

REVISIÓN

Biología aplicada al diagnóstico y tratamiento de la osteoporosis. Avances en biofármacos, bioterapias y biomarcadores. Parte 2

Biotechnology applied to the diagnosis and treatment of osteoporosis. Advances in biopharmaceuticals, biotherapies and biomarkers. Part 2

Carlucci, Adriana Mónica^{1,2}; Bentivegna, Silvina²; Fracalossi Martínez, Ornella²; Pedernera, Santiago²; Scibilia, María Agustina²; Tamburini Glas, Florencia²; Sterin Prync, Aída Edith^{2*}

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

²Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Contacto: Sterin Prync, Aída Edith. Potosí 4234, C1199ACL, Ciudad de Buenos Aires, Argentina; aida.sterin@hospitalitaliano.org.ar.

Resumen

Introducción: La osteoporosis constituye un problema sanitario tanto por su morbilidad y mortalidad como por los costos aparejados. Los avances provenientes de la biología bioquímica - farmacéutica buscan aportar mejoras significativas tanto en el diagnóstico como en el tratamiento. **Objetivos:** Recopilar y revisar la bibliografía científica sobre los hallazgos relacionados con técnicas diagnósticas, biofármacos, bioterapias y biomarcadores de osteoporosis disponibles o en ensayos clínicos. **Materiales y Métodos:** Se efectuó una revisión de la literatura usando las palabras clave: osteoporosis, *monoclonal antibodies*, *biopharmaceuticals*, *biotherapies*, y *biomarkers* en Pubmed, Scielo, Lilacs BVS y Google Scholar. Se analizaron 82 trabajos en inglés o español, del período 2014 - 2019, relacionados con biofármacos, bioterapias o biomarcadores usados para osteoporosis. **Resultados:** Existen 3 biofármacos aprobados (teriparatide, denosumab y rosozumab) y uno (blosozumab) en fase 2 clínica. De las bioterapias, el uso de células madre mesenquimales resultó la más promisorias, aunque con limitaciones. También existen moléculas indicadoras de formación/resorción ósea como biomarcadores, y hay otras nuevas como microRNA. **Conclusión:** La biología bioquímica - farmacéutica participa activamente de la búsqueda de nuevas y mejores alternativas para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la osteoporosis.

Palabras clave: osteoporosis, anticuerpos monoclonales, biofármacos, bioterapias, biomarcadores.

Abstract

Introduction: Osteoporosis constitutes a health problem not only due to its morbidity and mortality, but also due to the associated costs. The advances made in biochemical-pharmaceutical biotechnology are seeking to provide significant improvements in both the diagnosis and treatment of osteoporosis. **Objectives:** To compile and review the scientific literature on the findings related to diagnostic techniques, biopharmaceuticals, biotherapies and biomarkers of osteoporosis available or in clinical trials. **Materials and Methods:** A literature review in which the keywords were: osteoporosis, monoclonal antibodies, biopharmaceuticals, biotherapies, and biomarkers, was carried out in Pubmed, Scielo, Lilacs BVS and Google Scholar. A total of 82 papers in both English and Spanish, published between 2014 and 2019, related to biopharmaceuticals, biotherapies or biomarkers used for osteoporosis were analyzed. **Results:** There are three approved biopharmaceuticals (Teriparatide, Denosumab and Rosozumab) and one (Blosozumab) in clinical phase 2. Of the biotherapies, the use of mesenchymal stem cells was found to be the most promising, although with limitations. Among biomarkers, there are indicator molecules of bone formation/resorption, and new ones as microRNAs. **Conclusions:** Biochemical-pharmaceutical biotechnology actively participates in the search for new and better alternatives for the diagnosis, monitoring and treatment of osteoporosis.

Key words: Osteoporosis, monoclonal antibodies, biopharmaceuticals, biotherapies, biomarkers.

Introducción

La osteoporosis (OP) se define como “una enfermedad esquelética caracterizada por una resistencia ósea disminuida que predispone a un aumento en el riesgo de fracturas”. La resistencia ósea refleja la integración entre la densidad y la calidad ósea. La densidad ósea está determinada por el valor máximo de masa y la calidad ósea depende de la arquitectura, el recambio óseo, la acumulación de microlesiones y la mineralización. La regla de oro para estimar clínicamente la fuerza ósea consiste en medir la densidad mineral ósea (DMO) por absorciometría, con rayos X de doble energía (DEXA) enfocándose, en general, en la cadera y la zona lumbar. Esta metodología diagnóstica permite, además, predecir el riesgo de fractura del paciente y monitorizar la efectividad de su tratamiento.

La definición operacional de osteoporosis propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) involucra la presencia de una DMO de 2,5 desvíos estándar (DS) o más por debajo del valor promedio para mujeres jóvenes sanas posmenopáusicas y hombres de 50 años o más. De acuerdo con esto, un T-score < -2,5 DS equivale a osteoporosis, un T-score mayor que -1,0 DS denota una DMO normal, mientras que un T-score entre -1,0 y -2,5 DS indica osteopenia.

La OP afecta anualmente a 200 millones de personas en todo el mundo causando alrededor de 8,9 millones de fracturas. Estas son una importante causa de morbilidad y mortalidad y tuvieron un impacto económico en la Unión Europea (2010) de 40 billones de dólares y, en Estados Unidos, de 20 billones en 2015. Se ha estimado que la situación actual de Latinoamérica se asemeja a la europea. Por otro lado, cabe destacar que existen varias guías de práctica clínica consensuadas para el diagnóstico y tratamiento de la OP.

Los mecanismos de formación ósea constan básicamente de tres pasos:

- Los osteoblastos entregan una nueva matriz extracelular proteica (osteoide);
- En un tiempo de semanas a meses, se mineraliza (se forman cristales de hidroxapatita en las fibrillas de colágeno);
- Por último, se mantiene la integridad del esqueleto a través de la unidad de remodelación ósea; que comprende resorción (mediada por los osteoclastos) y formación de hueso existente (mediada por osteoblastos).

En OP se observa un aumento de la expansión de los osteoclastos junto con diferenciación inadecuada, disminución de actividad y aumento de la apoptosis de los osteoblastos.

En esta revisión, se presentarán algunas de las opciones diagnósticas y terapéuticas que la biotecnología ha ofrecido para la OP, especialmente en mujeres posmenopáusicas (OPMM).

Materiales y Métodos

Se efectuó una revisión de la literatura buscando artículos de relevancia sobre productos biofarmacéuticos, bioterapias y/o biomarcadores aprobados o en instancias clínicas, destinados a OP. La búsqueda se realizó utilizando como palabras clave: i) osteoporosis *and monoclonal antibodies*; ii) osteoporosis

and biopharmaceuticals and biotherapies and biomarkers; iii) osteoporosis *and monoclonal antibodies and Biotherapies and biomarkers*. y se llevó a cabo en las bases de datos de MEDLINE/Pubmed, Scielo (Scientific Electronic Library Online), Lilacs BVS y Google Scholar.

Los criterios de inclusión usados fueron: i) solo artículos en idioma inglés o español; ii) publicados entre 2014 y 30 de junio de 2019; iii) que se trataran de una revisión sistemática o de un artículo original de interés que cubriera alguno de los aportes mencionados de la biotecnología o que abarcaran desde ciencias básicas hasta estudios clínicos.

Los criterios de exclusión fueron: i) existencia de patología concomitante; ii) administración concomitante de suplementos dietarios, compuestos/mezclas químicas o fármacos convencionales no aprobados para OP o con efectos en las vías de señalización del tejido óseo.

Después de seleccionar los artículos definitivos, se procedió a describir sus hallazgos más importantes de forma cualitativa. Finalmente, se analizaron 82 artículos científicos.

Resultados

Biofármacos

El primer biofármaco aprobado fue teriparatide, un análogo recombinante humano de la fracción 1-34 de PTH que incentiva la formación de hueso nuevo en las superficies óseas trabeculares y corticales (periósticas y/o endósticas) por estimulación preferencial de la actividad osteoblástica sobre la osteoclastica. Desde 2002, está indicado para el tratamiento de la OPMM con alto riesgo de fractura. En 2003, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) estableció un estudio de vigilancia para osteosarcoma como compromiso de poscomercialización, para evaluar una potencial asociación con este tumor, teniendo en cuenta los resultados preclínicos observados; a los 7 años del estudio no se detectó un patrón indicativo de asociación entre el tratamiento con este biofármaco y la aparición de osteosarcomas en humanos.

El segundo tipo de biofármacos aprobados son los anticuerpos monoclonales (mAb), que pueden ser de diverso origen y, por ende, tener diferencias con respecto a la estructura de la inmunoglobulina, la eficacia de su uso y los efectos adversos asociados a su utilización. Hay de tipo murino, quimérico, humanizado o humano. Esto se encuentra indicado en el nombre del anticuerpo, que se compone de un nombre de fantasía escogido por el fabricante, un prefijo que señala el blanco terapéutico, un fragmento que indica el origen de la inmunoglobulina y el sufijo *-mab*.

Su actividad biológica está íntimamente relacionada con su estabilidad estructural, de conformación y química, y, aunque su desarrollo y aprobación representen un gran desafío, existen algunos ya comercializados y otros en fases clínicas para el tratamiento de la osteoporosis.

Denosumab (Prolia®)

Es un mAb humano de tipo IgG2, indicado para tratar por vía

Figura 1. Control de la actividad de los osteoclastos.

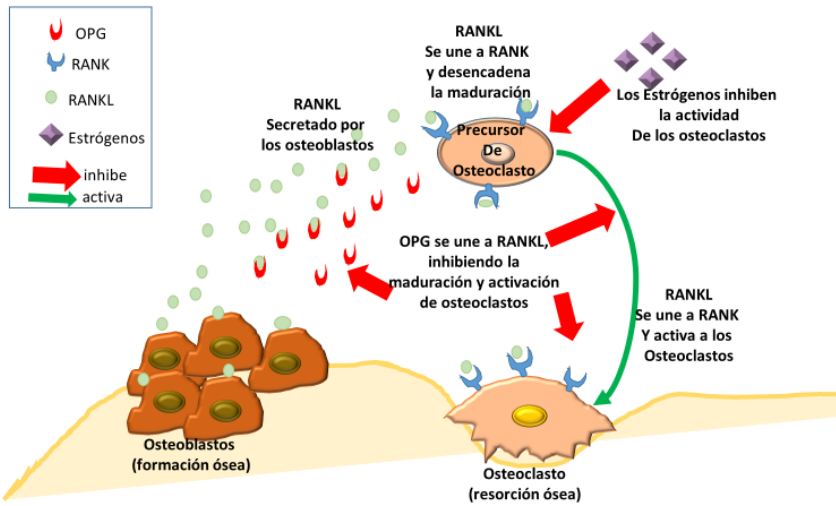


Figura 2. Funciones que desencadena la unión de la hormona PTH a su receptor en los osteoblastos.

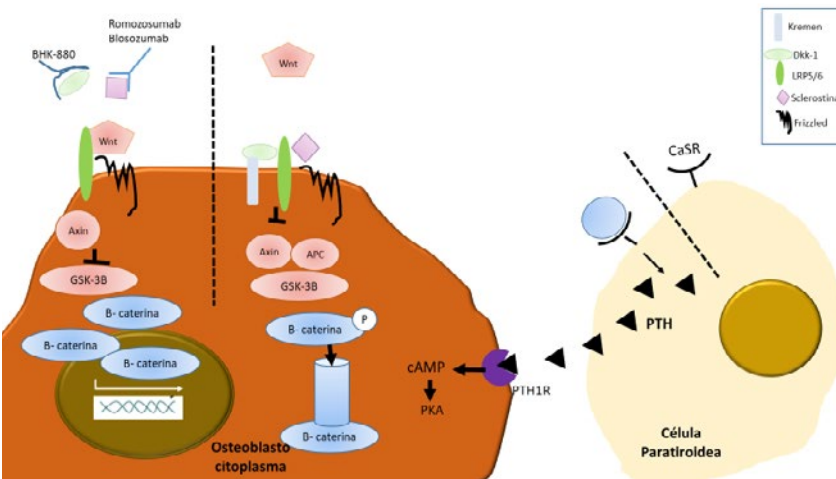
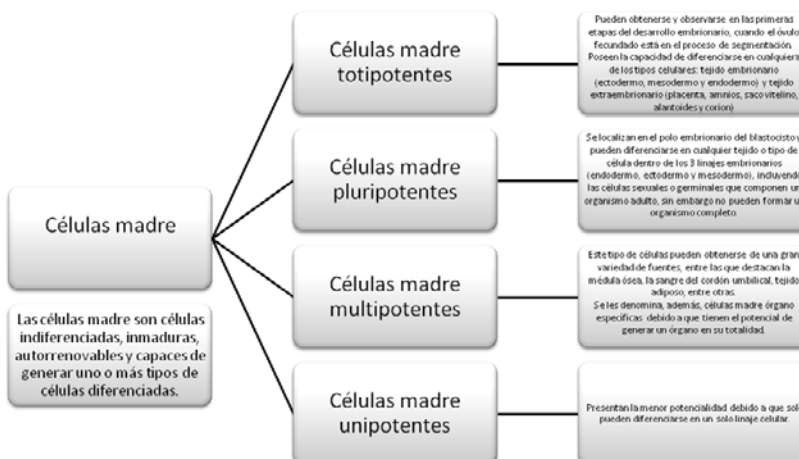


Figura 3. Tipos, localización y capacidad de diferenciación de los distintos tipos de células madre⁵³.

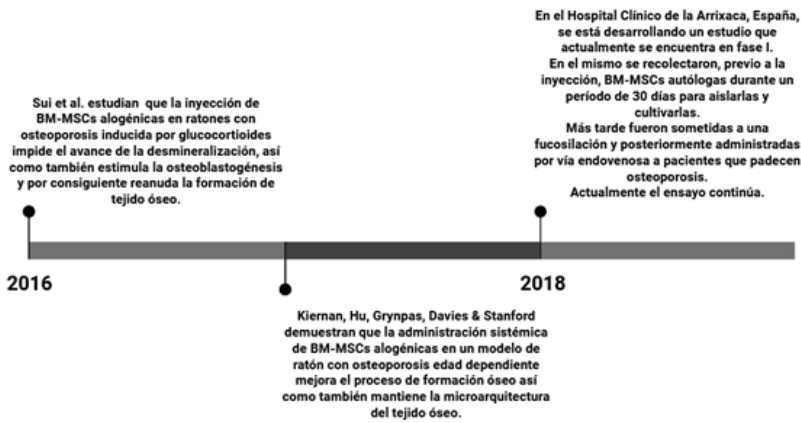


subcutánea (SC) casos de OPMM. Ejerce su acción contra el activador del receptor RANK (del inglés, *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B*). Tanto RANKL (como el ligando del receptor RANK) y el factor estimulante de colonias de macrófagos son mediados por osteoblastos y regulan el reclutamiento y diferenciación de osteoclastos¹⁷⁻¹⁹. El denosumab, al bloquear la interacción RANKL/RANK, inhibe la formación, función y supervivencia de los osteoclastos, con una consecuente disminución en la resorción ósea del hueso trabecular y cortical. Fisiológicamente, la osteoprotegerina (OPG) es un receptor señuelo soluble que se une a RANKL y bloquea la activación del receptor RANK preservando así el esqueleto de la resorción extrema¹⁴ (Figura 1). En la figura, se grafica la interacción entre el receptor activador del ligando del factor nuclear- κ B (RANK) y la osteoprotegerina (OPG) en la actividad de los osteoclastos¹⁸.

Varios estudios clínicos sustentan la efectividad del denosumab. En el ensayo clínico FREEDOM (*Fracture reduction evaluation of Denosumab in osteoporosis every 6 months*), se evaluó su eficacia y seguridad hasta por 10 años de tratamiento, con administraciones cada 6 meses. Cuatro mil quinientas cincuenta mujeres participaron y, en el grupo tratado, la DMO ganó 13,7 % en la columna lumbar y 4,0 % en la cadera luego de 5 años de tratamiento. En un estudio de fase II, denosumab se administró hasta por 8 años en mujeres posmenopáusicas de baja DMO, con consecuentes aumentos de 16,5 % y de 6,8 % en las mismas regiones, respectivamente.

Las pacientes tratadas en ensayos clínicos con Prolia® registraron una disminución en los marcadores de resorción ósea de los telopeptidos carboxiterminales del colágeno tipo I (CTX) en suero de un 85 % a los tres días, que se mantuvo durante el intervalo de administración. Al final de cada intervalo de administración, la disminución del CTX se atenuó desde ≥ 87 % hasta aproximadamente ≥ 45 % (intervalo 45 - 80 %) y dejó en evidencia una propiedad muy importante del biofármaco. No se han observado anticuerpos neutralizantes contra denosumab

Figura 4. Experiencias de ensayos clínicos con MSC derivadas de médula ósea [BM-MSc].



(Prolia®), y se redujo significativamente el riesgo de fracturas vertebrales, no vertebrales y de cadera, además de reportarse menos riesgo asociado de fracturas femorales atípicas y presentarse osteonecrosis de mandíbula en el 1,8 % de los pacientes a los tres años.

Finalmente, se llevó a cabo un ensayo de fase 3 para estudiar la eficacia y seguridad contra fracturas, con la administración de denosumab en la dosis acordada para caucásicos (60 mg cada 6 meses), en 1262 hombres y mujeres japoneses con osteoporosis, mayores de 50 años, con resultados exitosos.

Más recientemente, algunos estudios sugirieron que terapatide es capaz de ejercer su actividad biológica aun cuando la renovación ósea está completamente suprimida por el tratamiento con denosumab. La terapia combinada se asoció con aumentos significativos de la esclerostina [SOST] y de la proteína 1 relacionada con Dickkopf [DKK1].

Anticuerpos antiesclerostina

La esclerostina [glicoproteína secretada por los osteocitos] disminuye la formación de hueso nuevo al antagonizar la unión del ligando Wnt al receptor Frizzled (FZD) y los correceptores LRP5/6, que motivan la vía canónica de Wnt/ β -catenina conduciendo a la fosforilación de LRP5/6 y la unión de la axina al complejo de receptores¹⁷, e inhibiendo los receptores LRP4–6 en los osteoblastos²⁸⁻³⁰.

La β -catenina se transloca al núcleo e interactúa con factores de transcripción TCF/Lef-1¹⁷, activando genes promotores que favorecen la osteogénesis y con ello, el aumento de la masa ósea. Esta vía promueve la diferenciación de células madre mesenquimales al linaje de osteoblastos y motiva la secreción de OPG (Figura 2). En la Figura 2, se esquematiza de qué manera la unión de PTH al receptor mejora las funciones de los osteoblastos. La presencia de antagonistas de Wnt - DKK-1 y esclerostina inhibe la señalización. El DKK-1 se necesita para formar complejo con Kremen y, posteriormente, se une a LRP5/6, mientras que la esclerostina se une directamente a LRP5/6. Después de neutralizar el DKK-1 y la esclerostina, el Wnt puede unirse al LRP5/6, lo que resulta en la degradación de GSK-3. Como consecuencia, la β -catenina es estabilizada, se acumula y se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes osteoblásticos³⁰.

Cuando el complejo con esclerostina está presente en el medio, GSK-3 β degrada la β -catenina y hay menor acción anabólica en el nivel óseo. Se ha demostrado una asociación entre polimorfismos del promotor del gen SOST [que codifica la esclerostina] y la DMO, así como mecanismos epigénicos que, además de otros factores hormonales y mecánicos, influirían en la producción de esclerostina.

Una de las alternativas terapéuticas para OP, relacionada con la vía WNT

canónica y la esclerostina es el uso de anticuerpos monoclonales antiesclerostina [Scl-mAb]¹⁷: estos se unen a la glicoproteína y neutralizan su acción inhibitoria, de manera que la traslocación de β -catenina al núcleo se ve facilitada y hay mayor activación de genes osteogénicos. En este mecanismo, se basa el desarrollo de los Scl-mAb romosozumab [Amgen] y blosozumab [Eli Lilly]. La información general y resultados hallados en los ensayos clínicos respectivos se exponen en la Tabla I.

Es de destacar que romosozumab, en principio, no fue aprobado por la FDA ante la evidencia de un mayor riesgo de episodios graves de enfermedad cardiovascular, como se destaca en el estudio clínico ARCH, pero en julio de 2019, se aprobó para los casos de alto riesgo.

Bioterapias Células madre

Una célula madre [o SC, de stem cell] es la que “es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas no solo morfológicamente, sino también de forma funcional”. Las células madre pueden clasificarse en totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.

La utilización de SC en OP resulta muy interesante por su capacidad de regeneración y plasticidad. La terapia basada en células tiene como fin revertir los efectos de disminución en el número y en la pérdida de la funcionalidad de las células madre mesenquimales [mesenchymal stem cells o MSC] contribuyendo así a aumentar la DMO.

En ensayos clínicos y preclínicos, se han empleado, además de MSC, células madre provenientes de embriones [embryonic stem cells o ESC], células madre pluripotencialmente inducidas [induced pluripotent stem cells o iPSC], y células madre provenientes del esqueleto [skeletal stem cells, SSC]. No obstante, las MSC son las más utilizadas en ensayos clínicos.

Las terapias regenerativas en el sistema musculoesquelético se basan en la aplicación adecuada de células, biomateriales y / o factores y van desde la

Tabla I. Resultados de ensayos clínicos para romosozumab y blosozumab

	Ensayos fase I	Ensayos fase II
Romosozumab (Amgen) Anticuerpo humanizado	Aumento dependiente de la dosis de los marcadores de formación ósea: osteocalcina, P1NP y BAP; disminución del marcador de resorción ósea CTX respecto de los valores basales.	1) Aumento de DMO con respecto a grupos tratados con teriparatide o con alendronato. 2) FRAME (<i>Fracture Study in Postmenopausal Women with Osteoporosis</i>): disminución de las nuevas fracturas vertebrales radiográficas clínicas en pacientes que recibieron 210 mg SC. A los 12 meses, se observaron reducciones mayores y más rápidas. 3) En comparación con el estudio FREEDOM de denosumab, los aumentos medios absolutos de la puntuación T en la columna vertebral y la cadera logrados en 2 años se aproximan al efecto de 7 años de administración continua de denosumab. 4) ARCH (<i>Active-Controlled Fracture Study in Postmenopausal Women with Osteoporosis at High Risk</i>) con administración de 210 mg SC mensuales durante un año y posterior administración de alendronato vs. 70 mg de alendronato oral semanal durante los dos años, en OPMM de alto riesgo: disminuyó el riesgo de fractura en todos los sitios esqueléticos. Sin embargo, los valores de DMO disminuyeron al nivel previo al tratamiento cuando se interrumpió la administración.
Blosozumab (Eli Lilly) Anticuerpo humanizado	Incremento dependiente de la dosis de BAP y P1NP disminución de CTx, y aumento de la densidad de masa ósea .	Aumento de marcadores de formación ósea. Efectos adversos similares a los del grupo placebo. Aparición de anticuerpos antiblosozumab.

► Romosozumab (Amgen) anticuerpo humanizado,,,, ; blosozumab (Eli Lilly) anticuerpo humanizado,; BAP, fosfatasa alcalina ósea; P1NP, procolágeno sérico tipo I N-terminal; CTX, telopéptido C terminal de reticulación; OPMM, osteoporosis en mujeres posmenopáusicas.

inyección directa de aspirados concentrados o no procesados de sangre o médula ósea hasta la utilización de andamios naturales o sintéticos con células que se liberaron de tejidos autólogos y se propagaron bajo condiciones de una buena práctica de fabricación (por ejemplo, implantación de condrocitos autólogos)⁴³. Se han identificado 19 ensayos clínicos de este tipo hasta la fecha final de la revisión. En la Figura 3, se resumen los distintos tipos de células madre descritas, así como su localización y capacidad de diferenciación.

Células madre mesenquimales (MSC)

Las [MSC] son células multipotentes, presentes en prácticamente todos los tejidos: adiposo, muscular esquelético, hepático, pulmonar, dérmico y en médula ósea, placenta y cordón umbilical. En la Figura 4, se resumen experiencias de ensayos clínicos en los que se emplean MSC derivadas de médula ósea (BM-MSC), con sus avances más destacados en los últimos años.

El uso de MSC derivadas de adipocitos (AD-MSC) presenta ventajas comparativas respecto de las BM-MSC⁵⁴⁻⁵⁶. El estudio clínico suizo ROBUST evaluó la eficacia de las AD-MSC como componente osteogénico en injertos compuestos versus susti-

tutos de injerto óseo acelular, en el tratamiento de fracturas humerales proximales aisladas que se tomaron como modelo de fracturas de hueso osteoporótico. Se pudo verificar la viabilidad y seguridad de la fabricación e implantación del injerto, y las biopsias del tejido de reparación, después de hasta 12 meses, demostraron la formación de huesecillos óseos estructuralmente desconectados y morfológicamente distintos del hueso osteoconducido, lo que sugiere la naturaleza osteogénica de las células de la fracción vascular estromal (SVF) implantadas y demuestra que estas pueden formar espontáneamente tejido óseo y estructuras vasculares dentro de un entorno de fractura, sin expansión o cebado exógeno. Los conocimientos y resultados clínicos obtenidos justifican ensayos controlados más grandes.

Saito et al. propusieron usar un sobrenadante de extracto de jalea de Wharton como un nuevo activador para mejorar la habilidad regenerativa de las células BM-MSC en mujeres posmenopáusicas. En MSC derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC), se observó que los exosomas secretados integran los beneficios de las MSC y las iPSC, sin demostrar inmunogenicidad. Estudios *in vitro* demuestran que exosomas hiPSC-MSC aumentan la proliferación celular y la ac-

Tabla II. Tipos de miRNA que intervienen en la formación ósea y diferenciación de las células madre mesenquimales⁶⁸⁻⁷²

microRNA	Función
miR-27a, miR-346 y miR-1423p	Regulan la vía Wnt/ β -catenina [aumento de la proliferación celular] y promueven la diferenciación osteogénica de las MSC.
miR-21	Incentiva la diferenciación de hUC-MSC a través de la vía fosfatidilinositol-3-kinasa/akt promoviendo la acumulación de β -catenina y la activación de Runx2 [factor de transcripción asociado a la diferenciación de los osteoblastos].
miR-138	Es un regulador negativo de la diferenciación de hUC-MSC.
miR-204	Posee actividad proadipocítica y antiosteoblástica en las MSC al prevenir la expresión de Runx2.

tividad de la enzima fosfatasa alcalina. Además, aumentan la producción de ARN mensajero y la expresión de proteínas de los genes relacionados con osteoblastos en BM-MSC derivadas de ratas ovariectomizadas (OVX). En ensayos *in vivo*, promueven la regeneración ósea y la angiogénesis en estadios críticos de deficiencia calvaria en ratas OVX.

En 2019, Laquinta et al. señalaron la necesidad de protocolos estandarizados para permitir la regulación de las condiciones de crecimiento de MSC durante la expansión *ex vivo* y evitar problemas relacionados con su diferenciación no deseada.

Otro desafío de la medicina regenerativa ósea es la liberación de las MSC en el lugar de la injuria ósea.

Moléculas relacionadas con genética/terapia génica

En el orden genético, el estudio *Genome-Wide Association Study* (GWAS) correlaciona las variantes genéticas halladas en el genoma con la DMO de la columna lumbar. Este parámetro fue medido volumétricamente en 15275 voluntarios utilizando tomografía computada cuantitativa. Se observó la localización de cinco loci que podrían poseer importancia clínica: WNT4, ZBTB40, TNFRSF11B, AKAP11y TNFSF11.

Alonso y colaboradores presentaron un estudio GWAS en el que la variación genética estaba asociada a la expresión cuantitativa de locus en biopsias óseas de crestas ilíacas. El hallazgo de un nuevo locus en el cromosoma 2q13, SN Prs10190845, fue asociado a fracturas vertebrales. Se ha propuesto el gen SL-C20A1 [codifica para proteínas de la familia de transportadores de fosfatodependientes de sodio 1, íntimamente relacionada con el metabolismo óseo] y el de la tubulina tirosina ligasa como candidatos posicionales de ese locus. El uso de bases de datos genómicas de estudios epidemiológicos avala que más de 10 genes poseen un efecto pleomórfico en múltiples fenotipos, es decir, un solo gen puede influir independientemente en más de un rasgo fenotípico.

Otro estudio que analizó la masa corporal magra total y la masa corporal magra total con excepción de la cabeza de 10414 niños permitió identificar factores genéticos con efectos pleomórficos en la masa magra y la DMO. Ocho genes presentaron una buena correlación entre estos factores; de ellos, el gen SREBF1 es uno de los más importantes.

Biomarcadores

Entre los marcadores bioquímicos disponibles para medir la renovación ósea, se han recomendado las mediciones de péptido de colágeno tipo 1 (PINP), CTX y fosfatasa alcalina ósea (BAP) como marcadores de referencia de formación y resorción ósea, respectivamente. Pero entre sus limitaciones, figuran la falta de especificidad para el tejido óseo y la incapacidad para reflejar la actividad de los osteocitos o el metabolismo perióstico. De la búsqueda constante de nuevos biomarcadores, resultaron interesantes: periostina, esclerostina y esfingosina 1-fosfato.

Un hallazgo prometedor reciente da cuenta de que los niveles séricos de esclerostina son más altos en pacientes con alta DMO. Esto sugiere que sería un marcador relevante de osteocitos maduros.

Los biomarcadores son fundamentales a la hora de optimizar la terapia teniendo en cuenta los antecedentes de los pacientes. Así, por ejemplo, la interrupción de la terapia con denosumab es seguida por un aumento transitorio de los marcadores de recambio óseo por encima de los valores previos al tratamiento, junto con la pérdida ósea acelerada.

Apelando a tecnologías innovadoras, estudios recientes sugieren que las mediciones de microARN circulantes, una nueva clase de marcador, podrían representar marcadores biológicos tempranos en la osteoporosis. Wang et al. observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del miR-133a, entre pacientes con diferentes valores de DMO. Un análisis de *microarrays* posterior en linfocitos mononucleares circulantes reveló que los niveles de expresión de miR-133a fueron mayores en pacientes con baja DMO respecto de aquellos con DMO alta. En este mismo estudio, a través de un análisis bioinformático de genes blanco, se detectaron tres potenciales genes relacionados con osteoclastos: CXCL11, CXCR3 y SLC39A1 de miR-133a, que podrían ser considerados también como posibles biomarcadores.

En otro análisis matricial de miRNA de precursores osteoclastos de pacientes con baja y alta DMO, se vio un aumento comparativo de miR-422a en los primeros utilizando qRT-PCR [PCR de transcripción reversa cuantitativa, *Quantitative Reverse Transcription PCR*].

Tabla III. Nuevas vías de señalización en la vía anabólica de la paratohormona.

Osteoblastos, osteocitos y osteoclastos	Vía Wnt canónica	Acción anabólica de PTH
TGIF1 promueve la diferenciación de osteoblastos y es requerido para la activación completa de la remodelación ósea en osteoblastos maduros y osteocitos. La deficiencia de TGIF1 aumenta la expresión de la molécula señalizadora de osteoblastos-osteoclastos, Sema3E, y conduce a una inhibición de la diferenciación de osteoclastos (disminuye la resorción ósea).	El gen TGIF1 es un <i>target</i> de la vía Wnt canónica, mediado por señalización β -catenina-Tcf/Lef. La deficiencia de TGIF1 en el hueso no altera la señalización Wnt canónica; la proteína es prescindible para la ganancia de masa ósea inducida por Wnt.	PTH induce la expresión de TGIF1 a través de la señalización AP1 (PTHr1-PKA-pCREB-AP1). PTH aumenta la masa ósea de una manera dependiente de TGIF1. TGIF1 en osteoblastos maduros y osteocitos es necesario para la completa inhibición de la expresión de esclerostina mediada por PTH. TGIF1 podría contribuir al control de la expresión de esclerostina en osteocitos de manera indirecta, participando en la represión de la transcripción de Mef2c (factor de transcripción que controla la actividad de un <i>enhancer</i> distante del gen SOST); en respuesta al tratamiento con PTH, suprimió la expresión de ARNm de Mef2c y la abundancia de proteínas en un grado mucho menor en células deficientes en TGIF1 en comparación con controles.

► Relación de TGIF1 con los osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, la señalización de la vía Wnt canónica y la acción anabólica de la PTH, encontrada por Saito et al., PTH, paratohormona; TGIF1, proteína homeótica.

Meng et al.⁶² identificaron miR-194-5p como un potencial biomarcador en OPMM, ya que está aumentado en varios mecanismos relacionados con OP; la identificación se hizo por *microarrays* en muestras de sangre de pacientes con osteopenia y OP. En la Tabla II, se presentan diferentes tipos de miRNA capaces de intervenir en la formación ósea y diferenciación de las células madre.

Finalmente, varios factores de transcripción como Runx2/Cbfa1 y Osterix fueron identificados como reguladores clave para la diferenciación osteoblástica. Se ha observado que su ausencia resulta en una completa falta de esqueleto mineralizado. Muchos otros factores de transcripción son considerados importantes en la diferenciación y preservación de osteoblastos como las proteínas homeobox, miembros de la familia AP1, o efectores de la β -catenina/vía de señalización Wnt.

Nuevos hallazgos

En la Tabla III se resumen las experiencias realizadas en relación con el estudio de dos nuevas proteínas, TGIF1 (Factor 1 interactuante-TG) y Clec11a, de relevantes funciones en vías de señalización claves de la osteogénesis. TGIF1 fue identificado por secuenciación de ARN en células estromales de médula ósea de ratón como la proteína homeodominio más abundantemente expresada. La relación que los autores encontraron entre la misma y los osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, la señalización de la vía Wnt canónica y la acción anabólica de la PTH se expone en la Tabla III.

Clec11a, una glicoproteína sulfatada secretada por subconjuntos de células estromales, osteoblastos, osteocitos y condrocitos hipertróficos, promueve la osteogénesis en la médula ósea, es una lectina de tipo C dominio familiar 11, miembro A y

un factor de crecimiento hematopoyético que se expresa también en tejidos esqueléticos. A su vez, Clec11a está estrechamente relacionada con Clec3b/Tetranectina (cuya expresión está relacionada con la mineralización). Utilizando ratones Clec 11a +/- y ratones Clec 11a +/- como grupo control y ratones Clec 11a -/- como grupo estudio, Yue et al. llevaron a cabo distintas experiencias para determinar el rol de la proteína en el proceso de osteogénesis. En la Tabla IV, se resumen los diseños experimentales, resultados y conclusiones de dichos ensayos.

Discusión

La biotecnología aplicada a la salud hoy es una actividad transdisciplinaria donde convergen disciplinas tan variadas como bioinformática, biología molecular, bioquímica, biofísica, incluidos los aspectos regulatorios actuales de las mismas. En el presente trabajo, se aplica su estado de arte al diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la OP.

Dentro de los biofármacos desarrollados para la OP, se encuentra, por un lado, el péptido recombinante humano PTH 1-34 (teriparatida), primer anabólico óseo aprobado en 2002, que estimula la formación de hueso a través de la inhibición de la esclerostina, DKK1 y la proteína Frizzled; aumenta la DMO; mejora la microarquitectura y disminuye las fracturas. Por otro lado, se encuentran los anticuerpos monoclonales: el denosumab, aprobado desde 2010, que se une específicamente a RANK bloqueando la unión a su ligando, lo que reduce notablemente la resorción ósea, aumenta la densidad ósea y reduce las fracturas, y los anticuerpos anti-esclerostina (romosozumab, blosozumab), que aumentan la masa ósea al neutralizar los efectos negativos de la esclerostina en la vía de señalización de Wnt. Hasta el momento, romosozumab fue aprobado

Tabla IV. Diseños experimentales de la acción de Clec 11a en osteogénesis, resultados y conclusiones.

Tipo de ensayo	Diseño experimental	Resultados	Conclusiones
<i>In vivo</i>	Evaluación de la modificación de indicadores de estado óseo en ratones control y ratones Clec 11a -/- con el paso del tiempo.	Menor volumen trabecular óseo y mayor propensión a fracturas en ratones Clec 11a -/- que en control. Menor mineralización ósea; marcadores de resorción sin alteraciones.	Clec 11a es necesaria para el mantenimiento de hueso vertebral y de las extremidades. Clec 11a está involucrada en procesos de formación del hueso, pero no, de su resorción.
<i>In vitro</i>	Cultivo de UFC-F control y Clec 11a -/- en condiciones osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas.	Menor diferenciación de progenitores mesenquimales de médula ósea a osteoblastos maduros a partir de UFC-F Clec 11a -/- que en control (condiciones osteogénicas). Sin diferencias entre grupos en condiciones adipogénicas y condrogénicas.	Clec 11a es necesaria para la diferenciación de progenitores mesenquimales de la médula ósea en osteoblastos maduros.
<i>In vivo</i>	Cultivo de UFC-F de ambos grupos, transferencia de las mismas a esponjas de colágeno y posterior implante subcutáneo a otros ratones.	Luego de 8 semanas, los huesecillos obtenidos a partir de CFU-F Clec 11a -/- tenían menor masa que la del grupo control.	Clec 11a es necesaria para la diferenciación de progenitores mesenquimales de la médula ósea en osteoblastos maduros.
<i>In vivo</i>	Administración subcutánea de rClec 11a a ratones de tipo silvestre por 28 días.	Aumento del volumen trabecular óseo en las metafisis distales del fémur, de forma dependiente de la dosis.	Clec 11a está involucrada en procesos de formación del hueso.
<i>In vivo</i>	Administración de PTH o rClec11a a ratones ovariectomizados. Administración de PTH o rClec 11a a ratones con osteoporosis inducida por dexametasona.	Aumento del volumen óseo trabecular, número trabecular y disminución en el espaciado trabecular en ambos grupos. Sin modificación de marcadores de resorción ósea.	La administración de rClec 11a previene la pérdida de hueso trabecular en ratones ovariectomizados o con osteoporosis inducida por dexametasona a través de la promoción de la formación ósea.
<i>In vivo</i>	Inducción de osteoporosis por ovariectomía a ratones de tipo silvestre, de 2 meses de edad. Luego de 4 semanas, administración de rClec 11a.	Aumento de volumen trabecular óseo y disminución de espacio trabecular respecto de ratones ovariectomizados no tratados.	Clec 11a puede revertir la pérdida de hueso trabecular luego de la inducción de osteoporosis a través de una ovariectomía.
<i>In vivo</i>	Transplante subcutáneo de una suspensión de células de estroma de médula ósea humana, partículas de hidroxiapatita/fosfato tricálcico y gel de fibrina a ratones NSG inmunocomprometidos y administración diaria de inyecciones subcutáneas de rhClec11a o vehículo durante 4 u 8 semanas	Promoción de la osteogénesis a partir de células estromales de médula ósea humana <i>in vivo</i> .	rhClec11a aceleró y aumentó significativamente la formación de hueso en los osículos.

► Ensayos realizados por Yue et al. para estudiar el rol de rClec 11a (Clec 11a recombinante) en la osteogénesis. 61 UFC-F (unidades formadoras de colonias de fibroblastos)

en abril de 2019, solo en Estados Unidos debido a la alta incidencia de efectos cardiovasculares adversos demostrados, y su uso se recomienda solo para pacientes con alto riesgo de fracturas, mientras que blosozumab está siendo estudiado actualmente en fase 2.

En cuanto a las bioterapias, podemos afirmar que se superó la “prueba de concepto” para su inclusión en el arsenal terapéutico, así como también el uso de preparaciones y procedimientos para mejorar la extracción, cultivo y aplicación de las células seleccionadas al paciente. Resta consensuar proto-

colos para mejorar la implantación celular o del andamio y la seguridad global del procedimiento.

En cuanto a lo referido a las estructuras genéticas estudiadas hasta la actualidad, los miRNA, aparecen como moléculas interesantes para ser usadas más como biomarcadores que como terapia. Es importante destacar también las variantes genéticas halladas en el genoma relacionadas con la DM0.

En lo concerniente a biomarcadores, la determinación en plasma de PINP, CTX y BAP sigue siendo la regla de oro, pero con limitaciones de especificidad, incapacidad para reflejar

actividad osteocítica y, sobre todo, para estimar riesgo de fracturas óseas. Nuevos biomarcadores como, por ejemplo, la esclerostina, podrían superar algunas de esas limitaciones. La esclerostina, parecería ser el contacto entre el esqueleto y el tejido adiposo de la médula ósea (MAT) al actuar como factor endócrino que promueve la diferenciación de las MSC hacia el linaje adipogénico en lugar del osteogénico dentro de la médula ósea. Tal como hemos descrito en la *Parte 1* de estas dos revisiones, MAT es uno de los biomarcadores que también se están proponiendo para el diagnóstico y seguimiento de la OP, por lo que sería importante seguir el avance de las investigaciones en esta vía de regulación. Dentro también de los nuevos marcadores, se señalaron los siguientes miRNA: miR-133a, miR422a y miR 194-5p. y varios factores de transcripción están siendo evaluados con el mismo objetivo.

Es en este contexto, el presente trabajo demuestra la importancia de la transdisciplinariedad, que incluye la biotecnología para abordar un problema de salud pública y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Susana Llesuy y al Dr. Miguel Ángel De Cristóforo, por su apoyo y colaboración en la corrección de este artículo.

La revisión fue realizada en la asignatura Biotecnología y Biotecnología Farmacéutica del último año de las carreras de Bioquímica y Farmacia del Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Referencias bibliográficas

- Klibanski A, Adams-Campbell L, Bassford T, Blair SN, Boden SD, Dickersin K, et al. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *J Amer Med Assoc.* 2001; 285(6), 785-95.
- Álvarez Álvarez, Mendoza Garcés RF, Torre Mollinedo F, Callejo Orcasitas A, Arizaga Maguregui A. Actualización en el tratamiento de la osteoporosis. Manejo desde una unidad del dolor [1.a parte] *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2014; 21: 328-37.
- Mahla RS. Stem cells applications in regenerative medicine and disease therapeutics. Vol. 2016, *International Journal of Cell Biology.* Hindawi Limited; 2016.
- Phetfong J, Sanvoranart T, Nartprayut K, Nimsanor N, Seenprachawong K, Prachayasittikul V, et al. Osteoporosis: The current status of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Biol Lett* 2016 ;21:42.
- IOF Compendium of Osteoporosis, International Osteoporosis Foundation. [Internet]. Disponible en: <https://www.osteoporosis.foundation/sites/IOFbonehealth/files/2020-01/IOF-Compendium-of-Osteoporosis-web-V02.pdf>
- Sosa- Henríquez M, Gómez de Tejada Romero M. La fractura de cadera en Latinoamérica. ¿Se está aproximando a la experiencia europea de los últimos años?. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2018;10(2):61-62.
- Garcés FM, Álvarez Álvarez R, Mollinedo FT, Orcasitas AC, Maguregui AA. Actualización en el tratamiento de la osteoporosis: algoritmo de decisión. Manejo desde una unidad del dolor [2.a parte] *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2015; .22(2) 73-9.
- Aghebati-Maleki L, Dolati S, Zandi R, Fotouhi A, Ahmadi M, Aghebati A, et al. Prospect of mesenchymal stem cells in therapy of osteoporosis: A review. *J Cell Physiol* 2019;234(6):8570-8578.
- Manolagas, SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 2000;21(2):115-37
- Curtis EM, Moon ARJ, Dennison EM, Harvey NC, Cooper C. Recent advances in the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Clinical Med (Lond)* 2015;15: s92-6.
- Manhard MK, Nyman JS, Does MD. Advances in imaging approaches to fracture risk evaluation. *Transl Res* 2017;181:1-14.
- Pino AM, Rosen CJ, Pablo Rodríguez J. In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. *Biol Res.* 2012;45(3):279-87.
- Andrews EB, Gilsenan AW, Midkiff K, Sherrill B, Wu Y, Mann BH, et al. The US postmarketing surveillance study of adult osteosarcoma and teriparatide: Study design and findings from the first 7 years. *J Bone Miner Res.* 2012;27(12):2429-37.
- Carlucci AM, Olano M, Lavallaz L, Sanchez F, Rossi C, Sterin Prynck AE. Biotecnología aplicada a la salud: el caso de la Esclerosis Múltiple. *Parte 2. ByPC* 2019; 83(1):30-39.
- Geneva. Revised monoclonal antibody (mAb) nomenclature scheme Programme on International Nonproprietary Names (INN) Technologies Standards and Norms Regulation of Medicines and other Health Technologies (RHT) Essential Medicines and Health Products (EMP) World Health Organization, Geneva. 2017 Disponible en: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/international-nonproprietary-names-\(inn\)/revised-mab-nomenclature-scheme.pdf?sfvrsn=bb64a8b3_4&download=true](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/international-nonproprietary-names-(inn)/revised-mab-nomenclature-scheme.pdf?sfvrsn=bb64a8b3_4&download=true)
- Goswami S, Wang W, Arakawa T, Ohtake S. Developments and Challenges for mAb-Based Therapeutics. *Antibodies.* 2013 Aug 16;2(4):452-500
- Diab DL, Watts NB. Denosumab in osteoporosis. *Expert Opin Drug Saf.* 2014; 13(2):247-53.
- Morote J, Planas J. Pérdida de masa ósea en pacientes con cáncer de próstata sometidos a deprivación androgénica. *Actas Urológicas Españolas.* 2011;35(4):232-9.
- Miyazaki T, Tokimura F, Tanaka SA. Review of denosumab for the treatment of osteoporosis. *Patient Prefer Adherence* 2014;8:463-71.
- Capozzi A, Lello S, Pontecorvi A. The inhibition of RANK-ligand in the management of postmenopausal osteoporosis and related fractures: The role of denosumab. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(6):403-8.
- Pittman K, Antill YC, Goldrick A, Goh J, de Boer RH. Denosumab: Prevention and management of hypocalcemia, osteonecrosis of the jaw and atypical fractures. *Asia Pac J Clin Oncol* 2017; 13(4):266-76.
- Nakamura S, Tanaka S. Biological therapy for osteoporosis. *Clin Calcium.* 2014; 24(6):919-25.
- Idolazzi L, Rossini M, Viapiana O, Braga V, Fassio A, Benini C, et al. Teriparatide and denosumab combination therapy and skeletal metabolism. *Osteoporos Int.* 2016; 1;27(11):3301-7.
- Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, et al. Sclerostin Antibody Treatment Increases Bone Formation, Bone Mass, and Bone Strength in a Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2009; 24(4):578-88.
- Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Medicine.* 2013; 19: 179-92.
- Sawa H, Korswagen HC. Wnt signaling in *C. elegans*. *WormBook.* 2013; 9 ;1-30.
- Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, MacDougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor . *J Biol Chem.* 2007; 11;282(19):14515-24.
- Manolagas SC. Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas.* 2014;78: 233-7.
- Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005; 8(5):751-64.
- Posada AF, Aguirre HD, Casallas JCG, Patiño JDL, Valle Oñate R. Nuevas terapias en osteoporosis. *Rev Colomb Reumatol.* 2016; 23:34-43.
- Ke HZ, Richards WG, Li X, Ominsky MS. Sclerostin and dickkopf-1 as thera-

- peutic targets in bone diseases. *Endocr Rev.* 2012; 33: 747–83.
32. Delgado-Calle J, Pérez-Campo FM, Riancho JA. Advances in the study of the mechanisms involved in the modulation of the expression of sclerostin in human cells. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2014; 6 (4): 103-8.
 33. Lipton A, Smith MR, Ellis GK, Goessl C. Treatment-induced bone loss and fractures in cancer patients undergoing hormone ablation therapy: Efficacy and safety of Denosumab. *Clin Med Insights Oncol* 2012;6:287-303.
 34. McCole J, Hu L, Womack T, Tang CC, Chiang AY. Single- and Multiple-Dose Randomized Studies of Blosuzumab, a Monoclonal Antibody Against Sclerostin, in Healthy Postmenopausal Women. *J Bone Miner Res* 2014;29(4):935–43.
 35. Wang Z, Goh J, Das De S, Ge Z, Ouyang H, Chong JSW, et al. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng.* 2006;12(7):1753–61.
 36. Liu Y, Wu J, Zhu Y, Han J. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in bone and joint diseases. *Clin Exp Med* 2014; 14: 13–24.
 37. Steinert AF, Rackwitz L, Gilbert F, Nöth U, Tuan RS. Concise Review: The Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells for Musculoskeletal Regeneration: Current Status and Perspectives. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(3):237–47.
 38. Pimentel-Parra GA, Murcia-Ordoñez B. Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatol y Reprod Humana.* 2017;31(1):28–33.
 39. Dolati S, Yousefi M, Mahdipour M, Afrasiabi Rad A, Pishgahi A, Nouri M, et al. Mesenchymal stem cell and bone marrow mononuclear cell therapy for cardiomyopathy: From bench to bedside. *J Cell Biochem.* 2019;1;120(1):45–55.
 40. Schneider S, Unger M, Van Griensven M, Balmayor ER. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. *Eur J Med Res.* 2017; 19;22(1).
 41. Saxer F, Scherberich A, Todorov A, Studer P, Miot S, Schreiner S, et al. Implantation of Stromal Vascular Fraction Progenitors at Bone Fracture Sites: From a Rat Model to a First-in-Man Study. *Stem Cells.* 2016; 1;34(12):2956–66.
 42. Effectiveness of Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells as Osteogenic Component in Composite Grafts - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. Disponible desde: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01532076>.
 43. Saito A, Nagaishi K, Iba K, Mizue Y, Chikenji T, Otani M, et al. Umbilical cord extracts improve osteoporotic abnormalities of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and promote their therapeutic effects on ovariectomized rats. *Sci Rep.* 2018; 8(1), 1–16.
 44. Qi X, Zhang J, Yuan H, Xu Z, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats. *Int J Biol Sci.* 2016; 25;12(7):836–49.
 45. Iaquinta MR, Mazzoni E, Bononi I, Rotondo JC, Mazziotto C, Montesi M, et al. Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. *Front. Cell Dev. Biol.* 2019;7:268-83.
 46. Nielson CM, Liu CT, Smith AV, Ackert-Bicknell CL, Reppe S, Jakobsdottir J, et al. Novel Genetic Variants Associated With Increased Vertebral Volumetric BMD, Reduced Vertebral Fracture Risk, and Increased Expression of SLC1A3 and EPHB2. *J Bone Miner Res.* 2016;31(12):2085–97.
 47. Alonso N, Lucas G, Hysi P. Big data challenges in bone research: genome-wide association studies and next-generation sequencing. *Bonekey Rep.* 2015; 11;4:635.
 48. Tanaka K, Ichiro, Xue Y, Nguyen-Yamamoto L, Morris JA, Kanazawa I, Sugimoto T, et al. FAM210A is a novel determinant of bone and muscle structure and strength. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(16):E3759–68.
 49. Garnero P. The Utility of Biomarkers in Osteoporosis Management. *Mol Diagn Ther.* 2017;21: 401–18.
 50. Vasikaran SD, Chubb SAP, Schneider HG. Towards optimising the provision of laboratory services for bone turnover markers. *Pathology.* 2014;46(4):267–73.
 51. Hay E, Bouaziz W, Funck-Brentano T, Cohen-Solal M. Sclerostin and Bone Aging: A Mini-Review. *Gerontology.* 2016;62(6):618-623.
 52. Chubb SAP, Vasikaran SD. Measurement and Clinical Utility of CTX in Serum and Plasma. *Adv Clin Chem* 2017;81:97-134.
 53. Uebelhart B, Rizzoli R, Ferrari SL. Retrospective evaluation of serum CTX levels after denosumab discontinuation in patients with or without prior exposure to bisphosphonates. *Osteoporos Int.* 2017;1;28(9):2701–5.
 54. Meng J, Zhang D, Pan N, Sun N, Wang Q, Fan J, et al. Identification of miR-194-5p as a potential biomarker for postmenopausal osteoporosis. *Peer J.* 2015;3:e971.
 55. Wang Y, Li L, Moore BT, Peng X-H, Fang X, Lappe JM, et al. MiR-133a in Human Circulating Monocytes: A Potential Biomarker Associated with Postmenopausal Osteoporosis. Huang Q, editor. *PLoS One* 2012;7(4):e34641.
 56. Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng X-H, Lappe JM, Recker RR, et al. MiR-422a as a Potential Cellular MicroRNA Biomarker for Postmenopausal Osteoporosis. *PLoS One.* 2014;9(5):e97098.
 57. Stains JP, Civitelli R. Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol.* 2003;4(7):222.
 58. Saito H, Gasser A, Bolamperti S, Maeda M, Matthies L, Jähn K, et al. TG-interacting factor 1 [Tgif1]-deficiency attenuates bone remodeling and blunts the anabolic response to parathyroid hormone. *Nat Commun.* 2019; 10(1)1354-68.
 59. Hiraoka A, Yano K, Kagami N, Takeshige K, Mio H, Anazawa H, et al. Stem cell growth factor: in situ hybridization analysis on the gene expression, molecular characterization and in vitro proliferative activity of a recombinant preparation on primitive hematopoietic progenitor cells. *Hematol J.* 2001;2(5):307–15.
 60. Wewer UM, Ibaraki K, Schjørring P, Durkin ME, Young MF, Albrechtsen R. A potential role for tetranectin in mineralization during osteogenesis. *J Cell Biol* 1994; 127:1767–1775.
 61. Yue R, Shen B, Morrison SJ. Clec11a/osteolectin is an osteogenic growth factor that promotes the maintenance of the adult skeleton. *eLife* 2016;5:e18782.
 62. Tella SH, Gallagher JC. Biological agents in management of osteoporosis. *Eur J Clin Pharm;* 2014; 70: 1291–301.
 63. Fairfield H, Rosen CJ, Reagan MR. Connecting Bone and Fat: the Potential Role for Sclerostin. *Curr Mol Biol Reports.* 2017; 3(2):114–21.