por otra parte, la evidencia científica muestra cómo los tratamientos administrados con menor frecuencia, como los bisfosfonatos de dosis semanal o mensual, y denosumab de forma semestral, tienden a mejorar la adhesión en comparación con las dosis diarias. Esto es debido a la comodidad percibida por los pacientes y a que hay una menor interrupción del tratamiento, aumentando así su efectividad a largo plazo (40). Diversos estudios han demostrado que la administración de fármacos por vía parenteral mejora la adhesión en comparación con la vía oral (41,42). Estos aspectos deben ser tenidos en cuenta por los clínicos para garantizar un buen cumplimiento del tratamiento (43).

Los expertos están de acuerdo en la importancia del seguimiento del paciente por parte del médico de atención primaria debido a la naturaleza crónica de la patología. Tras el alta hospitalaria, siempre se debe hacer una consulta presencial con el médico de atención primaria. Además, la mayor parte de los criterios de derivación de pacientes desde la consulta de atención primaria a la atención hospitalaria están en consonancia con las guías nacionales e internacionales (12).

Este consenso Delphi presenta varias limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. La naturaleza cualitativa del método puede introducir sesgos subjetivos y aunque se busca representar diversas especialidades, la selección de expertos puede no abarcar toda la experiencia clínica en el manejo de la osteoporosis, por lo que los resultados deben interpretarse con cautela.

Por último, es fundamental establecer recomendaciones para el manejo de los pacientes con osteoporosis que sean unificadas para todas las sociedades médicas y accesibles a todo el colectivo de atención primaria para evitar el infradiagnóstico y el infratratamiento. Estas recomendaciones deben incluir la evaluación del riesgo de fractura, la implementación de medidas preventivas, la selección adecuada del tratamiento y un seguimiento apropiado del paciente. Además, es importante ofrecer formación específica a los médicos de atención primaria para mejorar su conocimiento sobre la enfermedad, así como más recursos diagnósticos y terapéuticos, ya que les permitirá realizar un manejo más efectivo de la osteoporosis y sus complicaciones.

Este consenso Delphi pone de manifiesto la urgente necesidad de unificar criterios en el abordaje clínico de la osteoporosis en España, donde la brecha en el diagnóstico y el tratamiento sigue en aumento. La

elevada concordancia en las recomendaciones entre especialistas establece una base sólida para alinear a todos los profesionales sanitarios hacia una atención más consistente y efectiva para esta enfermedad crónica. El consenso propone pautas claras para la prevención, selección terapéutica y seguimiento del paciente, fomentando una mejor comunicación y adhesión al tratamiento. Estos resultados representan una oportunidad para transformar el manejo de la osteoporosis y optimizar los resultados clínicos a través de una estrategia coordinada y basada en evidencia científica

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a las siguiente sociedades y fundaciones médicas, que fueron las impulsoras de este proyecto: Fundación Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (FEIOMM), Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM) Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN), Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria (semFYC) y Sociedad Española de Médicos Generales y de Familia (SEMG). Así mismo, los autores agradecen a todos los panelistas que se muestran en el anexo por su participación en el consenso, a INSPIRA NETWORK por su asistencia en el diseño y la coordinación y a Fernando Sánchez Barbero PhD por el apoyo en la preparación de este manuscrito.

FINANCIACIÓN

El promotor ha sido la Fundación Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (FEIOMM) con el patrocinio de Amgen, Grünenthal, Rubió, Stada y Theramex. Los patrocinadores no han participado en modo alguno en el diseño, el análisis de datos o la redacción de este consenso.

BIBLIOGRAFÍA

- Riancho JA, Peris P, González-Macías J, Pérez-Castrillón JL, SEIOMM Osteoporosis Guidelines Writing Group. Executive summary clinical practice guideline of postmenopausal, glucocorticoid-induced and male osteoporosis (2022 update). Spanish Society for Bone and Mineral Metabolism Investigation (SEIOMM). *Rev Clin Esp (Barc)* 2022;222(7):432-9. DOI: 10.1016/j.rce.2021.12.007
- Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY, Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO), 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;30(1):3-44. DOI: 10.1007/s00198-018-4704-5
- Morin SN, Feldman S, Funnell L, Giangregorio L, Kim S, McDonald-Blumer H, et al. Clinical practice guideline for management of osteoporosis and fracture prevention in Canada: 2023 update. *CMAJ* 2023;195(39):E1333-E48. DOI: 10.1503/cmaj.221647
- Naranjo Hernández A, Díaz del Campo Fontecha P, Aguado Acín MP, Arboleya Rodríguez L, Casado Burgos E, Castañeda S, et al. Recommendations by the Spanish Society of Rheumatology on Osteoporosis. *Reumatol Clin (Engl Ed)* 2019;15(4):188-210. DOI: 10.1016/j.reuma.2018.09.004
- Camacho PM, Petak SM, Binkley N, Diab DL, Eldeiry LS, Farooki A, et al. American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis- 2020 Update Executive Summary. *Endocr Pract* 2020;26(5):564-70. DOI: 10.4158/GL-2020-0524
- Jones J, Hunter D. Consensus methods for medical and health services research. *BMJ* 1995;311(7001):376-80. DOI: 10.1136/bmj.311.7001.376
- Fitch K, Bernstein SJ, Aguilar MD, Burnand B, LaCalle JR, Lázaro P, et al. The RAND/UCLA Appropriateness Method User's Manual [cited 2024 8 octubre]. Available from: http://www.rand.org/pubs/monograph_reports/MR1269.html
- Hasson F, Keeney S, McKenna H. Research guidelines for the Delphi survey technique. *J Adv Nurs* 2000;32(4):1008-15. DOI: 10.1046/j.1365-2648.2000.t01-1-01567.x
- Herrera A, Carpintero P, Fernández-Pérez C, Hernández-Vaqueiro D, Martínez AA, Suso S. Prevención secundaria en fracturas osteoporóticas. Resultados del proyecto GIOS. *Med Clin (Barc)* 2011;136(2):50-5. DOI: 10.1016/j.medcli.2010.06.012
- Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, et al. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. *Arch Osteoporos* 2021;16(1):82. DOI: 10.1007/s11657-020-00871-9
- Martínez-Laguna D, Carbonell C, Bastida JC, González M, Mico-Pérez RM, Vargas F, et al. Prevalence and treatment of fragility fractures in Spanish primary care: PREFRAOS study. *Arch Osteoporos* 2022;17(1):93. DOI: 10.1007/s11657-022-01124-7
- Camacho PM, Petak SM, Binkley N, Diab DL, Eldeiry LS, Farooki A, et al. American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis-2020 Update. *Endocr Pract* 2020;26(Suppl 1):1-46. DOI: 10.4158/GL-2020-0524SUPPL
- Shepstone L, Lenaghan E, Cooper C, Clarke S, Fong-Soe-Khioe R, Fordham R, et al. Screening in the community to reduce fractures in older women (SCOOP): a randomised controlled trial. *Lancet* 2018;391(10122):741-7. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32640-5
- Söreskog E, Borgstrom F, Shepstone L, Clarke S, Cooper C, Harvey I, et al. Long-term cost-effectiveness of screening for fracture risk in a UK primary care setting: the SCOOP study. *Osteoporos Int* 2020;31(8):1499-506. DOI: 10.1007/s00198-020-05372-6
- LeBoff MS, Greenspan SL, Insogna KL, Lewiecki EM, Saag KG, Singer AJ, et al. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2022;33(10):2049-102. DOI: 10.1007/s00198-021-05900-y
- Schini M, Johansson H, Harvey NC, Lorentzon M, Kanis JA, McCloskey EV. An overview of the use of the fracture risk

- assessment tool (FRAX) in osteoporosis. *J Endocrinol Invest.* 2024;47(3):501-11. DOI: 10.1007/s40618-023-02219-9
17. Leslie WD, Morin SN. New Developments in Fracture Risk Assessment for Current Osteoporosis Reports. *Curr Osteoporos Rep* 2020;18(3):115-29. DOI: 10.1007/s11914-020-00590-7
 18. Mott A, Bradley T, Wright K, Cockayne ES, Shearer MJ, Adamson J, et al. Effect of vitamin K on bone mineral density and fractures in adults: an updated systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Osteoporos Int* 2019;30(8):1543-59. DOI: 10.1007/s00198-019-04949-0
 19. World Health Organization. Adherence to long-term therapies : evidence for action 2003 [cited 2024 October 29]. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/42682/9241545992.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 20. Curtis JR, Arora T, Liu Y, Lin TC, Spangler L, Brunetti VC, et al. Comparative effectiveness of denosumab vs alendronate among postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2024;39(7):826-34. DOI: 10.1093/jbmr/zjae079
 21. Li M, Ge Z, Zhang B, Sun L, Wang Z, Zou T, et al. Efficacy and safety of teriparatide vs. bisphosphonates and denosumab vs. bisphosphonates in osteoporosis not previously treated with bisphosphonates: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Osteoporos* 2024;19(1):89. DOI: 10.1007/s11657-024-01447-7
 22. Lyu H, Jundi B, Xu C, Tedeschi SK, Yoshida K, Zhao S, et al. Comparison of Denosumab and Bisphosphonates in Patients With Osteoporosis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Clin Endocrinol Metab* 2019;104(5):1753-65. DOI: 10.1210/jc.2018-02236
 23. Son S, Oh MY, Yoo BR, Park HB. Comparison of the Efficacy of Zoledronate and Denosumab in Patients with Acute Osteoporotic Vertebral Compression Fractures: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Med* 2024;13(7). DOI: 10.3390/jcm13072040
 24. Miller PD, Hattersley G, Lau E, Fitzpatrick LA, Harris AG, Williams GC, et al. Bone mineral density response rates are greater in patients treated with abaloparatide compared with those treated with placebo or teriparatide: Results from the ACTIVE phase 3 trial. *Bone* 2019;120:137-40. DOI: 10.1016/j.bone.2018.10.015
 25. Hong P, Liu R, Rai S, Liu J, Zhou Y, Zheng Y, et al. Is abaloparatide more efficacious on increasing bone mineral density than teriparatide for women with postmenopausal osteoporosis? An updated meta-analysis. *J Orthop Surg Res* 2023;18(1):116. DOI: 10.1186/s13018-023-03595-x
 26. Hartz MC, Johannessen FB, Harslof T, Langdahl BL. The Effectiveness and Safety of Romosozumab and Teriparatide in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2024. DOI: 10.1210/clinem/dgae484
 27. Kaveh S, Hosseini-fard H, Ghadimi N, Vojdani M, Aryankhesal A. Efficacy and safety of Romosozumab in treatment for low bone mineral density: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2020;39(11):3261-76. Epub ahead of print. DOI: 10.1007/s10067-020-04948-1
 28. Lim SY, Bolster MB. Clinical Utility of Romosozumab in the Management of Osteoporosis: Focus on Patient Selection and Perspectives. *Int J Womens Health* 2022;14:1733-47. DOI: 10.2147/IJWH.S315184
 29. Cusano NE, Costa AG, Silva BC, Bilezikian JP. Therapy of osteoporosis in men with teriparatide. *J Osteoporos* 2011;2011:463675. DOI: 10.4061/2011/463675
 30. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica de teriparatida [cited 2024 October 29]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/82562/ft_82562.html
 31. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica de abaloparatida [cited 2024 October 29]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1221706001/FT_1221706001.html
 32. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica de romosozumab [cited 2024 October 29]. Available from: https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1191411/FT_1191411.html
 33. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2014;370(5):412-20. DOI: 10.1056/NEJMoa1305224
 34. Siris ES, Harris ST, Rosen CJ, Barr CE, Arvesen JN, Abbott TA, et al. Adherence to bisphosphonate therapy and fracture rates in osteoporotic women: relationship to vertebral and nonvertebral fractures from 2 US claims databases. *Mayo Clin Proc* 2006;81(8):1013-22. DOI: 10.4065/81.8.1013
 35. Vargas Negrín F. Adherencia al tratamiento: un reto difícil pero posible. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2014;6(1):5-7. DOI: 10.4321/S1889-836X2014000100002
 36. Marcelli C. Role for nonphysician healthcare providers in improving treatment adherence among patients with severe osteoporosis. *Joint Bone Spine* 2010;77 Suppl 2:S117-9. DOI: 10.1016/S1297-319X(10)70006-3
 37. Reyes C, Tebe C, Martínez-Laguna D, Ali MS, Soria-Castro A, Carbonell C, et al. One and two-year persistence with different anti-osteoporosis medications: a retrospective cohort study. *Osteoporos Int* 2017;28(10):2997-3004. DOI: 10.1007/s00198-017-4144-7
 38. Sosa Henríquez M, Gómez de Tejada Romero MJ. El correcto cumplimiento del tratamiento para la osteoporosis: aún nos queda mucho por hacer. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2016;8(1):3-4. DOI: 10.4321/S1889-836X2016000100001
 39. Blanch J, Casado E, González J, Valdés C, Ruiz-Baena J, Palomino R, et al. Percepción de los profesionales médicos respecto la adherencia terapéutica de los pacientes con osteoporosis. *Rev Osteoporos Metab Miner* 2016;8(1):15-23. DOI: 10.4321/S1889-836X2016000100003
 40. Yeam CT, Chia S, Tan HCC, Kwan YH, Fong W, Seng JJB. A systematic review of factors affecting medication adherence among patients with osteoporosis. *Osteoporos Int* 2018;29(12):2623-37. DOI: 10.1007/s00198-018-4759-3
 41. Tan EH, Robinson DE, Jodicke AM, Mosseveld M, Bodkergaard K, Reyes C, et al. Drug utilization analysis of osteoporosis medications in seven European electronic health databases. *Osteoporos Int* 2023;34(10):1771-81. DOI: 10.1007/s00198-023-06837-0
 42. Pedersen AB, Risbo N, Kafatos G, Neasham D, O'Kelly J, Ehrenstein V. Utilization patterns and factors associated with persistence of new users of anti-osteoporosis treatment in Denmark: a population-based cohort study. *Arch Osteoporos* 2023;18(1):19. DOI: 10.1007/s11657-023-01210-4
 43. Carbonell-Abella C, Torguet Carbonell J, Martínez Martí M. Adherence in the pharmacological treatment of osteoporosis. *Med Clin (Barc)* 2024;162(11):e59-e63. DOI: 10.1016/j.medcli.2024.03.001