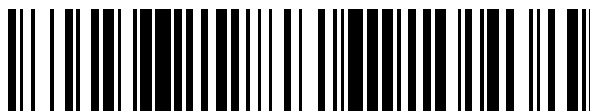


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 748**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2015 PCT/EP2015/063091**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15189345**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2015 E 15728009 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3155120**

54 Título: **Métodos para el diagnóstico y tratamiento de fracturas y trastornos óseos**

30 Prioridad:

**13.06.2014 EP 14172354  
17.12.2014 EP 14198560**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.03.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT FÜR BODENKULTUR WIEN  
(100.0%)  
Gregor Mendel Strasse 33  
1180 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**GRILLARI, JOHANNES;  
GRILLARI, REGINA;  
HACKL, MATTHIAS;  
SCHRAML, ELISABETH y  
WEILNER, SYLVIA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 704 748 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para el diagnóstico y tratamiento de fracturas y trastornos óseos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la terapia, profilaxis y diagnóstico de trastornos que están asociados a una densidad mineral ósea aberrante, en particular osteoporosis.

**Antecedentes de la invención**

La osteoporosis se caracteriza por una reducción sistémica de la masa ósea que conduce a una mayor fragilidad ósea y a un riesgo incrementado de fractura ósea.

10 Entre los métodos actuales para la evaluación precoz del riesgo de fractura, así como de respuesta de tratamiento, se incluyen técnicas no invasivas de obtención de imágenes, así como el análisis de parámetros clínicos y marcadores bioquímicos de renovación ósea. Recientemente se han identificado microARN que se secretan al torrente sanguíneo a partir de células de diversos tejidos, lo que posiblemente indica procesos patológicos en diferentes partes del cuerpo. Existe evidencia de que los microARN desempeñan un papel importante en el desarrollo y funcionamiento de las células formadoras de hueso y reabsorbedoras de hueso, específicamente los osteoblastos y osteoclastos. Ambos tipos celulares controlan la homeostasis entre anabolismo y catabolismo óseo y, por lo tanto, los microARN desempeñan una función fisiológica crucial en el metabolismo óseo. Sin embargo, actualmente no se conoce si un desequilibrio en el metabolismo óseo, que causa enfermedades óseas, puede reflejarse en los niveles circulantes de microARN.

20 Las fracturas osteoporóticas están causadas por un incremento de la fragilidad ósea, que puede producirse debido a una masa ósea baja y cambios en la microestructura del tejido óseo. Tales fracturas son el resultado negativo crítico de la osteoporosis, que afecta a más de 75 millones de personas en los Estados Unidos, Europa y Japón (Kanis et al., 2013). Con un riesgo vital de 30% a 40% de afectación por fracturas vertebrales o no vertebrales en los países desarrollados, la osteoporosis presenta una tasa de incidencia similar a la de la enfermedad cardíaca coronaria. Además, con la excepción de las fracturas de antebrazo, las fracturas osteoporóticas están asociadas a una mortalidad incrementada. La mayoría de fracturas causan un dolor agudo y conducen a la hospitalización, inmovilización y con frecuencia lenta recuperación del paciente.

25 Además, los síntomas osteoporóticos se observan frecuentemente en pacientes con diabetes de tipo 2, quienes generalmente sufren de un riesgo elevado de fracturas de fragilidad. La diabetes mellitus se refiere a un grupo de enfermedades metabólicas en las que el sujeto presenta un nivel elevado de azúcar en sangre. La diabetes tipo 2 resulta de la resistencia a la insulina, una condición en la que las células no consiguen utilizar la insulina correctamente, en ocasiones también con una deficiencia absoluta de insulina. Esta forma se denominaba anteriormente diabetes mellitus insulino-dependiente (NIDDM, por sus siglas en inglés) o 'diabetes de aparición en la adultez'.

30 En la profilaxis, diagnóstico y control de la osteoporosis, la evaluación del riesgo de fractura y la monitorización de la respuesta al tratamiento son dos de los aspectos más importantes. Por tanto, el análisis de la masa ósea mediante la medición de la densidad mineral ósea (DMO) es actualmente el único parámetro clínico del esqueleto que se analiza rutinariamente en la práctica clínica y como parte del cuestionario WHO FRAX (Kanis et al., 2013). Sin embargo, debido a la falta de correlación entre la resistencia ósea y el metabolismo óseo (Cefalu, 2004), diferencias de densidad ósea dependientes de la edad y el sitio, la evaluación de la puntuación T (es decir, una comparación de las DMO de pacientes con la DMO de una persona sana de treinta años de edad) en combinación con otras puntuaciones clínicas establecidas de riesgo de fractura (Rubin et al., 2013) con frecuencia no mejora la predicción del riesgo de fractura. En particular en el caso de pacientes que sufren de diabetes de tipo 2, no existe evidencia de correlación entre la DMO y el riesgo de fractura, demostrando la necesidad de marcadores alternativos de riesgo de fractura.

35 Con el fin de estimar la tasa de formación de hueso, resorción ósea y respuesta de tratamiento terapéutico, se han identificado pocos marcadores bioquímicos de renovación ósea (MRO) (Vasikaran et al., 2011), tales como el propéptido N-terminal del procolágeno tipo I sérico (s-PINP, por sus siglas en inglés), el telopéptido C-terminal del colágeno tipo 1 sérico (s-CTX). Aunque se ha establecido la correlación de estos marcadores con el metabolismo óseo, su especificidad y sensibilidad para la predicción del riesgo de fractura necesita validarse adicionalmente. Por tanto, sólo pocos países han recomendado la incorporación de estos marcadores bioquímicos en la práctica clínica (Vasikaran et al., 2011).

40 Otros marcadores potenciales del metabolismo óseo podrían derivarse de las rutas de señalización que es conocido que desempeñan un papel importante en la formación y resorción óseas, tales como WNT, BMP-2 o RANKL. Por ejemplo, las proteínas derivadas de los genes de Dickkopf-1 (DKK-1) o esclerostina (SOST), pueden actuar como parejas de unión de WNT y receptores de WNT, regulando de esta manera su actividad y posterior formación de hueso (Canalis, 2013). Sin embargo, la estabilidad preanalítica de estas proteínas en suero/plasma en respuesta a dieta, ejercicio y ritmo circadiano es cuestionable, al igual que la significación general para el metabolismo óseo debido al hecho de que estas proteínas también se producen en otros tejidos y podrían estar reguladas en respuesta a otras enfermedades. Especialmente con respecto a determinados tipos de cáncer, se ha demostrado que la señalización

de WNT controla el avance de la enfermedad (Anastas y Moon, 2013).

Recientemente, los microARN (miARN), pequeños ARN no codificantes que regulan la expresión génica (Bartel, 2009), y su importancia en el control del metabolismo óseo han recibido más atención (Dong, Yang, Guo y Kang, 2012; Zhao et al., 2013). Se ha demostrado que varios miARN silencian inhibidores osteogénicos durante la diferenciación de las células madre en osteocitos (Trompeter et al., 2013), regulando la proliferación y diferenciación de los osteoblastos mediados por BMP2 (Li et al., 2008), u organizan la actividad de señalización de WNT (Kapinas, Kessler y Delany, 2009). Por tanto, el potencial de los miARN como agentes terapéuticos para acelerar la regeneración ósea y/o como herramientas diagnósticas para evaluar el metabolismo óseo y el riesgo de fractura ha sido reconocida recientemente (van Wijnen et al., 2013). La impresionante estabilidad del miARN en el suero y el plasma incluso después de someterlo a condiciones duras, el limitado número de miARN (<500 observadas secretadas en plasma/suero), su composición química simple, la falta de modificación post-transcripcional y la disponibilidad de técnicas de cribado altamente sensibles avanzadas y bien establecidas definen los miARN como excelentes candidatos a biomarcadores. De hecho, los miARN circulantes en sangre ya se han analizado en el contexto patológico (Keller et al., 2011), especialmente el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, o procesos no patológicos tales como el envejecimiento (Weiner et al., 2013). Una combinación de miARN que pueda controlar la aparición y avance de la osteoporosis o que pueda servir como marcadores sustitutos de este proceso patológico, es una firma específica de osteoporosis la utilización de la cual representaría un enfoque no invasivo a la predicción del riesgo de fractura, así como una diana para el control terapéutico del avance de la osteoporosis.

El documento nº WO2013/155085 sugiere un método diagnóstico de una baja densidad mineral ósea que detecta hsa-miR-133a en monocitos.

Recientemente, se han identificado e implicado cinco miARN libremente circulantes y miARN de tejido óseo en fracturas osteoporóticas (Seeliger et al., 2014).

El documento nº WO2007/023306 describe la utilización de miARN-223 para el diagnóstico de una enfermedad ósea.

Wang Y. et al., 2012, PlosOne, 7, 4, e34641, informan de miR-133a como potencial biomarcador asociado a la osteoporosis posmenopáusica.

El documento nº WO2011/144761 describe miR-31 para la utilización en el tratamiento de trastornos óseos.

### Compendio de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Es el objetivo de la presente invención ampliar el alcance, especificidad y validez en el diagnóstico de la osteoporosis u osteopenia y en la predicción de fracturas, y proporcionar nuevos agentes para la terapia de la osteoporosis mediante la estabilización de la homeostasis ósea y la curación de fracturas.

El problema queda resuelto por la presente invención.

Los inventores han detectado miARN específicos que resultan regulados positiva o negativamente en muestras de sangre derivadas de pacientes con fracturas osteoporóticas recientes, así como no recientes.

La presente invención proporciona específicamente un juego seleccionado de miARN que resultan regulados específicamente positiva o negativamente y que, de esta manera, resultan útiles como valiosos biomarcadores y que representan una firma diagnóstica aplicable en un amplio abanico de estadios de enfermedad ósea y de grupos de edad.

Según la invención se proporciona un método *in vitro* de diagnóstico de la osteoporosis o para determinar el riesgo de fracturas osteoporóticas en un sujeto, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una muestra de sangre de dicho sujeto,

b) medir el nivel de hsa-miR-188-3p y por lo menos uno de:

1. miARN de grupo II que consisten en hsa-miR-382-3p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-1908, hsa-miR-190a, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-215, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-487b, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-624-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-941 y hsa-miR-942 o isoformas o variantes de las mismas, y/o

2. miARN de grupo III que consisten en hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-154-5p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-

- miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-1908, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-545-3p, hsa-miR-550a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-589-5p, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-598, hsa-miR-627, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-96-5p y hsa-miR-98-5p o isoformas o variantes de las mismas, y
- 5
- 10 c) comparar el nivel de dichos miARN con el nivel del miARN correspondiente en una muestra de sangre o suero de referencia de un individuo sano,
- en donde una diferencia superior a 1,5 veces a dicho nivel en comparación con la muestra de referencia es indicativa de osteoporosis o riesgo de fractura.
- 15 En una realización alternativa de la exposición, el nivel de dichos miARN puede compararse con el nivel medio de los miARN correspondientes en sujetos sanos, específicamente en un grupo de muestras derivadas de sujetos sanos, en donde una diferencia superior a una desviación estándar, específicamente de aproximadamente 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, específicamente de aproximadamente 2 desviaciones estándares o más, es indicativa de osteoporosis con riesgo incrementado de futuras fracturas, específicamente de fracturas osteoporóticas.
- 20 Según una realización adicional, una diferencia superior a 2,5 desviaciones estándares, específicamente de aproximadamente 3, específicamente superior a aproximadamente 3,5 desviaciones estándares, es indicativa de osteoporosis con elevado riesgo de futuras fracturas, específicamente fracturas osteoporóticas.
- 25 De esta manera, se encuentra dentro de la realización de la invención utilizar una única muestra de referencia procedente de un sujeto sano o un grupo de muestras derivadas de sujetos sanos para la comparación con la muestra respectiva procedente de un sujeto que debe diagnosticarse. Dicho grupo puede consistir en 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más muestras, específicamente en hasta 10, 100 o más de 100 muestras de sangre procedentes de individuos diferentes.
- Según una realización específica, se proporciona un método *in vitro* de diagnóstico de osteoporosis o de predicción del riesgo de fracturas en sujetos o poblaciones de sujetos seleccionados, que comprende las etapas de:
- a. proporcionar una muestra de sangre de un sujeto que no sufre o no presenta una predisposición a desarrollar diabetes mellitus, específicamente diabetes mellitus tipo II.
- 30 b. medir el nivel de dos o más miARN seleccionados de cualquiera de los miARN de grupo II tal como se han indicado específicamente anteriormente, y opcionalmente, además
- c. uno o más miARN adicionales que están diferencialmente regulados en individuos osteoporóticos en comparación con individuos sanos, y/o que participan en la diferenciación osteogénica y/o en la activación osteoclastogénica, y
- 35 d. comparar el nivel de dichos miARN o isoformas y variantes de los mismos, con el nivel medio en una cohorte de individuos sanos, en donde una diferencia superior a una desviación estándar, específicamente de aproximadamente 1,5, específicamente de aproximadamente 2 desviaciones estándares en comparación con la referencia es indicativa de osteoporosis con riesgo incrementado de futuras fracturas osteoporóticas, mientras que una diferencia superior a 2,5 desviaciones estándares, específicamente de aproximadamente 3, específicamente de aproximadamente 3,5, más específicamente superior a 3,5 desviaciones estándares, es indicativa de osteoporosis con riesgo elevado de futuras fracturas.
- 40 Según una realización específica adicional, se proporciona un método *in vitro* de diagnóstico de osteoporosis o de predicción del riesgo de fracturas en sujetos o poblaciones de sujetos seleccionados, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una muestra de sangre de un sujeto que se ha diagnosticado que sufre, o presenta una predisposición a desarrollar, diabetes mellitus, específicamente diabetes mellitus tipo II;
- 45 b) medir el nivel de dos o más miARN seleccionados de los miARN de grupo III tal como se han indicado específicamente anteriormente, y opcionalmente, además
- c) uno o más miARN adicionales que están diferencialmente regulados en individuos osteoporóticos en comparación con individuos sanos, y/o que participan en la diferenciación osteogénica y/o en la activación osteoclastogénica, y
- 50 d) comparar el nivel de dichos miARN o isoformas y variantes de los mismos, con el nivel medio en una cohorte o grupo de individuos sanos, en donde una diferencia superior a una desviación estándar, específicamente de aproximadamente 1,5, específicamente de aproximadamente 2 desviaciones estándares en comparación con la referencia es indicativa de osteoporosis con riesgo incrementado de futuras fracturas osteoporóticas, mientras que una diferencia superior a 2,5 desviaciones estándares, específicamente de aproximadamente 3, específicamente de aproximadamente 3,5, más específicamente superior a 3,5 desviaciones estándares, es indicativa de osteoporosis

con riesgo elevado de futuras fracturas.

5 Según una realización adicional, el nivel de dos o más miARN humanos de los miARN de grupo II se mide según el método proporcionado en la presente memoria. Específicamente, se determina el nivel de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 miARN de grupo II y se comparan con el nivel de una muestra de referencia estándar que puede ser una única muestra o un grupo de muestras procedentes de donantes sanos.

10 Según una realización adicional, el nivel de dos o más miARN humanos de los miARN de grupo III se mide según el método del método proporcionado en la presente memoria. Específicamente, se determina el nivel de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 o 74 miARN de grupo III y se comparan con el nivel de una muestra de referencia estándar que puede ser una única muestra o un grupo de muestras procedentes de donantes sanos.

15 Además, cualesquiera combinaciones de mediciones de los niveles de miARN de dichos miARN de grupo II y grupo III tal como se han indicado anteriormente evidentemente se encuentran incorporadas dentro del alcance del método proporcionado en la presente memoria.

Según una realización adicional, se mide el nivel de por lo menos 3, preferentemente de por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, ... Hasta 136 miARN de cualquiera de los grupos II o III.

Según una realización adicional, se mide el nivel de todos los miARN de cualquiera de los miARN del grupo II y/o grupo III.

20 Según un aspecto específico, se proporciona un método en el que se mide el nivel de hsa-miR-127-3p, hsa-miR-133b y hsa-miR-143-3p.

25 Un aspecto específico adicional es proporcionar el método en el que se mide el nivel de hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-941 y hsa-miR-942.

30 Según un aspecto adicional del método, los niveles de por lo menos dos de hsa-miR-188-3p, hsa-miR-382-3p, hsa-miR-942 y hsa-miR-155-5p se miden específicamente para el diagnóstico de la osteoporosis o para determinar el riesgo de fracturas en individuos, específicamente mujeres postmenopáusicas que no presentan signos de la enfermedad diabetes mellitus tipo 2. Opcionalmente, dichos por lo menos dos miARN tal como se han indicado anteriormente pueden medirse en combinación con por lo menos uno de hsa-miR-136-3p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-576-3p y hsa-miR-582-3p.

35 En todavía un aspecto adicional del método proporcionado en la presente memoria, los niveles de por lo menos dos de miR-550a-5p, miR-32-3p, miR-96-5p y miR-486-3p se miden específicamente para el diagnóstico de la osteoporosis o para determinar el riesgo de fracturas en individuos, específicamente mujeres postmenopáusicas que sufren de la enfermedad diabetes mellitus. Opcionalmente, dichos por lo menos dos miARN tal como se han indicado anteriormente pueden medirse en combinación con por lo menos uno de hsa-let-7g-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-7-5p y hsa-miR-92a-3p.

40 En un aspecto adicional, se detecta uno o más miARN adicionales mediante el método proporcionado en la presente memoria, en donde dichos miARN:

i) se regulan diferentemente en individuos osteoporóticos y en individuos sanos y

ii) participan en la diferenciación osteogénica y/o en la activación osteoclastogénica.

45 En una realización adicional de la invención, se miden miARN adicionales en el método inventivo que se seleccionan de miARN de grupo V, que consisten en hsa-miR-140-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-20a, hsa-miR-200a, , hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-26a, hsa-miR-27b, hsa-miR-2861, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34c, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-3960, hsa-miR-503-5p, o isoformas y variantes de los mismos.

Según una realización alternativa, se proporciona un método para determinar si un sujeto presenta osteoporosis o está en riesgo de desarrollar osteoporosis, que comprende las etapas de:

50 a) proporcionar una muestra de sangre o suero de dicho sujeto;

b) medir el nivel de dos o más miARN seleccionados de cualquiera de los miARN de grupo II o III, o cualquiera de los otros miARN anteriormente indicados o isoformas o variantes de los mismos, en dicha muestra de suero o sangre, y

c) comparar el nivel de dichos miARN con el nivel del miARN correspondiente en una muestra de sangre o suero de referencia de un individuo sano,

d) tratar la osteoporosis en el sujeto que muestra una diferencia superior a 1,5 veces en dicho nivel de miARN en comparación con la muestra de referencia.

- 5 En una realización adicional, los sujetos son pacientes osteopénicos que sufren, o están en riesgo de desarrollar, fracturas óseas, o pacientes en riesgo o que sufren de diabetes mellitus tipo 2, en donde dichos sujetos reciben tratamiento si el nivel de dos o más de los miARN respectivos tal como se han indicado anteriormente muestran un incremento o reducción superior a 1,5 veces respecto a la muestra de referencia.

10 De esta manera, el presente método proporciona medios para monitorizar un sujeto y/o para el pronóstico de fractura ósea, específicamente de fractura ósea osteoporótica.

El método inventivo puede utilizarse como ensayo estándar para cualesquiera sujetos en donde deba determinarse un riesgo de fracturas, específicamente dichos sujetos son pacientes de osteoporosis que sufre, o están en riesgo de desarrollar, fracturas óseas, o pacientes que están en riesgo o sufren diabetes mellitus, específicamente diabetes mellitus tipo 2.

- 15 Según una realización específica de la invención, la diferencia de niveles de miARN se determina mediante PCR cuantitativa o digital, secuenciación de ADN/ARN, micromatrices, ensayos de ácidos nucleicos basados en luminiscencia Luminex™, u otras técnicas basadas en la hibridación.

En la presente memoria se da a conocer además una composición para la utilización en el tratamiento o prevención de la osteoporosis o fracturas, que consiste en:

- 20 a) la sustitución de microARN endógenos utilizando por lo menos uno, específicamente por lo menos dos miARN humanos sintéticos aislados, incluyendo isoformas de miARN de los grupos I, II o III, y/o

b) la inhibición y/o degradación de por lo menos dos de los miARN de grupos I, II o III mediante la administración de moléculas sintéticas de antagonistas/inhibidores, que

i. se unen, cortan y, por tanto, reducen el nivel de dichos miARN, y/o

- 25 ii. Se unen y secuestran el miARN diana, por tanto, regulando negativamente la expresión de las secuencias codificantes de dichos miARN.

Específicamente, pueden utilizarse ribozimas para ello.

Específicamente, dicha composición puede utilizarse en la preparación de un medicamento.

### Figuras

- 30 Figura 1: modelos de clasificación multivariante. A) Curvas características de receptor-operador (ROC, por sus siglas en inglés) para la clasificación de mujeres postmenopáusicas con fracturas no recientes (Fx) respecto de pacientes de control (Co), basadas en combinaciones de 1-4 miARN: hsa-miR-188-3p, hsa-miR-382-3, hsa-miR-942 y hsa-miR-155-5p. b) Diagramas de cajas que representan valores de Cp normalizados de los miARN de a) en muestras de suero de mujeres postmenopáusicas con y sin fracturas osteoporóticas no recientes. C) curvas ROC para la clasificación de mujeres diabéticas tipo 2 que sufren de fracturas osteoporóticas no recientes (DMFx) respecto de pacientes de control diabéticos sin fracturas (DM), basadas en combinaciones de 1-4 miARN: miR-550a-5p, miR-32-3p, miR-96-5p y miR-486-3p. d) Diagramas de cajas que representan valores de Cp normalizados de los miARN en c) en muestras de suero de muestras de DMFx vs DM.

- 40 Figura 2: modelos de clasificación multivariante: la expansión o sustitución de modelos de 4 parámetros con miARN adicionales mejora el resultado de la clasificación. a) Osteoporosis en mujeres postmenopáusicas sin diabetes tipo 2: el efecto de combinar el análisis de hsa-miR-188-3p con hasta 9 miARN sobre la clasificación de pacientes de fractura mujeres se muestra como valores de AUC derivados del análisis de ROC. b)

- 45 Osteoporosis en pacientes con diabetes tipo 2: el efecto de combinar el análisis de miR-550a-5p con hasta 9 microARN sobre la clasificación de pacientes de fractura mujeres con diabetes tipo 2 se muestra como valores de AUC del análisis de ROC. AUC=1,0 representa una clasificación perfecta.

### Descripción detallada de la invención

- 50 La diferenciación osteogénica se define como el proceso durante el que una célula madre mesenquimal o células madre derivada de tejido adiposo resulta activada para proliferar y diferenciarse en un osteoblasto. Este proceso se caracteriza por la secreción de fosfatasa alcalina (ALP), cambios en la expresión génica, tal como osteocalcina, RUNX2 y ALP, y una incorporación incrementada de calcio.

La formación osteoclastogénica se define como el proceso durante el que los monocitos (es decir, macrófagos) resultan activados por RANKL y M-CSF, formando osteoclastos, que se caracteriza por la liberación de H<sup>+</sup>, proteasas específicas y otros enzimas, tales como la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP, por sus siglas en inglés) y, la catepsina K, que ayuda en la resorción ósea.

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "muestra de sangre" se refiere a suero, plasma, sangre completa y sus componentes, y productos o preparaciones derivadas de sangre. El plasma y el suero resultan muy útiles, tal como se muestra en los ejemplos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" o "individuo" o "paciente" se referirá a un mamífero de sangre caliente, en particular un ser humano.

- 10 El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros sujetos mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico o en los que se diagnostica una enfermedad específica, tal como, aunque sin limitación, osteoporosis o diabetes mellitus.

El término "tratamiento" pretende, de esta manera, incluir tanto el tratamiento profiláctico como el terapéutico.

- 15 Tal como se utiliza en el mismo, la expresión "cohorte de individuos" o "grupo de individuos" se referirá a un grupo de individuos sanos y puede referirse específicamente a las muestras recibidas de dichos individuos. El número de individuos de una cohorte puede variar, es decir, puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más individuos; sin embargo, también puede ser un grupo más grande de sujetos, tal como, por ejemplo, aunque sin limitación, 10, 50, 100 o más individuos. Según la realización de la invención, la cohorte también puede comprender cohortes grandes de 500 o más individuos.

- 20 Según la invención, el término "aproximadamente" comprende los valores explícitamente recitados, así como pequeñas desviaciones respecto a los mismos. Por consiguiente, una desviación respecto a un valor recitado de 10%, preferiblemente de 5%, preferiblemente de 1% se encuentra comprendida en el término "aproximadamente". Según la invención, se evaluaron sujetos con osteoporosis primaria (postmenopáusica) de edades medias de aproximadamente 60 años, lo que contrasta con la pérdida ósea y riesgo de fractura debidos a osteoporosis senil, que afecta a sujetos de aproximadamente 70 o más años.

- 25 La expresión "éxito de tratamiento" tal como se utiliza en la presente memoria se define como el mantenimiento de la densidad ósea o el retraso del proceso de osteoporosis y la reducción del riesgo de romper un hueso (fractura osteoporótica) como resultado de osteoporosis. Por tanto, un marcador que predice el éxito del tratamiento debe estar preferentemente relacionado con el resultado clínico para un paciente, es decir, la reducción del riesgo de fractura. Un éxito del tratamiento moderado reduce el riesgo de fractura entre aproximadamente 25% y hasta aproximadamente 50%. Un éxito del tratamiento elevado da como resultado una reducción del riesgo superior a 50%.

La presente exposición proporciona miARN seleccionados para la utilización en un método de diagnóstico de osteoporosis, determinando el riesgo de desarrollar lesiones o fracturas osteoporóticas o monitorizando el tratamiento en sujetos sometidos a terapia, específicamente el tratamiento de la osteoporosis o diabetes.

- 35 Dichos miARN son hsa-miR-382-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-32-3p hsa-let-7b-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-154-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-1908, hsa-miR-190a, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-215, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-410, hsa-miR-451a, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487b, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-545-3p, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-550a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-589-5p, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-598, hsa-miR-624-5p, hsa-miR-627, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-96-5p y hsa-miR-98-5p- o isoformas o variantes de los mismos.

La detección de un incremento o reducción del nivel de dos o más de dichos miARN en comparación con el nivel en sujetos sanos puede utilizarse para predecir un riesgo de osteoporosis o fracturas en un sujeto.

- 55 Específicamente, medir un incremento del nivel de miARN de grupo II, específicamente de dos o más de dichos miARN, que consisten en hsa-miR-382-3p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-1908, hsa-

- miR-190a, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-215, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-487b, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-624-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-941, hsa-miR-942 o isoformas o variantes de los mismos, pueden utilizarse como un indicador específico de osteoporosis o riesgo de osteoporosis. Dicho incremento o reducción de miARN se basa específicamente en datos derivados de niveles en sangre o suero en sujetos que estaban sufriendo de fracturas no recientes.
- 5 Según una realización específica, se combina hsa-miR-188 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- 10 Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-382 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-155 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-502 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-136 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-203 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- 15 Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-550 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- Específicamente, medir un incremento del nivel de miARN de grupo III, específicamente de dos o más de dichos miARN, que consisten en hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-154-5p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-1908, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-545-3p, hsa-miR-550a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-589-5p, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-598, hsa-miR-627, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-96-5p y hsa-miR-98-5p o isoformas o variantes de los mismos, puede ser un indicador específico de osteoporosis o riesgo de desarrollar osteoporosis o riesgo de lesiones o fracturas óseas en sujetos que están sufriendo de diabetes tipo II.
- 20
- 25
- 30 Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-32 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-486 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-96 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- Según una realización específica adicional, se combina hsa-miR-942 con por lo menos uno de los miARN del grupo II o III.
- 35 Específicamente, la medición o detección de los niveles de miARN adicionales que consisten en hsa-miR-100, hsa-miR-124a, hsa-miR-148a, hsa-miR-23a, hsa-miR-24, hsa-miR-31, hsa-miR-22-3p y hsa-miR-93 o isoformas o variantes de los mismos, en combinación con por lo menos dos de cualquiera de los miARN de grupo II o III puede ser un indicador adicional de osteoporosis o riesgo de desarrollar osteoporosis o riesgo de lesiones o fracturas óseas en sujetos.
- 40 Específicamente, la medición o detección de los niveles de miARN adicionales que consisten en hsa-miR-140-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-20a, hsa-miR-200a, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-26a, hsa-miR-27b, hsa-miR-2861, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34c, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-3960, hsa-miR-503-5p, o isoformas y variantes de los mismos, en combinación con por lo menos dos de cualquiera de los miARN de grupo II o III puede ser una indicación adicional de osteoporosis o riesgo de desarrollar osteoporosis o riesgo de lesiones óseas o fracturas en sujetos.
- 45 Específicamente, los niveles diferentes de por lo menos dos de miR-188-3p, miR-382-3p, miR-155-5p y miR-942 respecto del nivel en sujetos sanos son indicativos de riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas sin diabetes tipo 2. La sensibilidad y especificidad del diagnóstico de riesgo de fractura y/o osteoporosis en este grupo de pacientes puede mejorarse adicionalmente mediante la inclusión de marcadores de miARN adicionales seleccionados de hsa-miR-136-3p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-576-3p y/o hsa-miR-582-3p en el análisis. Son realizaciones específicas, aunque sin limitarse a las mismas, las combinaciones de marcadores:
- 50 miR-188-3p y miR-382-3p;



miR-188-3p, miR-382-3p y miR-942;

miR-188-3p, miR-382-3p, miR-155-5p y miR-942;

miR-188-3p, miR-382-3p, miR-942, hsa-miR-502-5p y hsa-miR-136-3p;

miR-188-3p, miR-382-3p, miR-942, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-136-3p y hsa-miR-502-5p;

5 miR-188-3p, miR-382-3p, miR-942, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-502-5p y hsa-miR-550a-5p;

miR-188-3p, miR-382-3p, miR-942, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-550a-5p y hsa-miR-181a-3p;

10 miR-188-3p, miR-382-3p, miR-942, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-181a-3p y hsa-miR-378a-5p.

Según realizaciones alternativas adicionales, los diferentes niveles de por lo menos dos de miR-550a-5p, miR-32-3p, miR-96-5p y miR-486-3p respecto del nivel en sujetos sanos son indicativos de riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas que sufren de diabetes tipo 2. La sensibilidad y especificidad del diagnóstico de riesgo de fractura y/o osteoporosis en este grupo de pacientes puede mejorarse adicionalmente mediante la inclusión de marcadores de miARN adicionales seleccionados de hsa-let-7g-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-7-5p y hsa-miR-92a-3p. Son realizaciones específicas, aunque sin limitarse a las mismas, las combinaciones de marcadores:

miR-550a-5p y miR-32-3p;

miR-550a-5p, miR-32-3p y miR-96-5p;

20 miR-550a-5p, miR-32-3p, miR-96-5p y miR-486-3p;

miR-550a-5p, miR-32-3p, miR-96-5p, miR-486-3p y hsa-miR-203a;

miR-550a-5p, miR-96-5p hsa-let-7g-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-323a-3p y hsa-miR-500a-5p;

miR-550a-5p, miR-96-5p, miR-32-3p hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-143-5p, miR 532-3p y hsa-miR-92-3p; miR-550a-5p, miR-96-5p, miR-32-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-203a, hsa-let-7g-5p y hsa-miR-92a-3p;

25 miR-550a-5p, miR-96-5p, miR-32-3p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-181c-5p, miR-16-2-3p, hsa-let-7-5p y hsa-miR-92a-3p;

miR-550a-5p, miR-96-5p, miR-486-3p, miR 532-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-203a, miR-16-2-3p, hsa-let-7-5p y hsa-miR-32-3p.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "microARN" o "miARN" o "miR" se refiere a una molécula de ARN no codificante de entre 17 y 25 nucleótidos que se hibrida con ARN mensajero codificante y regula la expresión del mismo. La expresión "molécula de miARN" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que representa el miARN, incluyendo moléculas de miARN naturales, es decir, el miARN maduro, pre-miARN o pri-miARN.

"Precursor de miR", "pre-miARN" o "pre-miR" se refieren a un ARN no codificante que presenta una estructura de horquilla, que contiene un miARN. Un pre-miARN es el producto del corte de un transcrito de mi-ARN primario o "pri-miR" por la endonucleasa específica de ARN de doble cadena conocida como Drosha. Los precursores pueden ser formas de los polinucleótidos respectivos tal como ocurren durante la maduración de los polinucleótidos respectivos. Específicamente, se indican ejemplos de dichos precursores en las tablas 2 a 4; específicamente, son los SEQ ID n° 16 a 30, 78 a 124, 270, 197 a 268, 272 y/o 274.

40 Las secuencias de nucleótidos de los miARN maduros y sus precursores respectivos son conocidos en la técnica y se encuentran disponibles en la base de datos miRBase en <http://www.mirbase.org/index.shtml> o en la base de datos de Sanger, en <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/ftp.shtml>. Las secuencias de nucleótidos también se describen específicamente en las tablas 2 a 4 incluyendo la referencia a los números de acceso del banco genómico correspondiente.

45 Polinucleótidos idénticos tal como se utilizan en la presente memoria en el contexto de un polinucleótido que se detectará o inhibirá en el contexto de la presente invención pueden presentar una secuencia de ácido nucleico con una identidad de por lo menos 90%, 95%, 97%, 98% o 99% respecto de un polinucleótido que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID n° 1 a 15, 269, 31 a 77, 125 a 196, 271 y/o 273.

50 Además, polinucleótidos idénticos tal como se utilizan en la presente memoria en el contexto de un polinucleótido que se detectará o inhibirá en el contexto de la presente invención pueden presentar una secuencia de ácido nucleico con una identidad de por lo menos 90%, 95%, 97%, 98% o 99% respecto de un polinucleótido que comprende o que

consiste en la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID n° 1 a 15, 269, 31 a 77, 125 a 196, 271 y/o 273, incluyendo uno, dos, tres o más nucleótidos de la secuencia de pre-miARN correspondiente en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la secuencia semilla respectiva.

5 Para el propósito de la invención, "isoformas y variantes" (que también se han denominado "iso-miR") de un miARN de referencia incluyen variantes de recorte (variantes de recorte 5' en las que el sitio de fragmentación 5' se encuentra cadena arriba o cadena abajo de la secuencia de miARN de referencia; variantes de recorte 3': el sitio de fragmentación 3' se encuentra cadena arriba o abajo de la secuencia de miARN de referencia), o variantes que presentan una o más modificaciones de nucleótidos (adición de nucleótido 3' al extremo 3' del miARN de referencia; sustitución de nucleótido mediante el cambio de nucleótidos del miARN precursor) o la cadena de microARN madura  
10 complementaria, incluyendo sus isoformas y variantes (por ejemplo, para un microARN maduro 5' dado, el microARN duro 3' complementario y viceversa). Con respecto a la modificación de nucleótidos, los nucleótidos relevantes para la unión ARN/ARN, es decir, la región semilla 5' y los nucleótidos en el lado de corte/anclaje están exentos de modificación.

15 A continuación, a menos que se indique lo contrario, el término "miARN" comprende cadenas 3p y 5p y también sus isoformas y variantes.

Específicamente, el término "miR-respectivo\_número-3p" tal como se utiliza en la presente memoria en la especificación también comprende su miARN 5p complementario y viceversa.

En realizaciones específicas, los miARN de interés se detectan utilizando un nucleótido que se hibrida, preferiblemente bajo condiciones restrictivas, con dicho miARN de interés y medir la señal de hibridación.

20 En una realización preferente, el nivel de miARN de interés se determina mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los métodos de PCR son bien conocidos en la técnica y son ampliamente utilizados; incluyen PCR en tiempo real cuantitativa, PCR semicuantitativa, PCR multiplex, PCR digital o cualquier combinación de las mismas. En una realización particularmente preferente, los niveles de miARN se determinan mediante PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR). Los métodos para determinar los niveles de miARN mediante la utilización de qRT-PCR son  
25 conocidos en la técnica y habitualmente vienen precedidos por la transcripción inversa de un miARN en ADNc.

En los métodos de PCR que resultan útiles en la presente invención, los cebadores habitualmente se basan en la molécula de miARN madura, aunque pueden incluir modificaciones químicas para optimizar el comportamiento de hibridación.

30 Los métodos de qRT-PCR pueden determinar el nivel absoluto de expresión de un miARN. Alternativamente, los métodos de qRT-PCR pueden determinar la cantidad relativa de un miARN. La cantidad relativa de un miARN puede determinarse mediante la normalización del nivel de miARN respecto al nivel de una o más secuencias de ácido nucleico de estándar interno. En general, tales secuencias de ácido nucleico de estándar interno deben presentar un nivel constante en la muestra de sangre o suero analizada. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico de estándar interno pueden ser secuencias de ácido nucleico ARN transcritas constitutivamente, tales como ARNm como  
35 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), beta-actina (ACTb), o ARN no codificantes, tales como ARN ribosómico 5S y 18S, RNU48, RNU44 y RNU6. Además, los miARN que presentan niveles constantes y elevados en suero o plasma, tales como miR-23a-3p, miR-23b-3p, miR-15-5p o miR-16-5p, pueden utilizarse como referencias para la cuantificación relativa. Además, pueden utilizarse secuencias de ARN sintético en cantidad equimolar durante el aislamiento del ARN o síntesis del ADNc como referencias para la cuantificación relativa de miARN específicos.

40 Se proporciona una visión general de los métodos de cuantificación mediante PCR en tiempo real útiles en la presente invención en Schmittgen et al., 2008, Methods. Enero; 44(1): 31-38.

Los cebadores para la detección de miARN se encuentran disponibles comercialmente, p.ej. Como juegos de cebadores de PCR LNA<sup>TM</sup> de microARN de Exiqon.

45 Debido a que los miARN son moléculas relativamente cortas, puede resultar útil, tal como se sugiere en, p.ej., el documento n° WO2011/14476, alargarlas mediante la adición de monómeros de adenosina a la cadena (una técnica denominada poliadenilación) antes de la transcripción inversa y la amplificación. Brevemente, puede extraerse el ARN de la muestra con un reactivo adecuado (p.ej., el reactivo Trizol), poliadenilarse en presencia de ATP y polimerasa poli(A), transcribirse inversamente en ADNc utilizando un adaptador poli(T) y secuencia 5'-RACE, y amplificarse utilizando un cebador directo derivado del extremo 3' del miARN y un cebador inverso de RACE. Entre las mejoras de esta técnica se incluyen el diseño del cebador de RACE con un nucleótido en su extremo 3' (que constituye una A, C  
50 o G, pero no una T, de manera que se excluye el cebador en cualquier sitio de la secuencia de poliA y se fuerza el cebado en la secuencia del miARN) o cebadores de RACE que están anclados en el extremo del ADNc 3' de un microARN específico utilizando 2, 3, 4 o más nucleótidos con o sin modificación química.

55 La detección de un miARN también puede llevarse a cabo mediante otros métodos conocidos en la técnica, p.ej. los descritos en el documento n° WO2011/14476, como el método de secuenciación profunda, la cuantificación a base de perlas, p.ej., las matrices de perlas de Illumina, la cuantificación basada en partículas de hidrogel, p.ej., Firefly<sup>TM</sup>, mediante tecnología de micromatrices, p.ej., la matriz de miARN humano Ncode<sup>TM</sup> disponible de Invitrogen, matrices

de chip disponibles de Affymetrix, o micromatrices que utilizan sondas de captura de esqueleto de ANB (matrices miRCURY LNA™), p.ej. de Exiqon.

5 La diferencia de niveles de miARN también puede determinarse utilizando ensayos multiplex de ácidos nucleicos basados en quimioluminiscencia, tales como Panomics, o ensayos de plásmidos informadores ("biosensores") que contienen proteínas informadoras con sitios reguladores complementarios a microARN, u otras técnicas basadas en la hibridación conocidas en la técnica.

La utilización de miARN en un método de la exposición resulta útil para diagnosticar trastornos óseos asociados a una densidad mineral ósea baja (debido a un metabolismo óseo aberrante, que se refleja en los miARN secretados) como la osteoporosis y, en particular, para evaluar el riesgo de fracturas osteoporóticas.

10 La presente exposición proporciona específicamente un juego de miARN que representan una firma diagnóstica aplicable en un amplio abanico de estadios de enfermedad ósea y grupos de edad. En particular, la detección de miARN a), que están regulados diferentemente en la sangre o suero de pacientes más jóvenes que los incluidos en el estudio de Seeliger et al., supra, b) que están regulados diferentemente en pacientes con fracturas no recientes, y/o  
15 c) que están regulados diferentemente en pacientes de diabetes tipo 2 con fracturas no recientes, proporciona una herramienta diagnóstica y predictiva con una significancia más elevada para el diagnóstico precoz, el pronóstico a largo plazo y el cribado de pacientes con un riesgo elevado de fracturas.

Los biomarcadores con valor pronóstico del avance de enfermedad son de la máxima importancia para minimizar la incidencia de fracturas osteoporóticas severas. Actualmente, una incidencia elevada de fracturas osteoporóticas puede atribuirse a métodos diagnósticos no específicos que se basan en gran medida en imágenes del hueso y  
20 parámetros clínicos rutinarios y características visibles tales como sexo, edad, estilo de vida e historia familiar y puntuaciones FRAX™. Sin embargo, la evaluación estos parámetros no es directamente relevante para el metabolismo óseo y la actividad de osteoblastos/osteoclastos. Por tanto, persiste una elevada variación del riesgo de fractura individual, a pesar de las directrices generales que incluyen FRAX™ y DMO. El diagnóstico precoz utilizando microARN se basa en una lectura del metabolismo óseo y, de esta manera, en la fisiopatología de las enfermedades  
25 mismas. Este análisis es, por tanto, más específico al paciente individual.

Según otro aspecto, se describen composiciones terapéuticas para el tratamiento de fracturas óseas y trastornos óseos como la osteoporosis, o en el contexto de la diabetes tipo 2, en particular para la prevención o curación de fracturas.

Específicamente, una composición puede comprender:

30 a. por lo menos un, específicamente por lo menos dos miARN humanos aislados o sintéticos de entre los miARN hsa-miR-382-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-154-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-  
35 miR-16-2-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-1908, hsa-miR-190a, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-215, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-328-3p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-410, hsa-miR-451a, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487b, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-545-3p, hsa-miR-548a-3p,  
40 hsa-miR-550a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-589-5p, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-598, hsa-miR-624-5p, hsa-miR-627, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-98-5p o isoformas y  
45 variantes de los mismos, y/o

b. un antagonista/inhibidor de por lo menos un, específicamente por lo menos dos miARN de entre sa-miR-382-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-154-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-1908, hsa-miR-190a, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-215, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-

328-3p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-376a-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-410, hsa-miR-451a, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487b, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-545-3p, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-550a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-589-5p, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-598, hsa-miR-624-5p, hsa-miR-627, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-96-5p, hsa-miR-98-5p o isoformas y variantes de los mismos que:

- i. reduce el nivel de dichos miARN, y/o
- 10 ii. inhibe o regula negativamente la expresión de las secuencias codificantes de dichos miARN o degrada o corta dichos miARN, específicamente seleccionados de ribozimas.

Según otro aspecto, la composición contiene además uno o más miARN seleccionados de hsa-miR-140-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-20a, hsa-miR-200a, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-26a, hsa-miR-27b, hsa-miR-2861, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34c, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-3960, y hsa-miR-503-5p, o isoformas y variantes de los mismos, tal como se definen en la presente memoria, o inhibidores o antagonistas de los mismos que reducen el nivel de dichos miARN, y/o

15 inhibe o regula negativamente la expresión de las secuencias codificantes de dichos miARN o degrada o corta dichos miARN, específicamente seleccionados de ribozimas.

Según otro aspecto, la composición contiene además uno o más miARN seleccionados de hsa-miR-188-3p, hsa-miR-382-3p, hsa-miR-942, hsa-miR-155-5p, opcionalmente en combinación con hsa-miR-136-3p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-576-3p y hsa-miR-582-3p, o isoformas y variantes de los mismos, tal como se definen en la presente memoria, o inhibidores o antagonistas de los mismos que reducen el nivel de dichos miARN, y/o

20 inhibe o regula negativamente la expresión de las secuencias codificantes de dichos miARN o degrada o corta dichos miARN, específicamente seleccionados de ribozimas.

Según todavía otro aspecto, la composición contiene además uno o más miARN seleccionados de miR-550a-5p, miR-32-3p, miR-96-5p y miR-486-3p, opcionalmente en combinación con hsa-let-7g-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-7-5p y hsa-miR-92a-3p 3p, o isoformas y variantes de los mismos, tal como se definen en la presente memoria, o inhibidores o antagonistas de los mismos que reducen el nivel de dichos miARN, y/o

30 inhibe o regula negativamente la expresión de las secuencias codificantes de dichos miARN o degrada o corta dichos miARN, específicamente seleccionados de ribozimas.

Estos miARN o sus inhibidores/antagonistas, respectivamente, pueden utilizarse en combinación con los miARN indicados en el párrafo anterior o como componentes individuales o en cualquier combinación de los mismos.

35 Si el miARN mismo o un inhibidor/antagonista del mismo se incorpora como ingrediente activo en la composición terapéutico no sólo depende de si tal miARN se encuentra regulado positiva o negativamente en un paciente en riesgo de una fractura osteoporótica, sino de su función específica en la diferenciación osteogénica o en la activación osteoclastogénica. A título de ejemplo, si un miARN, que funciona como inhibidor de la diferenciación osteogénica, se encuentra regulado positivamente en la osteoporosis, tal como se muestra en la Tabla 1 o específicamente, tal como se conoce para miR 31-5p, o si funciona como promotor de la osteoclastogénesis como miR-148a-5p, un inhibidor/antagonista de tal miARN será el ingrediente activo en la composición de la invención.

40 A continuación, a menos que se indique lo contrario, la expresión "terapéutico de miARN" se utiliza tanto para el miARN mismo como para el inhibidor/antagonista de miARN respectivo.

Un terapéutico de miARN generalmente se basa en la secuencia del miARN maduro diana. Los terapéuticos para las terapias de sustitución de miARN necesitan compartir la mayor parte de la secuencia del miARN maduro que se sustituye. Se requiere una homología de secuencias exacta en la región semilla 5' del miARN. Los terapéuticos diseñados para inhibir específicamente la función del miARN (oligonucleótidos, anti-microARN, AMO, por sus siglas en inglés) necesitan ser complementarios a la secuencia diana de manera que se consiga una hibridación estable y por tanto el secuestro del miARN. Los AMO pueden contener modificaciones químicas que causan la formación de ARN dúplex estables, tales como un esqueleto fosforotioato, o modificaciones de ANB y 2'-OMe de los residuos sacáridos, respectivamente.

50 Si un miARN que se encuentra regulado positiva o negativamente en suero/plasma de sujetos con trastornos óseos, puede estar causalmente relacionado con la enfermedad debido a su función en la formación del hueso, puede determinarse mediante la evaluación del efecto de estos miARN sobre la diferenciación osteogénica: la transfección de microARN sintéticos en células madre mesenquimales se lleva a cabo antes del inicio de la diferenciación

55

osteogénica. Mediante la utilización de ensayos que cuantifican el marcador osteogénico temprano fosfatasa alcalina (ALP), p.ej., mediante qPCR, transferencia western, o enzimáticamente, o ensayos que determinan la deposición de calcio, p.ej. mediante tinción con alizarina, tal como describen Deng et al. (Deng et al., 2014), pueden llegarse a conclusiones sobre la importancia de un miARN sobre la formación ósea.

5 Alternativamente, puede someterse a ensayo rutinariamente un terapéutico de miARN para su utilidad en la presente invención mediante transfección de células madre mesenquimales (CMM) o, como modelo de CMM, células madre derivadas de tejido adiposo (CMTA), con constructos de vector de mamífero que contienen la secuencia de ADN codificante del terapéutico de miARN y determinar su efecto sobre la diferenciación osteogénica tal como se ha descrito anteriormente.

10 Las CMM y CMTA pueden obtenerse mediante métodos conocidos, p.ej. tal como describen Wolbank et al., 2007 (Tissue Eng 13, 1173-1183) y Wolbank et al., 2009 (Tissue Eng Part A 15, 1843-1854).

Un miARN que se ha confirmado que participa en la regeneración ósea y, de esta manera, que estimula la cicatrización ósea, resulta útil como el ingrediente activo en una composición farmacéutica de la invención.

15 Si un miARN que se encuentra regulado positiva o negativamente en suero/plasma de sujetos con trastornos óseos, puede estar causalmente relacionado con la enfermedad debido a su función en la formación del hueso, puede determinarse mediante la evaluación del efecto de estos miARN sobre la formación de osteoclastos: se lleva a cabo la transfección de microARN sintético en células mononucleares de sangre periférica CD14+ antes del inicio de la formación de osteoclastos mediante RANKL y M-CSF. Utilizando ensayos que cuantifican marcadores de osteoclastos, tales como la actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), y la expresión de receptor de calcitonina y RANK, pueden extraerse conclusiones sobre la importancia de un miARN para la resorción ósea. Puede obtenerse un miARN a partir de un precursor de miR utilizando células intactas o lisados celulares o puede producirse *in vitro* utilizando enzimas de procesamiento aislados, tales como Drosha/Dgcr8 y Dicer aislados. También puede producirse un miARN mediante síntesis química, sin que haya sido procesado a partir de un precursor de miR.

25 Los antagonistas/inhibidores de los miARN son bien conocidos en la técnica y se encuentran disponibles comercialmente inhibidores de miARN personalizados. Por ejemplo, los antagonistas/inhibidores en el contexto de la presente invención pueden ser moléculas de ácido nucleico, tales como antago-miR (Kriitzfeldt, Nature (2005), 438: 685-689) o cualquier otro oligonucleótido T-O-metil-ARN con enlaces fosforotioato y una cola de colesterol, inhibidores de microARN miRCURY LNA™ (Exiqon), inhibidores de miARN *in vivo* LNA™ (Exiqon), ANB minúsculos (Obad, Nat Genet (2011), 43(4): 371-378), miR-decoys or miR-sponges (Ebert, Nat Methods (2007), 4: 721-726; Bond, Nat Med (2008), 14: 1271-1277) o similares. Un antagonista/inhibidor también puede ser un enzima degradador de miARN o derivado del mismo, tal como se describe en Chatterjee, Nature (2009), 461: 546-9, ribozimas cabeza de martillo tal como se describe en Tedeschi, Drug Discov Today (2009), 14: 776-783, o antagomirzimas tal como se describe en Jadhav, Angew Chem Int Ed Engl (2009), 48(14): 2557-2560. En el contexto de la presente invención, los antagmiR, inhibidores de microARN miCURY LNA™, inhibidores de miR *in vivo* LNA™, ANB minúsculos, señuelos de miR o esponjas de miR.

35 En una realización adicional, el ingrediente activo de la composición farmacéutica se selecciona según los principios de la denominada "medicina personalizada", es decir, se correlaciona con los resultados del método diagnóstico de la invención, que sería, en este caso, un denominado diagnóstico "acompañante". Esto significa que la decisión sobre la administración terapéutico de un miARN con el objetivo de sustituir o inhibir un miARN específico está estrechamente asociada a un procedimiento diagnóstico asociado en el que se analiza el nivel del miARN específico en un individuo.

Pueden utilizarse promotores específicos de osteoclasto, tales como el receptor de calcitonina (CalcR), RANK (receptor activador de NFκB), receptor de factor 1 estimulante de colonias (c-Fms) y catepsina-K (CathK).

45 En realizaciones de administración local, p.ej. para acelerar la cicatrización ósea después de una fractura, la molécula de ácido nucleico codificante del terapéutico de miARN puede administrarse en el sitio de interés mediante vectores víricos o no víricos o como ADN o ARN desnudo. Según la revisión de Pelled et al., 2010 (Tissue Engineering: Part B, volumen 16, nº 1, 13-20), la localización de la molécula terapéutica dentro del sitio de fractura puede garantizarse mediante la introducción física en el sitio diana o mediante liberación génica a partir de un biomaterial tridimensional implantado en la zona del defecto o sitio próximo, incluyendo adhesivos biológicos tales como polímeros de fibrinógeno y trombina. Entre los métodos de introducción física útiles se incluyen la inyección directa del miARN o complejos de lípido-microARN formado a partir de agentes tales como el terapéutico polietilenoimina (PEI) en el sitio de fractura. Preferiblemente, con el fin de que la molécula de ácido nucleico penetre en las células *in situ*, se administra en estado de complejo utilizando liposomas o PEI. Alternativamente, el miARN podría ser transcrito por un virus. Preferiblemente, se utiliza un vector adenovírico, tal como se describe para expresar la proteína morfogenética ósea (PMO) en Egermann et al., 2006 (Hum Gene Ther. May; 17 (5):507-17).

55 Alternativamente a la utilización de un vector, puede utilizarse la electroporación o sonoporación *in vivo* para administrar el terapéutico localmente. Utilizando estos métodos, el miARN o la molécula de ADN codificante de miARN se inyecta directamente en una fractura y se aplica un pulso eléctrico o sonda ultrasónica en el sitio transcutáneamente

o percutáneamente. Dichos miARN o antagonistas/inhibidores de los mismos también pueden ser parte de sellantes de fibrina, utilizados específicamente para la reparación y regeneración óseas.

5 En una realización adicional, pueden implantarse en el sitio del defecto células madre mesenquimales derivadas de cualquier fuente, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, médula ósea, tejido adiposo, tejido umbilical, orina, o placenta, manipuladas genéticamente para sobreexpresar o suprimir el miARN terapéutico (Marie, 2011, Osteoporos Int 22:2023-2026, Deng *et al.*, *supra*).

10 En una realización alternativa, la localización del terapéutico de miARN en el sitio de interés, p.ej. el sitio de fractura, p.ej. mediante expresión del transgén, se lleva a cabo mediante, en primer lugar, la unión del ADN/ARN terapéutico del miARN a un sistema de transporte (p.ej. mediante adsorción, encapsulado o inmovilización, o mediante unión covalente; Luginbuehl *et al.*, 2004, Eur J Pharm Biopharm 58:197-208) seguido de la implantación de la matriz activada génicamente (GAM, por sus siglas en inglés) en el sitio del defecto, p.ej. tal como se describe en Fang *et al.*, 1996 (Proc Natl Acad Sci USA 93, 5753).

15 Las matrices útiles (GAM, "matrices activadas génicamente") se han descrito en el contexto de matrices para el transporte de miARN. También en el caso de que se administre localmente el miARN terapéuticamente activo o un inhibidor/antagonista del mismo, como tal o incorporado en una matriz, puede enlazarse ventajosamente a una molécula de localización y tránsito óseos. Esto puede llevarse a cabo mediante el enlace del vehículo de transporte, p.ej. un liposoma, que se utiliza para acomplejar el terapéutico de miARN, con la molécula de localización y tránsito óseos. En el caso de que deba administrarse localmente una molécula de ácido nucleico, la incorporación de la molécula de localización y tránsito óseos se lleva a cabo enlazándola a la superficie del vehículo de transporte. Lo mismo se aplica a un CPP.

20 Cualquier terapéutico de miARN de la invención, que contenga la molécula de miARN o la molécula de ácido nucleico codificante de la misma, o un inhibidor antisentido, puede combinarse con otro u otros agentes, p.ej., teriparátido, denosumab, blosozumab, romosozumab, bisfosfonatos tales como alendronato, zolendronato, o uno o más factores de crecimiento óseo o las moléculas de ácido nucleico codificantes respectivas, p.ej. un BMP como BMP-2 y/o BMP-7, o ARN, como, p.ej., ARN antagonistas de miR-31.

## Ejemplos

Ejemplo 1: microARN circulantes en respuesta a fracturas de cuello femoral recientes

Diseño del estudio

30 Para el análisis de los miARN en fracturas recientes, se centró la atención en pacientes más jóvenes que los seleccionados por Seeliger *et al.*, 2014, *supra*, ya que el diagnóstico se produce preferentemente temprano durante el desarrollo de la enfermedad, es decir, a una edad más temprana.

35 El comité ético austríaco concedió la aprobación ética para la recolección de muestras de suero de 14 sujetos mediante centrifugación a temperatura ambiente a 2.000xg durante 15 minutos después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los sujetos se clasificaron en dos grupos (n=7) basándose en la incidencia anterior de fracturas femorales osteoporóticas (figura 1a). De las características analizadas, tales como edad, índice de masa corporal (IMC), intervalo de muestreo después de la cirugía, puntuación T de DMO, vitamina D y PTD, sólo el IMC mostró diferencias significativas.

Aislamiento de ARN

40 Se congelaron las muestras de suero a -80°C para el almacenamiento a largo plazo. Tras el aislamiento del ARN, se descongeló el suero a 37°C, se centrifugó a 12.000xg durante 5 minutos para eliminar los residuos celulares y se homogeneizaron 200 µl de suero en 750 µl de Qiazol que contenía 35 fmoles de cel-miR-39-3p sintético de control añadido. Se llevó a cabo el aislamiento de ARN utilizando cloroformo y el kit de aislamiento miRNeasy (Qiagen, Alemania) para la precipitación y purificación de ARN con las desviaciones siguientes respecto al protocolo estándar: se homogeneizaron 200 µl de plasma en 750 µl de Qiazol. Se obtuvieron exactamente 500 µl de fase acuosa; se añadió 1 µl de glucógeno (Ambion, TX) hasta una concentración final de 50 µg/ml y se precipitaron con 750 µl de etanol al 100%. Las columnas se lavaron tres veces con tampón RPE y se eluyó el ARN plasmático una vez en 30 µl de agua sin nucleasas y se almacenó a -80°C. La cuantificación de cel-miR-39-3p se llevó a cabo por cuadruplicado en un Rotorgene de Qiagen utilizando el kit de ensayo de microARN Taqman y mezcla maestra respectivos (Applied Biosystems).

50 Análisis de qPCR

55 El cribado de expresión de miARN fue realizado por Exiqon Inc. en Dinamarca utilizando paneles prediseñados para suero/plasma de 384 pocillos que cubren 175 miARN humanos diferentes que se ha observado repetidamente que circulan en suero o plasma. En primer lugar, se transcribieron inversamente 4 µl de ARN aislado en reacciones de 20 µl utilizando el kit de reacción RT miRCURY LNA Universal. UniSp3 y UniSp6 son controles sintéticos que se añadieron en esta etapa y se analizaron posteriormente para detectar la presencia de inhibidores enzimáticos. Las reacciones

de RT se diluyeron 50 veces antes del análisis de qPCR y se sometió a ensayo cada miARN una vez por muestra en una reacción de 10 µl utilizando el sistema de PCR en tiempo real Roche LC 480 (Roche, Alemania).

#### Análisis de los datos

5 Se llevó a cabo un análisis de curvas de fusión y las reacciones de PCR de miARN con más de un pico fueron excluidas del análisis. Se calcularon las eficiencias de amplificación utilizando algoritmos similares a los del paquete de software linreg. Las eficiencias eran de entre 1,8 y 2,1 para la mayoría de miARN. Las reacciones individuales que proporcionaron eficiencias <1,6 fueron excluidas de la base de datos. Se generaron niveles de fondo para cada miARN mediante el ensayo de un control de síntesis de ADNc "sin molde" en una placa de panel prediseñado para suero/plasma completa. La mayoría de ensayos de miARN no rindió ninguna señal y se fijó la Cp de fondo en 42. Los presentes inventores requerían que todos los ensayos de miARN mostrasen señales >5 Cp inferiores al valor de fondo para ser incluidos en el análisis. La normalización de los valores de Cp se llevó a cabo basándose en el Cp medio de los ensayos de miARN detectados en la totalidad de las 14 muestras (124 ensayos). Se utilizó el software Normfinder para confirmar que la estabilidad del Cp medio era más elevada que la estabilidad de cualquier ensayo de miARN individual en la base de datos. Se utilizó la ecuación siguiente para la normalización: Cp normalizado (dCp) = Cp medio (124 ensayos) - Cp de ensayo (muestra). Esto resulta en un valor de delta Cp (dCp), que es una medida relativa transformada mediante  $\log_2$  para la expresión en la que los valores más altos indican una concentración más alta y los valores de dCp más bajos indican una concentración más baja en el plasma.

Se calcularon estadísticos t no paramétricos utilizando la prueba U de Mann-Whitney y se calcularon los factores de cambio entre los valores de expresión medios de cada grupo. En total, quince miARN mostraron una diferencia elevada (factor de cambio >1,5) entre muestras de fractura reciente y de control.

Ejemplo 2: microARN circulantes en pacientes con fracturas osteoporóticas no recientes prevalentes o incidentes con y sin diabetes tipo 2

#### Diseño del estudio para fracturas osteoporóticas prevalentes

25 Durante la realización del estudio se recogieron muestras de suero de 74 mujeres postmenopáusicas (17 controles sin historia de fracturas (Co), 19 controles con historia de fracturas de fragilidad (Fx), 19 mujeres con diabetes tipo 2 sin fracturas (DM) y 19 mujeres con diabetes tipo 2 con historia de fracturas de fragilidad (DMFx). Para la inclusión en el estudio, todas las mujeres debían ser postmenopáusicas, de edades entre 50 y 75 con un índice de masa corporal comprendido entre 18 y 37 kg/m<sup>2</sup>. Se requirió que todos los sujetos fuesen móviles y capaces de desplazarse sin andador. Para los sujetos incluidos en el grupo diabético, se requirió un mínimo de 3 años de historia de tratamiento para diabetes tipo 2 mediante medicación oral y/o insulina. Se incluyeron mujeres caucásicas, asiáticas y afroamericanas. Los sujetos con fracturas sólo se incluyeron si las fracturas habían sido causadas por un traumatismo de baja energía, tal como caídas desde una altura de pie o inferior y si persistieron después de la menopausia. Los pacientes con fracturas patológicas de otro origen, tales como tumores locales, lesiones de tipo tumoral o desmineralizaciones focales según visualización en radiografías, fueron excluidos del estudio.

35 Los criterios de exclusión comprendía todas las condiciones médicas que podían afectar al metabolismo óseo, tales como enfermedad neuropática severa, osteoporosis idiopática juvenil o premenopáusica, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, una historia reciente de periodos más prolongados (>3 meses) de inmovilización, uso crónico de fármacos, enfermedad gastrointestinal crónica, insuficiencia renal crónica significativa (CKD estadios IV y V), insuficiencia hepática crónica significativa, enfermedad cardiovascular inestable o hipertensión no controlada. Además, cualquier tratamiento crónico durante los últimos seis meses con esteroides adrenales o anabólicos, estrógenos, antácidos, anticonvulsivos, anticoagulantes, dosis farmacológicas de vitamina A, fluoruros, bisfosfonatos, calcitonina, tamoxifeno u hormona paratiroidea (HPT) se consideró un criterio para la exclusión. Debido al impacto demostrado sobre la masa ósea y la estructura ósea, los sujetos bajo medicación con agentes antidiabéticos tales como rosiglitazona o pioglitazona también fueron excluidos del estudio.

45 El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de investigación humana (CIH) del UCSF y todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado por escrito antes de participar. Se recogieron especímenes de sangre entre las 8 y 11 de la mañana tras 12 horas de ayuno durante la noche de acuerdo con las instrucciones de manipulación del laboratorio. Para las muestras de suero, se dejó que la sangre coagulase en posición vertical hacia arriba durante 40 minutos y después se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 min dentro de la primera hora desde la recolección. Ninguna de las muestras mostró signos de hemólisis en la inspección visual. Seguidamente el suero se transfirió a viales de plástico de tapón enroscable de 1,5 ml y se almacenaron a -80°C hasta el análisis posterior.

#### Diseño del estudio para fracturas osteoporóticas incidentes

55 Se generó un diseño de estudio prospectivo de control de casos anidados con 443 mujeres postmenopáusicas de edad superior a 66 años de la cohorte AGES-Reykjavik. El objetivo de este estudio era la identificación de microARN circulantes para la predicción de primeras fracturas osteoporóticas (fracturas incidentes) o fracturas osteoporóticas adicionales. Con este fin, se analizaron muestras de sangre en la línea base para niveles séricos de microARN y se correlacionaron con el resultado para el paciente después del primer seguimiento a los 5,4 años. En total, el diseño del estudio incluía 4 grupos: un grupo de control que comprendía 100 individuos sanos sin fracturas prevalentes y que

no sufrieron fracturas durante el seguimiento de 5,4 años; un grupo de fractura que comprendía 172 pacientes de los que 100 habían sufrido una primera fractura incidente durante el seguimiento y 72 pacientes que ya habían sufrido una o más fracturas prevalentes antes de sufrir una fractura adicional durante el periodo de seguimiento; un grupo diabético de control que comprendía 100 individuos diagnosticados de diabetes tipo 2 pero que no habían sufrido fracturas prevalentes o incidentes durante el seguimiento, y un grupo diabético de fractura que consistía en 71 pacientes de los que 35 habían sufrido una primera fractura incidente dentro del periodo de seguimiento de 5,4 años que habían sufrido una fractura prevalente en la línea base y una o más fracturas incidentes adicionales durante el periodo de seguimiento.

En los grupos de fractura, los pacientes con traumatismo de alta energía y fracturas de estrés fueron excluidos. Las fracturas prevalentes que habían ocurrido 18 meses antes de la visita de estudio o menos fueron excluidas. Sólo se incluyeron los sujetos que mostraban una función renal superior a 30 ml/min (eGFR), un IMC >20 kg/m<sup>2</sup>, ninguna historia de inmovilización antigua o reciente, sin ingesta actual de medicación de afectación ósea y sin evidencia basada en registro autoinformado o médico de enfermedad renal, enfermedad hepática, enfermedad gastrointestinal crónica, hiperparatiroidismo, ovariectomía, alcoholismo crónico u osteoporosis idiopática.

#### 15 Aislamiento de ARN

Para el aislamiento del ARN, se descongelaron 200 µl de suero a 37°C, se centrifugaron a 12.000xg durante 5 minutos y se homogeneizaron en 1.000 µl de Qiazol que contenía controles añadidos de ARN sintético (Exiqon, Dinamarca) a tres concentraciones diferentes para monitorizar la eficiencia de la purificación de ARN pequeño. El aislamiento del ARN se llevó a cabo utilizando la extracción con cloroformo y el kit de aislamiento miRNeasy (Qiagen, Alemania) para la precipitación y purificación del ARN con las desviaciones siguientes respecto al protocolo estándar: se obtuvieron exactamente 650 µl de fase acuosa después de la extracción y se añadió 1 µl de glucógeno (Ambion, TX, EE.UU.) a una concentración final de 50 µg/ml y se precipitó con 975 µl de etanol al 100%. Las columnas se lavaron tres veces con tampón RPE y se eluyó el ARN una vez en 30 µl de agua sin nucleasas y se almacenaron a -80°C.

#### Análisis de qPCR

La cuantificación de alto rendimiento basada en qPCR de los miARN se llevó a cabo en una placa de 384 pocillos utilizando reactivos de Exiqon. En primer lugar, se transcribieron inversamente 10 µl de ARN aislado en reacciones de 50 µl utilizando el kit II de síntesis de ADNc Universal. Se añadió UniSp6 y cel-miR-39-3p durante esta etapa para monitorizar la presencia de inhibidores enzimáticos. Las muestras de ADNc se diluyeron 100 veces antes del análisis de qPCR en placas de 384 pocillos Pick&Mix prerrecubiertas de diseño personalizado. Utilizando un robot de manipulación de líquidos epMotion P5073 (Eppendorf, Alemania), se repartieron 10 µl de mezcla de qPCR en cada pocillo de la placa de qPCR. Se sometió a ensayo cada miARN una vez por muestra en una reacción de 10 µl utilizando el sistema de PCR en tiempo real Roche LC 480 (Roche, Alemania).

#### Análisis de los datos

Se llevó a cabo un análisis de curvas de fusión y las reacciones de PCR de miARN con más de un pico fueron excluidas del análisis. Se calcularon las eficiencias de amplificación utilizando algoritmos similares a los del paquete de software linreg. Las eficiencias eran de entre 1,8 y 2,1 para la mayoría de miARN. Las reacciones individuales que proporcionaron eficiencias <1,6 fueron excluidas de la base de datos. Se generaron niveles de fondo para cada miARN mediante el ensayo de un control de síntesis de ADNc "sin molde" en una placa de panel prediseñado para suero/plasma completa. La mayoría de ensayos de miARN no rindió ninguna señal y se fijó la Cp de fondo en 42. Los datos de expresión se prefiltraron siguiendo los criterios siguientes: i) se excluyeron los elementos con más de 50% de valores vacíos, ii) se seleccionaron los elementos con un valor de p <0,05 en un análisis de ANOVA de un factor de entre cualquiera de los 4 grupos, iii) se seleccionaron los elementos con un valor de p en la prueba de chi-cuadrado <0,1 que indicaba una distribución desigual de señales negativas entre muestras de fractura y de no fractura o entre muestras de diabetes y de no diabetes. El objetivo de esta etapa era incluir en el procesamiento posterior sólo los elementos con una tendencia a la regulación de cualquiera de los 4 grupos. Los valores de Ct de los 146 elementos restantes se corrigieron para la media global de los niveles de control añadido y, finalmente, los valores vacíos se sustituyeron por valores imputados, basándose en la premisa de valores con distribución normal.

Los modelos lineales Gene-Wise se ajustaron incorporando la información de clase, p.ej. fractura vs. no fractura, o fractura diabética vs. control diabético, mediante cuadrados mínimos generalizados. Los valores de p de la prueba de si el coeficiente de clase era diferente de 0 se ajustaron para múltiples comparaciones utilizando el método propuesto por Benjamini y Hochberg. Se utilizó el paquete Limma del repositorio Bioconductor. Se evaluaron todos los modelos individuales a partir de las medias de los valores de AUC y las tasas de clasificación errónea de una validación cruzada de 5 veces utilizando la máquina de soporte vectorial como clasificador base. Se seleccionó el tamaño de modelo más pequeño que obtuvo un valor de AUC próximo al valor de AUC máximo. Se repitió todo el procedimiento con datos simulados que incorporaban la misma dimensionalidad y estructura de correlaciones que los datos originales pero que no mostraban diferencias en las medias entre clases. El valor de AUC resultante máximo se utilizó como un punto de referencia caracterizado por una reproducibilidad cero. Todos los modelos seleccionados utilizando el método en dos etapas descrito anteriormente rindieron claramente resultados superiores en comparación con el punto de referencia.



## Resultados

5 Para la clasificación de los pacientes de fractura no diabéticos, se identificó una combinación de 4 microARN (figura 1a y b) que rindió un valor de AUC de 0,978. Esta combinación consistía en miR-188-3p, miR-942, miR-155-5p y miR-382-3p. La incorporación adicional de miARN (hasta 10 miARN en total) en el modelo de clasificación pudo mejorar el AUC hasta un valor de 1,0 (figura 2a), de los que miR-136-3p y miR-502-5p presentaron el efecto más fuerte sobre la clasificación.

10 Para la clasificación de los pacientes de fractura no diabéticos, se identificó una combinación de 4 microARN (figura 1c y d) que rindió un valor de AUC de 0,933. Esta combinación consistía en miR-550a-5p, miR-96-5p, miR-32-3p y miR-486-3p. La incorporación adicional de miARN (hasta 10 miARN en total) en el modelo de clasificación pudo mejorar el AUC hasta un valor de 1,0 (figura 2b), de los que miR-203a y miR-141-3p y let-323a-3p presentaron el efecto más fuerte sobre la clasificación.

## Ejemplo 3: análisis de la función del microARN en el contexto de la diferenciación osteogénica

15 Se obtuvieron células madre derivadas de tejido adiposo humano (CMTA) a partir de tejido adiposo subcutáneo que se obtuvo mediante liposucción de tumescencia de pacientes ambulatorios bajo anestesia local con el consentimiento del paciente. Se aislaron las CMTA tal como se ha descrito anteriormente (Wolbank et al., 2007a; Wolbank et al., 2007b; Wolbank et al., 2009a) y se cultivaron en DMEM-bajo en glucosa/F-12 de HAM complementado con L-glutamina 4 mM, suero de feto bovino al 10% (FCS, PAA) y 1 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico humano recombinante (rhFGF, R&D Systems) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad del aire. Las células se subcultivaron una o dos veces cada semana a una relación de división de 1:2 de acuerdo con la tasa de crecimiento.

## 20 Inducción de la diferenciación osteogénica en CMTA

25 Todos los protocolos de diferenciación se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Para la diferenciación osteogénica, se sembraron CMTA a una densidad de  $2 \times 10^3$  células en cada pocillo. 72 horas después de la siembra, las células se incubaron con medio de diferenciación osteogénica (DMEM-bajo en glucosa, FCS al 10%, L-glutamina 4 mM, dexametasona 10 nM, ascorbato-2-fosfato 150 µM, β-glicerolfosfato 10 mM y vitamina-D3 10 nM) durante hasta 4 semanas.

## Tinción con rojo de alizarina S

30 Para la tinción con alizarina de las estructuras calcificadas, las células se fijaron durante 1 hora en etanol al 70% a -20°C. Tras un enjuague breve, las células se tiñeron durante 20 minutos con solución de rojo de alizarina 40 mM (Sigma) y se lavaron con PBS. Para la cuantificación, se extrajo la alizarina durante 30 minutos utilizando 200 µl de solución de HCl 0,1 M/SDS al 0,5%. El pigmento extraído se midió a 425 nm.

## Transfecciones

35 Las CMTA se transfectaron utilizando el reactivo de transfección siPORT™ NeoFX™ (Applied Biosystems). Las células se transfectaron con microARN precursor 10 nM o control de miARN aleatorizado n° 2 (Ambion) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tres días después de la transfección, se inició la diferenciación tal como se ha descrito anteriormente.

## Resultados

40 La transfección de hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-203a, hsa-miR-376a-3p, y miR-550a-5p resultó en una inhibición significativa de la diferenciación osteogénica de 50% o superior. La transfección de hsa-miR-188-3p, hsa-miR-199b-5p y miR-148a-5p resultó en una aceleración significativa de la diferenciación osteogénica superior a 200% y de hasta 400%.

## Tablas

Tabla 1

n°	Cohorte de pacientes	ID del miARN	Log2 factor de cambio (enfermos vs controles)	Valor de p
1	OFX reciente Grupo I	hsa-miR-10a-5p	0,95	0,0012
2		hsa-miR-10b-5p	1,01	0,0012
3		hsa-miR-106a-5p	-0,33	0,078
4		hsa-miR-125b-5p	0,54	0,2734
5		hsa-miR-127-3p	0,83	0,1634

ES 2 704 748 T3

6		hsa-miR-133a	-0,55	0,3295
7		hsa-miR-133b	-1,47	0,0280
8		hsa-miR-143-3p	-0,51	0,1010
9		hsa-miR-18a-3p	-0,50	0,2741
10		hsa-miR-194-5p	0,49	0,2266
11		hsa-miR-30a-5p	0,72	0,1092
12		hsa-miR-328-3p	-0,62	0,0344
13		hsa-miR-376a-3p	0,77	0,1160
14		hsa-miR-409-3p	0,86	0,2042
15		hsa-miR-574-3p	-0,51	0,2016
1	OFX no reciente Grupo II	hsa-let-7i-3p	-0,56	0,206
2		hsa-miR-1227-3p	0,53	0,643
3		hsa-miR-127-3p	-1,04	0,145
4		hsa-miR-133b	-0,81	0,086
5		hsa-miR-135a-5p	-0,90	0,030
6		hsa-miR-136-3p	-0,87	0,055
7		hsa-miR-143-3p	-0,64	0,210
8		hsa-miR-155-5p	-1,11	0,013
9		hsa-miR-181a-3p	-2,93	0,000
10		hsa-miR-188-3p	-1,72	0,003
11		hsa-miR-1908	-0,90	0,484
12		hsa-miR-190a	-1,37	0,052
13		hsa-miR-192-5p	-0,64	0,090
14		hsa-miR-193b-3p	-0,74	0,137
15		hsa-miR-196b-5p	-0,64	0,201
16		hsa-miR-199b-5p	-0,62	0,553
17		hsa-miR-200b-3p	-0,61	0,236
18		hsa-miR-203a	0,87	0,725
19		hsa-miR-205-5p	-0,53	0,162
20		hsa-miR-20b-5p	-0,67	0,225
21		hsa-miR-214-3p	-0,57	0,209
22		hsa-miR-215	-0,61	0,124
23		hsa-miR-223-5p	-0,58	0,144
24		hsa-miR-27a-3p	-0,52	0,145
25		hsa-miR-30e-3p	-0,63	0,100
26		hsa-miR-323a-3p	-0,67	0,165
27		hsa-miR-330-3p	1,02	0,088
28		hsa-miR-342-5p	-1,16	0,035
29		hsa-miR-369-3p	-1,04	0,055
30		hsa-miR-376c-3p	-0,74	0,152

ES 2 704 748 T3

31		hsa-miR-377-3p	-1,02	0,062
32		hsa-miR-378a-5p	-1,19	0,016
33		hsa-miR-410	-0,59	0,151
34		hsa-miR-454-3p	-0,59	0,179
35		hsa-miR-487b	-0,91	0,132
36		hsa-miR-495-3p	-1,02	0,089
37		hsa-miR-500a-5p	-0,96	0,122
38		hsa-miR-502-5p	-1,36	0,040
39		hsa-miR-542-5p	-1,43	0,126
40		hsa-miR-548a-3p	-0,66	0,252
41		hsa-miR-550a-5p	2,17	0,052
42		hsa-miR-576-3p	-1,58	0,002
43		hsa-miR-582-3p	-1,55	0,020
44		hsa-miR-624-5p	-0,69	0,197
45		hsa-miR-642a-5p	-1,56	0,018
46		hsa-miR-941	-0,66	0,442
47		hsa-miR-942	-1,88	0,002
48		hsa-miR-382-3p	-2,11	0,471
1	DMFX no reciente Grupo III	hsa-let-7b-5p	0,97	0,005
2		hsa-let-7g-5p	0,99	0,002
3		hsa-let-7i-5p	0,91	0,002
4		hsa-miR-106a-5p	0,96	0,009
5		hsa-miR-106b-5p	1,01	0,006
6		hsa-miR-127-3p	-1,29	0,487
7		hsa-miR-132-3p	0,84	0,015
8		hsa-miR-140-3p	0,78	0,014
9		hsa-miR-141-3p	1,27	0,002
10		hsa-mi R-143-3p	0,87	0,080
11		hsa-mi R-143-5p	1,42	0,007
12		hsa-miR-144-3p	0,94	0,009
13		hsa-miR-146b-5p	0,90	0,012
14		hsa-miR-154-5p	-1,64	0,127
15		hsa-miR-16-2-3p	1,03	0,001
16		hsa-miR-16-5p	0,89	0,008
17		hsa-miR-17-5p	0,98	0,032
18		hsa-miR-181b-5p	0,83	0,035
19		hsa-miR-181c-3p	1,51	0,002
20		hsa-miR-181c-5p	1,25	0,004
21		hsa-miR-185-5p	0,81	0,024
22		hsa-miR-18a-3p	0,77	0,051

ES 2 704 748 T3

23	hsa-miR-18a-5p	0,88	0,020
24	hsa-miR-18b-5p	0,92	0,019
25	hsa-miR-1908	-1,43	0,186
26	hsa-miR-191-5p	0,99	0,006
27	hsa-miR-196b-5p	1,03	0,037
28	hsa-miR-199b-5p	1,35	0,082
29	hsa-miR-19b-1-5p	2,38	0,007
30	hsa-miR-19b-3p	0,76	0,018
31	hsa-miR-200b-3p	0,94	0,050
32	hsa-miR-203a	1,98	0,007
33	hsa-miR-20a-5p	0,92	0,013
34	hsa-miR-20b-5p	1,12	0,068
35	hsa-miR-210	0,78	0,023
36	hsa-miR-21-3p	1,09	0,003
37	hsa-miR-25-3p	0,82	0,016
38	hsa-miR-26b-5p	0,79	0,023
39	hsa-miR-301a-3p	1,15	0,005
40	hsa-miR-301b	1,17	0,010
41	hsa-miR-323a-3p	1,21	0,002
42	hsa-miR-324-5p	1,15	0,017
43	hsa-miR-330-3p	1,23	0,022
44	hsa-miR-363-3p	0,83	0,008
45	hsa-miR-369-3p	-1,29	0,011
46	hsa-miR-374a-5p	0,84	0,017
47	hsa-miR-375	1,30	0,004
48	hsa-miR-376c-3p	-0,98	0,052
49	hsa-miR-378a-5p	1,09	0,023
50	hsa-miR-451a	0,91	0,012
51	hsa-miR-454-3p	0,99	0,023
52	hsa-miR-486-3p	1,16	0,018
53	hsa-miR-486-5p	1,04	0,003
54	hsa-miR-493-5p	-0,85	0,607
55	hsa-miR-500a-5p	1,93	0,001
56	hsa-miR-532-3p	0,87	0,006
57	hsa-miR-545-3p	1,33	0,017
58	hsa-miR-550a-3p	0,98	0,032
59	hsa-miR-550a-5p	4,84	0,000
60	hsa-miR-589-5p	0,83	0,719
61	hsa-miR-590-3p	0,92	0,055
62	hsa-miR-598	0,87	0,068

63		hsa-miR-627	0,97	0,034
64		hsa-miR-629-5p	0,96	0,009
65		hsa-miR-7-5p	1,40	0,001
66		hsa-miR-92a-3p	0,81	0,002
67		hsa-miR-93-3p	0,86	0,042
68		hsa-miR-93-5p	0,93	0,018
69		hsa-miR-941	1,70	0,024
70		hsa-miR-942	2,36	0,000
71		hsa-miR-96-5p	1,35	0,000
72		hsa-miR-98-5p	0,85	0,031
73		hsa-miR-181a-5p	0,74	0,041
74		hsa-miR-32-3p	1,11	0,021

Tabla 2. Fracturas osteoporóticas recientes vs. Controles

ID maduro	Secuencia madura	SEQ ID	Nº de acceso maduro	precursor de miARN	secuencia de precursor de miARN	SEQ ID	Nº de acceso de precursor de miARN
hsa-miR-10a-5p	UACCCUG UAGAUCC GAAUUUG UG	1	MIMAT0000253	hsa-mir-10a	GAUCUGUCUGUCUU CUGUAUUAUACCCUG UAGAUCCGAAUUUG UGUAAGGAAUUUUUG UGGUCACAAAUUCG UAUCUAGGGGAAUA UGUAGUUGACAUA ACACUCCGCUCU	16	MI0000266
hsa-miR-10b-5p	UACCCUG UAGAACC GAAUUUG UG	2	MIMAT0000254	hsa-mir-10b	CCAGAGGUUGUAAC GUUGUCUAUAUA CCCUGUAGAACCGAA UUUGUGUGGUAUCC GUUAAGUCACAGAU UCGAUUCUAGGGGA AUUAUUGGUCGAUG CAAAACUUA	17	MI0000267
hsa-miR-106a-5p	AAAAGUG CUUACAG UGCAGGU AG	3	MIMAT0000103	hsa-mir-106a	CCUUGGCCAUGUAA AAGUGCUIACAGUG CAGGUAGCUUUUUG AGAUCUACUGCAAU GUAAGCACUUCUUA CAUUACCAUGG	18	MI0000113
hsa-miR-125b-5p	UCCUGA GACCCUA ACUUGUG A	4	MIMAT0000423	hsa-mir-125b-1	UGCUCUCCUCUCAG UCCUGAGACCCUAA CUUGUGAUGUUUAC CGUUUAAAUCCACG GGUUAGGCUCUUGG GAGCUGCGAGUCGU GCU	19	MI0000446
hsa-miR-127-3p	UCGGAUC CGUCUGA GCUUGGC U	5	MIMAT0000446	hsa-mir-127	UGUGAUCACUGUCU CCAGCCUGCUGAAGC UCAGAGGGCUCUGA UUCAGAAAGAUAU CGGAUCCGUCUGAG CUUGGCUGGUCGGA AGUCUCAUAUC	20	MI0000472

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-133a-3p	UUUGGUC CCCUUCA CCAGCUG	6	MIMAT0000427	hsa-mir-133a-1	ACAAUGCUUUGCUA GAGCUGGUAAAAUG GAACCAAUCGCCUC UUCA AUGGAUUUGG UCCCCUUAACCAGC UGUAGCUAUGCAUU GA	21	MI0000450
hsa-miR-133b	UUUGGUC CCCUUCA CCAGCUA	7	MIMAT0000770	hsa-mir-133b	CCUCAGAAGAAAGAU GCCCCUGCUCUGGC UGGUCAAACGGAACC AAGUCCGUCUUCU GAGAGGUUUGGUCC CCUUAACCAGCUAC AGCAGGGCUGGCAA UGCCAGUCCUUGG AGA	22	MI0000822
hsa-miR-143-3p	UGAGAUG AAGCACU GUAGCUC	8	MIMAT0000435	hsa-mir-143	GCGCAGCGCCUGUC UCCAGCCUGAGGU GCAGUGCUGCAUCU CUGGUCAGUUGGGA GUCUGAGAUGAAGC ACUGUAGCUCAGGA AGAGAGAAGUUGUU CUGCAGC	23	MI0000459
hsa-miR-18a-3p	ACUGCCC UAGUGC UCCUUCU GG	9	MIMAT0002891	hsa-mir-18a	UGUUCUAAGGUGCA UCUAGUGCAGAUAG UGAAGUAGAUUAGC AUCUACUGCCUAAG UGCUCUUCUGGCA	24	MI0000072
hsa-miR-194-5p	UGUAAAC GCAACUCC AUGUGGA	10	MIMAT0000460	hsa-mir-194-1	AUGGUGUUAUCAAG UGUAAACAGCAACUCC AUGUGGACUGUGUA CCAAUUUCCAGUGG AGAUGCUGUUACUU UUGAUGGUUACCAA	25	MI0000488
hsa-miR-30a-5p	UGUAAAC AUCCUG ACUGGAA G	11	MIMAT0000087	hsa-mir-30a	GCGACUGUAAACAU CCUCGACUGGAAGC UGUGAAGCCACAGA UGGGCUUUCAGUCG GAUGUUUGCAGCUG C	26	MI0000088
hsa-miR-328-3p	CUGGCCC UCUCUGC CCUCCG U	12	MIMAT0000752	hsa-mir-328	UGGAGUGGGGGGC AGGAGGGGCUCAGG GAGAAAUGCAUAC AGCCCCUGGCCUCU CUGCCCUUCGUCCC CUG	27	MI0000804
hsa-miR-376a-3p	AUCAUAG AGGAAAA UCCACGU	13	MIMAT0000729	hsa-mir-376a-1	UAAAAGGUAGAUUC UCCUUCUAUGAGUA CAUUUUUAUGAUU AAUCAUAGAGGAAA AUCCACGUUUUC	28	MI0000784
hsa-miR-409-3p	GAAUGUU GCUCGGU GAACCCU	14	MIMAT0001639	hsa-mir-409	UGGUACUCGGGGAG AGGUUACCCGAGCAA CUUUGCAUCUGGAC GACGAAUGUUGCUC GGUGAACCCUUUU CGGUAUCA	29	MI0001735

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-574-3p	CACGCUCA UGCACAC ACCCACA	15	MIMAT0003239	hsa-mir-574	GGGACCUGCGUGGG UGCGGGCGUGUGAG UGUGUGUGUGUGA GUGUGUGUCGUCC GGGUCCACGCUCAU GCACACCCACACG CCCACACUCAGG	30	MI0003581
----------------	--------------------------------	----	--------------	-------------	---	----	-----------

Tabla 3. Fracturas osteoporóticas no recientes vs. Controles

ID maduro	SEQ ID	Seq maduro	n° de acc. maduro	horquilla	SEQ ID	Seq horquilla	n° de acc. horquilla
hsa-let-7i-3p	31	CUGCGCAA GCUACUGC CUUGCU	MIMAT000 4585	hsa-let-7i	78	CUGGCUGAGGUAGU AGUUUGUGCUGUUG GUCGGGUUGUGACA UUGCCCGCUGUGGA GAUAACUGCGCAAGC UACUGCCUUGCUA	MI0000434
hsa-miR-1227-3p	32	CGUGCCAC CCUUUUC CCAG	MIMAT000 5580	hsa-mir-1227	79	GUGGGGCCAGGCCG UGGUGGGCACUGCU GGGGUGGGCACAGC AGCAUGCAGAGCG GGCAUUUGACCCCG UGCCACCCUUUUC CAG	MI0006316
hsa-miR-127-3p	33	UCGGAUCC GUCUGAGC UUGGCU	MIMAT000 0446	hsa-mir-127	80	UGUGAUCACUGUCU CCAGCCUGCUGAAGC UCAGAGGGCUCUGA UUCAGAAAGAUCAU CGGAUCCGUCUGAG CUUGGCUGGUCGGA AGUCUCAUCAUC	MI0000472
hsa-miR-133b	34	UUUGGUC CCCUCAA CCAGCUA	MIMAT000 0770	hsa-mir-133b	81	CCUCAGAAGAAAGAU GCCCCUGCUCUGGC UGGUCAAACGGAACC AAGUCCGUCUCCU GAGAGGUUUGGUCC CCUUAACCAGCUAC AGCAGGGCUGGCAA UGCCAGUCCUUGG AGA	MI0000822
hsa-miR-135a-5p	35	UAUGGCU UUUUAAU CCUAUGUG A	MIMAT000 0428	hsa-mir-135a-1	82	AGGCCUCGCUUUC UCUAUGGCUUUUUA UUCCUAUGUGAUUC UACUGCUCACUCAUA UAGGGAUUGGAGCC GUGGCGCACGGCGG GGACA	MI0000452
hsa-miR-136-3p	36	CAUCAUCG UCUCAAAU GAGUCU	MIMAT000 4606	hsa-mir-136	83	UGAGCCUCGGAGG ACUCCAUUUUUUUU GAUGAUGGAUUCU AUGCUCUUAUCG UCUCAAUUGAGUCU UCAGAGGGUUCU	MI0000475

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-143-3p	37	UGAGAUG AAGCACUG UAGCUC	MIMAT000 0435	hsa-mir-143	84	GCGCAGCGCCUGUC UCCCAGCCUGAGGU GCAGUGCUGCAUCU CUGGUCAGUUGGGA GUCUGAGAUGAAGC ACUGUAGCUCAGGA AGAGAGAAGUUGUU CUGCAGC	MI0000459
hsa-miR-155-5p	38	UUAUUGC UAAUCGU GAUAGGG GU	MIMAT000 0646	hsa-mir-155	85	CUGUUAAUGCUAAU CGUGAUAGGGGUUU UUGCCUCCAACUGAC UCCUACAUAUAGC AUUAACAG	M0000681
hsa-miR-181a-3p	39	ACCAUCGA CCGUUGAU UGUACC	MIMAT000 0270	hsa-mir-181a-1	86	UGAGUUUUGAGGUU GCUUCAGUGAACAU UCAACGUCUGCGGU GAGUUUGGAAUUAA AAUCAAACCAUCGA CCGUUGAUUGUACC CUAUGGCUAACCAUC AUCUACUCCA	MI0000289
hsa-miR-188-3p	40	CUCCCACA UGCAGGG UUUGCA	MIMAT000 4613	hsa-mir-188	87	UGCUCUCCUCUCAC AUCCCUUGCAUGGU GGAGGGUGAGCUUU CUGAAAACCCUCCC ACAUGCAGGGUUUG CAGGAUGGCGAGCC	MI0000484
hsa-miR-1908-5p	41	CGGCGGGG ACGGCGAU UGGUC	MIMAT000 7881	hsa-mir-1908	88	CGGGAUUGCCGCGG CGGGGACGGCGAUU GGUCCGUAUGUGUG GUGCCACCGGCCGCC GGCUCCGCCCGGCC CCCGCCCC	MI0008329
hsa-miR-190a-5p	42	UGAUAUG UUUGAUA UAUUAGG U	MIMAT000 0458	hsa-mir-190a	89	UGCAGGCCUCUGUG UGAUAUGUUUGAUA UAUUAGGUUGUUAU UUAAUCCAACUAUA UAUCAACAUAUUC UACAGUGUCUUGCC	MI0000486
hsa-miR-192-5p	43	CUGACCUA UGAAUUG ACAGCC	MIMAT000 0222	hsa-mir-192	90	GCCGAGACCGAGUGC ACAGGGCUCUGACC UAUGAAUUGACAGC CAGUGCUCUGUCU CCCCUCUGGUGCCA AUUCCAUAGGUCAC AGGUAUGUUCGCCU CAAUGCCAGC	MI0000234
hsa-miR-193b-3p	44	AACUGGCC CUCAAAGU CCGCU	MIMAT000 2819	hsa-mir-193b	91	GUGGUCUCAGAAUC GGGGUUUUGAGGGC GAGAUGAGUUUAUG UUUUUAUCCAACUGG CCCUCAAAGUCCGCC UUUUGGGGUCAU	MI0003137
hsa-miR-196b-5p	45	UAGGUAG UUUCCUG UUGUUGG G	MIMAT000 1080	hsa-mir-196b	92	ACUGGUCGGUGAUU UAGGUAGUUUCCUG UUGUUGGGAUCCAC CUUUCUCUCGACAGC ACGACACUGCCUACA UUACUUCAGUUG	MI0001150



ES 2 704 748 T3

hsa-miR-199b-5p	46	CCCAGUGU UUAGACUA UCUGUUC	MIMAT000 0263	hsa-mir-199b	93	CCAGAGGACACCUCC ACUCCGUCUACCCAG UGUUUAGACUAUCU GUUCAGGACUCCCAA AUUGUACAGUAGUC UGCACAUUGGUUAG GCUGGGCUGGGUUA GACCCUCGG	MI0000282
hsa-miR-200b-3p	47	UAAUACUG CCUGGUAA UGAUGA	MIMAT000 0318	hsa-mir-200b	94	CCAGCUCGGGACGCC GUGGCCAUUCUACU GGGCAGCAUUGGAU GGAGUCAGGUCUCU AAUACUGCCUGGUA AUGAUGACGGCGGA GCCUCGCACG	MI0000342
hsa-miR-203a	48	GUGAAAU GUUUAGG ACCACUAG	MIMAT000 0264	hsa-mir-203a	95	GUGUUGGGGACUCG CGCGCUGGGUCCAG UGGUUCUUAACAGU UCAACAGUUCUGUA GCGCAAUUGUGAAA UGUUUAGGACCACU AGACCCGGCGGGCGC GGCGACAGCGA	MI0000283
hsa-miR-205-5p	49	UCCUUCAU UCCACCGG AGUCUG	MIMAT000 0266	hsa-mir-205	96	AAAGAUCUCAGACA AUCCAUGUCUUCU CUUGUCCUUCAUUC CACCGGAGUCUGUC UCAUACCCAACCAGA UUUCAGUGGAGUGA AGUUCAGGAGGCAU GGAGCUGACA	MI0000285
hsa-miR-20b-5p	50	CAAAGUGC UCAUAGU GCAGGUAG	MIMAT000 1413	hsa-mir-20b	97	AGUACCAAAGUGCU CAUAGUGCAGGUAG UUUUGGCAUGACUC UACUGUAGUAUGGG CACUCCAGUACU	MI0001519
hsa-miR-214-3p	51	ACAGCAGG CACAGACA GGCAGU	MIMAT000 0271	hsa-mir-214	98	GGCCUGGCUGGACA GAGUUGUCAUGUGU CUGCCUGUCUACACU UGCUGUGCAGAACA UCCGCUCACCGUAC AGCAGGCACAGACAG GCAGUCACAUGACAA CCCAGCCU	MI0000290
hsa-miR-215-5p	52	AUGACCUA UGAAUUG ACAGAC	MIMAT000 0272	hsa-mir-215	99	AUCAUUCAGAAAUG GUAUACAGGAAAAU GACCUAUGAAUUGA CAGACAAUAUAGCU GAGUUUGUCUGUCA UUUCUUUAGGCCAA UAUUCUGUAUGACU GUGCUACUCAA	MI0000291
hsa-miR-223-5p	53	CGUGUAU UUGACAAG CUGAGUU	MIMAT000 4570	hsa-mir-223	100	CCUGGCCUCCUGCAG UGCCACGCUCGGUG UAUUUGACAAGCUG AGUUGGACACUCCA UGUGGUAGAGUGUC AGUUUGUCAAAUAC CCCAAGUCGGCACA UGCUIACCAG	MI0000300

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-27a-3p	54	UUCACAGU GGCUAAGU UCCGC	MIMAT000 0084	hsa-mir-27a	101	CUGAGGAGCAGGGC UUAGCUGCUUGUGA GCAGGGUCCACACCA AGUCGUGUUCACAG UGGCUAAGUUCGGC CCCCAG	MI0000085
hsa-miR-30e-3p	55	CUUUCAGU CGGAUGU UUACAGC	MIMAT000 0693	hsa-mir-30e	102	GGGCAGUCUUUGCU ACUGUAAACAUCU UGACUGGAAGCUGU AAGGUGUUCAGAGG AGCUUUCAGUCGGA UGUUUACAGCGGCA GGCUGCCA	MI0000749
hsa-miR-323a-3p	56	CACAUUAC ACGGUCGA CCUCU	MIMAT000 0755	hsa-mir-323a	103	UUGGUACUUGGAGA GAGGUGGUCCGUGG CGCGUUCGCUUUUAU UUUUGGCGCACAUU ACACGGUCGACCUCU UUGCAGUAUCUAAU C	MI0000807
hsa-miR-330-3p	57	GCAAAGCA CACGGCCU GCAGAGA	MIMAT000 0751	hsa-mir-330	104	CUUUGGCGAUCACU GCCUCUCUGGGCCU GUGUCUUAGGCUCU GCAAGAUCAACCGAG CAAAGCACACGGCCU GCAGAGAGGCAGCG CUCUGCCC	MI0000803
hsa-miR-342-5p	58	AGGGGUG CUAUCUGU GAUUGA	MIMAT000 4694	hsa-mir-342	105	GAAACUGGGUCUCAA GGUGAGGGGUGCUA UCUGUGAUUGAGGG ACAUGGUUAAUGGA AUUGUCUCACACAG AAAUCGCACCCGUCA CCUUGGCCUACUUA	MI0000805
hsa-miR-369-3p	59	AAUAAUAC AUGGUUG AUCUUU	MIMAT000 0721	hsa-mir-369	106	UUGAAGGGAGAUUG ACCGUGUUUAUUC GCUUUUUAUGACUUC GAAUAAUACAUGGU UGAUCUUUUUCUCAG	M10000777
hsa-miR-376c-3p	60	AACAUAGA GGAAAUUC CACGU	MIMAT000 0720	hsa-mir-376c	107	AAAAGGUGGAUUAU CCUUCUAUGUUUAU GUUUAUUUAUGGUUA AACAUAGAGGAAAU UCCACGUUUU	M10000776
hsa-miR-377-3p	61	AUCACACA AAGGCAAC UUUUGU	MIMAT000 0730	hsa-mir-377	108	UUGAGCAGAGGUUG CCCUUGGUGAAUUC GCUUUUUAUUUGUU GAAUCACACAAAGGC AACUUUUUGUUUG	MI0000785
hsa-miR-378a-5p	62	CUCCUGAC UCCAGGUC CUGUGU	MIMAT000 0731	hsa-mir-378a	109	AGGGCUCUGACUCC AGGUCCUGUGUGUU ACCUAGAAUAGCAC UGGACUUGGAGUCA GAAGCCU	MI0000786
hsa-miR-382-3p	269	AAUCAUUC ACGGACAA CACUU	MIMAT002 2697	hsa-mir-382	270	UACUUGAAGAGAAG UUGUUCGUGGUGGA UUCGCUUUUACUUAU GACGAAUCAUUCAC GGACAACACUUUUU UCAGUA	MI0000790

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-410-3p	63	AAUUAUAC ACAGAUUG CCUGU	MIMAT000 2171	hsa-mir-410	110	GGUACCUGAGAAGA GGUUGUCUGUGAUG AGUUCGCUUUUUAU AAUGACGAAUUA CACAGAUUGCCUGU UUUCAGUACC	MI0002465
hsa-miR-454-3p	64	UAGUGCAA UAUUGCU UAUAGGG U	MIMAT000 3885	hsa-mir-454	111	UCUGUUUAUCACCA GAUCCUAGAACCCUA UCAAUUUGUCUCU GCUGUGUAAAUAGU UCUGAGUAGUGCAA UAUUGCUUAUAGGG UUUUGGUGUUUGG AAAGAACAAUGGGC AGG	MI0003820
hsa-miR-487b-3p	65	AAUCGUAC AGGGUCAU CCACUU	MIMAT000 3180	hsa-mir-487b	112	UUGGUACUUGGAGA GUGGUUAUCCUGU CCUGUUCGUUUUGC UCAUGUCGAAUCGU ACAGGGUCAUCCACU UUUUCAGUAUCAA	MI0003530
hsa-miR-495-3p	66	AAACAAAC AUGGUGCA CUUCUU	MIMAT000 2817	hsa-mir-495	113	UGGUACCUGAAAAG AAGUUGCCCAUGUU AUUUUCGCUUUUA UGUGACGAAACAAAC AUGGUGCACUUCUU UUUCGGUAUCA	MI0003135
hsa-miR-500a-5p	67	UAAUCCUU GCUACCUG GGUGAGA	MIMAT000 4773	hsa-mir-500a	114	GCUCUCCUUCUCUAA UCCUUGCUACCUGG GUGAGAGUGCUGUC UGAAUGCAAUGCAC CUGGGCAAGGAUUC UGAGAGCGAGAGC	MI0003184
hsa-miR-502-5p	68	AUCCUUGC UAUCUGG GUGCUA	MIMAT000 2873	hsa-mir-502	115	UGCUCUCCUUCUCUA AUCCUUGCUAUCUG GGUGCUAGUCUGG CUCAAUGCAAUGCAC CUGGGCAAGGAUUC AGAGAGGGGGAGCU	MI0003186
hsa-miR-542-5p	69	UCGGGGA UCAUCAUG UCACGAGA	MIMAT000 3340	hsa-mir-542	116	CAGAUCUCAGACAUC UCGGGGAUCAUCAU GUCACGAGAUACCAG UGUGCACUUGUGAC AGAUUGAAACUGA AAGGUCUGGGAGCC ACUCAUCUUA	MI0003686
hsa-miR-548a-3p	70	CAAACUG GCAAUUAC UUUUGC	MIMAT000 3251	hsa-mir-548a-1	117	UGCAGGGAGGUUU AAGUUGGUGCAAAA GUAUUUGUUAUUU UGCCAUUAAAAGUA ACGACAAAACUGGCA AUUACUUUUGCACC AAACCUGGUUU	MI0003593
hsa-miR-550a-5p	71	AGUGCCUG AGGGAGU AAGAGCCC	MIMAT000 4800	hsa-mir-550a-1	118	UGAUGCUUUGCUGG CUGGUGCAGUGCCU GAGGGAGUAAGAGC CCUGUUGUUGUAAG AUAGUGUCUACUC CCUCAGGCACAUCUC CAACAAGUCUCU	MI0003600

ES 2 704 748 T3

hsa-m iR-576-3p	72	AAGAUGU GGAAAAU UGGAAUC	MIMAT000 4796	hsa-mir-576	119	UACAAUCCAACGAGG AUUCUAAUUUCUCC ACGUCUUUGGUAAU AAGGUUUUGGCAAAG AUGUGGAAAAAUUG GAAUCCUCAUUCGA UUGGUUAUAACCA	MI0003583
hsa-miR-582-3p	73	UAACUGG UUGAACAA CUGAACC	MIMAT000 4797	hsa-mir-582	120	AUCUGUGCUCUUUG AUUACAGUUGUUA ACCAGUUACUAAUC UAACUAAUUGUAAAC UGGUUGAACACUG AACCCAAAGGGUGCA AAGUAGAAACAUU	MI0003589
hsa-m iR-624-5p	74	UAGUACCA GUACCUUG UGUUCA	MIMAT000 3293	hsa-mir-624	121	AAUGCUGUUUCAAG GUAGUACCAGUACC UUGUGUUCAGUGGA ACCAAGGUAAACACA AGGUAAUUGGUUUUA CCUUGAGAUAGCAU UACACCUAAGUG	MI0003638
hsa-m iR-642a-5p	75	GUCCUCU CCAAUUGU GUCUUG	MIMAT000 3312	hsa-mir-642a	122	AUCUGAGUUGGGAG GGUCCUCUCCAAU GUGUCUUGGGUGG GGGAUCAAGACACA UUUGGAGAGGGAAC CUCCCAACUCGGCCU CUGCCAUCAUU	MI0003657
hsa-miR-941	76	CACCCGGC UGUGUGC ACAUGUGC	MIMAT000 4984	hsa-mir-941-1	123	UGUGGACAUGUGCC CAGGGCCCGGGACAG CGCCACGGAAGAGGA CGCACCCGGCUGUG UGCACAUGUGCCCA	MI0005763
hsa-m iR-942-5p	77	UCUUCUCU GUUUUGG CCAUGUG	MIMAT000 4985	hsa-mir-942	124	AUUAGGAGAGUAUC UUCUCUGUUUUGGC CAUGUGUGUACUCA CAGCCCUACACAU GGCCGAAACAGAGAA GUUACUUUCCUAAU	MI0005767

Tabla 4. Fracturas diabéticas no recientes vs. Controles

ID maduro	SEQ ID	Seq maduro	nº de acc. maduro	horquilla	SEQ ID	Seq horquilla	Nº de acc. horquilla
hsa-let-7b-5p	125	UGAGGU AGUAGG UUGUGU GGUU	MIMAT0000063	hsa-let-7b	197	CGGGGUGAGGUAG UAGGUUGUGUGGU UUCAGGGCAGUGA UGUUGCCCCUCGGA AGAUAAUAUACAA CCUACUGCCUCCCC UG	MI0000063
hsa-let-7g-5p	126	UGAGGU AGUAGU UUGUAC AGUU	MIMAT0000414	hsa-let-7g	198	AGGCUGAGGUAGU AGUUUGUACAGUU UGAGGGUCUAUGA UACCACCCGUACA GGAGAUAAUCUGUAC AGGCCACUGCCUUG CCA	MI0000433

ES 2 704 748 T3

hsa-let-7i-5p	127	UGAGGU AGUAGU UUGUGC UGUU	MIMAT0000415	hsa-let-7i	199	CUGGCUGAGGUAG UAGUUUGUGCUGU UGGUCGGGUUGUG ACAUUGCCCGCUGU GGAGUAACUCGCG AAGCUACUGCCUUG CUA	MI0000434
hsa-miR-106a-5p	128	AAAAGU GCUUACA GUGCAG GUAG	MIMAT0000103	hsa-mir-106a	200	CCUUGGCCAUGUAA AAGUGCUUACAGUG CAGGUAGCUUUUU GAGAUCUACUGCAA UGUAAGCACUUCUU ACAUUACCAUGG	MI0000113
hsa-miR-106b-5p	129	UAAAGU GCUGACA GUGCAG AU	MIMAT0000680	hsa-mir-106b	201	CCUGCCGGGGCUAA AGUGCUGACAGUGC AGAUAGUGGUCCUC UCCGUGCUACCGCA CUGUGGGUACUUG CUGCUCACGACAGG	MI0000734
hsa-miR-127-3p	130	UCGGAU CCGUCUG AGCUUG GCU	MIM AT0000446	hsa-mir-127	202	UGUGAUCACUGUCU CCAGCCUGCUGAAG CUCAGAGGGCUCUG AUUCAGAAAGAUCA UCGGAUCCGUCUGA GCUUGGCUGGUCG GAAGUCUCAUCAUC	MI0000472
hsa-miR-132-3p	131	UACAG UCUACAG CCAUGG UCG	MIM AT0000426	hsa-mir-132	203	CCGCCCGCGUCUC CAGGGCAACCGUGG CUUUCGAUUGUAC UGUGGGAACUGGA GGUAACAGUCUACA GCCAUGGUCGCCCC GCAGCACGCCACG CGC	MI0000449
hsa-miR-140-3p	132	UACCACA GGGUAG AACCACG G	MIMAT0004597	hsa-mir-140	204	UGUGUCUCUCUCU GUGUCCUGCCAGUG GUUUUACCCUAUGG UAGGUUACGUCAU GCUGUUCUACCACA GGGUAGAACCACGG ACAGGAUACCGGGG CACC	MI0000456
hsa-miR-141-3p	133	UAACACU GUCUGG UAAAGA UGG	MIMAT0000432	hsa-mir-141	205	CGGCCGGCCUGGG UCCAUCUCCAGUA CAGUGUUGGAUGG UCUAAUUGUGAAGC UCCUAACACUGUCU GGUAAAGAUGGCUC CCGGUGGGUUC	MI0000457
hsa-miR-143-3p	134	UGAGAU GAAGCAC UGUAGC UC	MIMAT0000435	hsa-mir-143	206	GCGCAGCGCCUGU CUCCCAGCCUGAGG UGCAGUGCUGCAUC UCUGGUCAGUUGG GAGUCUGAGAUGAA GCACUGUAGCUCAG GAAGAGAGAAGUU GUUCUGCAGC	MI0000459

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-143-5p	135	GGUGCA GUGCUG CAUCUCU GGU	MIMAT0004599	hsa-mir-143	207	GCGCAGCGCCUGU CUCCCAGCCUGAGG UGCAGUGCUGCAUC UCUGGUCAGUUGG GAGUCUGAGAUGAA GCACUGUAGCUCAG GAAGAGAGAAGUU GUUCUGCAGC	MI0000459
hsa-miR-144-3p	136	UACAGU AUAGAU GAUGUA CU	MIMAT0000436	hsa-mir-144	208	UGGGGCCUGGCUG GGAUAUCAUCAU ACUGUAAGUUJGC GAUGAGACUACA GUAUAGAUGAUGU ACUAGUCCGGGCAC CCCC	MI0000460
hsa-miR-146b-5p	137	UGAGAA CUGAAU UCCAUAG GCU	MIMAT0002809	hsa-mir-146b	209	CCUGGCACUGAGAA CUGAAUCCAUAAGG CUGUGAGCUCUAGC AAUGCCUGUGGAC UCAGUUCUGGUGCC CGG	MI0003129
hsa-miR-154-5p	138	UAGGUU AUCCGU GUUGCC UUCG	MIMAT0000452	hsa-mir-154	210	GUGGUACUUGAAG AUAGGUUAUCCGU GUUGCCUUCGCUU UAUUUGUGACGAA UCAUACACGGUUGA CCUAUUUUUCAGUA CCAA	MI0000480
hsa-miR-16-2-3p	139	CCAUAU UACUGU GCUGCU UUA	MIMAT0004518	has-mir-16-2	211	GUUCCACUCUAGCA GCACGUAAAUAUUG GCGUAGUGAAAUA UAUAUUAAACACCA AUUAUACUGUGCU GCUUUAGUGUGAC	MI0000115
hsa-miR-16-5p	140	UAGCAGC ACGUAAA UAUUGG CG	MIM AT0000069	hsa-mir-16-1	212	GUCAGCAGUGCCUU AGCAGCACGUAAA AUUGGCGUUAAGA UUCUAAAUAUUCU CCAGUAUUACUGU GCUGCUGAAGUAAG GUUGAC	MI0000070
hsa-miR-17-5p	141	CAAAGU GCUUACA GUGCAG GUAG	MIMAT0000070	hsa-mir-17	213	GUCAGAAUAUGUC AAAGUGCUUACAGU GCAGGUAGUGAUA UGUGCAUCUACUGC AGUGAAGGCACUUG UAGCAUUAUGGUG AC	MI0000071
hsa-miR-181a-5p	271	AACAUUC AACGCUG UCGGUG AGU	MIMAT0000256	hsa-mir-181a-2	272	AGAAGGGCUAUCAG GCCAGCCUUCAGAG GACUCCAAGGAACA UUCAACGCUGUCGG UGAGUUUGGGAUU UGAAAAAACCACUG ACCGUUGACUGUAC CUUGGGGUCCUUA	MI0000269

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-181b-5p	142	AACAUUC AUUGCU GUCGGU GGGU	MIMAT0000257	hsa-mir-181b-1	214	CCUGUGCAGAGAUU AUUUUUUAAAAGG UCACAAUCAACAUU CAUUGCUGUCGGU GGGUUGAACUGUG UGGACAAGCUCACU GAACAAUGAAUGCA ACUGUGGCCCGCU U	MI0000270
hsa-miR-181c-3p	143	AACCAUC GACCGU UGAGUG GAC	MIMAT0004559	hsa-mir-181c	215	CGGAAAAUUUGCCA AGGGUUUGGGGA ACAUUCAACCUGUC GGUGAGUUUGGC AGCUCAGGCAAACC AUCGACCGUUGAGU GGACCCUGAGGCCU GGAAUUGCAUCCU	MI0000271
hsa-miR-181c-5p	144	AACAUUC AACCUGU CGGUGA GU	MIMAT0000258	hsa-mir-181c	216	CGGAAAAUUUGCCA AGGGUUUGGGGA ACAUUCAACCUGUC GGUGAGUUUGGC AGCUCAGGCAAACC AUCGACCGUUGAGU GGACCCUGAGGCCU GGAAUUGCAUCCU	MI0000271
hsa-miR-185-5p	145	UGGAGA GAAAGGC AGUUC UGA	MIMAT0000455	hsa-mir-185	217	AGGGGGCGAGGGA UUGGAGAGAAAGGC AGUUCUGAUGGUC CCUCCCCAGGGGC UGGCUUUCUCUGG UCCUCCUCCCA	MI0000482
hsa-miR-18a-3p	146	ACUGCCC UAAGUG CUCCUUC UGG	MIMAT0002891	hsa-mir-18a	218	UGUUCUAAGGUGC AUCUAGUGCAGAUU GUGAAGUAGAUUA GCAUCUACUGCCCU AAGUGCUCUUCUG GCA	MI0000072
hsa-miR-18a-5p	147	UAAGGU GCAUCUA GUGCAG AUAG	MIMAT0000072	hsa-mir-18a	219	UGUUCUAAGGUGC AUCUAGUGCAGAUU GUGAAGUAGAUUA GCAUCUACUGCCCU AAGUGCUCUUCUG GCA	MI0000072
hsa-miR-18b-5p	148	UAAGGU GCAUCUA GUGCAG UUAG	MIMAT0001412	hsa-mir-18b	220	UGUGUUAAGGUGC AUCUAGUGCAGUUA GUGAAGCAGCUUAG AAUCUACUGCCCUA AAUGCCCUUCUGG CA	MI0001518
hsa-miR-1908-5p	149	CGGCGG GGACGGC GAUUGG UC	MIMAT0007881	hsa-mir-1908	221	CGGGAAUGCCGCGG CGGGGACGCGAUU GGUCCGUUUGUGU GGUGCCACCGGCCG CCGGCUCGCCCCG GCCCGGCCCC	MI0008329

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-191-5p	150	CAACGGA AUCCAA AAGCAGC UG	MIMAT0000440	hsa-mir-191	222	CGGCUGGACAGCGG GCAACGGAAUCCCA AAAGCAGCUGUUGU CUCCAGAGCAUCC AGCUGCGCUUGGAU UUCGUCCCUGCUC UCCUGCCU	MI0000465
hsa-miR-196b-5p	151	UAGGUA GUUUC UGUUGU UGGG	MIMAT0001080	hsa-mir-196b	223	ACUGGUCGGUGAU UUAGGUAGUUUC UGUUGUUGGGAUC CACCUUUCUCUGA CAGCACGACACUGC CUUCAUUACUUCAG UUG	MI0001150
hsa-miR-199b-5p	152	CCCAGUG UUUAGA CUAUCU GUUC	MIM AT0000263	hsa-mir-199b	224	CCAGAGGACACCUC CACUCCGUCUACCC AGUGUUUAGACUA UCUGUUCAGGACUC CCAAUUUGUACAGU AGUCUGCACAUUGG UUAGGCUGGGCUG GGUUAGACCCUCGG	MI0000282
hsa-miR-19b-1-5p	153	AGUUUU GCAGGU UUGCAU CCAGC	MIMAT0004491	hsa-mir-19b-1	225	CACUGUUCU AUGGU UAGUUUUGCAGGU UUGCAUCCAGCUGU GUGAU AUUCUGCU GUGCAAUCCAUGC AAAACUGACUGUGG UAGUG	MI0000074
hsa-miR-19b-3p	154	UGUGCA AAUCCAU GCAAAAC UGA	MIMAT0000074	hsa-mir-19b-1	226	CACUGUUCU AUGGU UAGUUUUGCAGGU UUGCAUCCAGCUGU GUGAU AUUCUGCU GUGCAAUCCAUGC AAAACUGACUGUGG UAGUG	MI0000074
hsa-miR-200b-3p	155	UAAUAC UGCCUG GUAAUG AUGA	MIMAT0000318	hsa-mir-200b	227	CCAGCUCGGGCAGC CGUGGCCAUUUAC UGGGCAGCAUUGG AUGGAGUCAGGUC UCUAAUACUGCCUG GUAAUGAUGACGGC GGAGCCUGCACG	MI0000342
hsa-miR-203a	156	GUGAAA UGUUUA GGACCAC UAG	MIMAT0000264	hsa-mir-203a	228	GUGUUGGGGACUC GCGCGCUGGGUCCA GUGGUUCUUAACA GUUCAACAGUUCUG UAGCGCAAUUGUGA AAUGUUUAGGACCA CUAGACCCGGCGGG CGCGGCGACGCGA	MI0000283
hsa-miR-20a-5p	157	UAAAGU GCUUAU AGUGCA GGUAG	MIMAT0000075	hsa-mir-20a	229	GUAGCACUAAAGUG CUUAUAGUGCAGG UAGUGUUUAGUUA UCUACUGCAUUAUG AGCACUUAAGUAC UGC	MI0000076



ES 2 704 748 T3

hsa-miR-20b-5p	158	CAAAGU GCUCAUA GUGCAG GUAG	MIMAT0001413	hsa-mir-20b	230	AGUACCAAAGUGCU CAUAGUGCAGGUAG UUUUGGCAUGACUC UACUGUAGUAUGG GCACUCCAGUACU	MI0001519
hsa-miR-210-3p	159	CUGUGC GUGUGA CAGCGGC UGA	MIM AT0000267	hsa-mir-210	231	ACCCGGCAGUGCCU CCAGGCGCAGGGCA GCCCUUGCCCACCGC ACACUGCGCUGCCC CAGACCCACUGUGC GUGUGACAGCGGCU GAUCUGUGCCUGG GCAGCGGACCC	MI0000286
hsa-miR-21-3p	160	CAACACC AGUCGA UGGGCU GU	MIMAT0004494	hsa-mir-21	232	UGUCGGGUAGCUU AUCAGACUGAUGUU GACUGUUGAAUCUC AUGGCAACACCAGU CGAUGGGCUGUCU GACA	MI0000077
hsa-miR-25-3p	161	CAUUGCA CUUGUC UCGGUC UGA	MIMAT0000081	hsa-mir-25	233	GGCCAGUGUUGAG AGGCGGAGACUUGG GCAAUUGCUGGACG CUGCCUUGGGCAUU GCACUUGUCUCGGU CUGACAGUGCCGGC C	MI0000082
hsa-miR-26b-5p	162	UUCAAG UAAUUC AGGAUA GGU	MIMAT0000083	hsa-mir-26b	234	CCGGGACCCAGUUC AAGUAAUUCAGGAU AGGUUGUGUGCUG UCCAGCCUGUUCUC CAUUACUUGGCUCG GGGACCGG	MI0000084
hsa-miR-301a-3p	163	CAGUGCA AUAGUA UUGUCA AAGC	MIMAT0000688	hsa-mir-301a	235	ACUGCUAACGAAUG CUCUGACUUUAUUG CACUACUGUACUUU ACAGCUAGCAGUGC AAUAGUAUUGUCAA AGCAUCUGAAAGCA GG	MI0000745
hsa-miR-301b	164	CAGUGCA AUGAUA UUGUCA AAGC	MIMAT0004958	hsa-mir-301b	236	GCCGCAGGUGCUCU GACGAGGUUGCACU ACUGUGCUCUGAGA AGCAGUGCAAUGAU AUUGUCAAGCAUC UGGGACCA	MI0005568
hsa-miR-32-3p	273	CAUUUU AGUGUG UGUGAU AUUU	MIMAT0004505	hsa-mir-32	274	GGAGAUUUUGCACA UUACUAAGUUGCAU GUUGUCACGGCCUC AAUGCAAUUUAGU GUGUGUGAUUUU UC	MI0000090
hsa-miR-323a-3p	165	CACAUUA CACGGUC GACCUCU	MIMAT0000755	hsa-mir-323a	237	UUGGUACUUGGAG AGAGGUGGUCCGU GGCGGUUCGCUUU AUUUUAGGCGCACA UUACACGGUCGACC UCUUUGCAGUAUCU AAUC	MI0000807

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-324-5p	166	CGCAUCC CCUAGG GCAUUG GUGU	MIMAT0000761	hsa-mir-324	238	CUGACUAUGCCUCC CCGCAUCCCUAGG GCAUUGGUGUAAA GCUUGGAGACCCACU GCCCCAGGUGCUGC UGGGGGUUGUAGU C	MI0000813
hsa-miR-330-3p	167	GCAAAGC ACACGGC CUGCAGA GA	MIMAT0000751	hsa-mir-330	239	CUUUGGCGAUCACU GCCUCUCUGGGCCU GUGUCUUAAGCUC UGCAAGAUCAACCG AGCAAAGCACACGG CCUGCAGAGAGGCA GCGCUCUGCCC	MI0000803
hsa-miR-363-3p	168	AAUUGC ACGGUA UCCAUCU GUA	MIMAT0000707	hsa-mir-363	240	UGUUGUCGGGUGG AUCACGAUGCAAUU UUGAUGAGUAUCA UAGGAGAAAAUUG CACGGUAUCCAUCU GUAACC	MI0000764
hsa-miR-369-3p	169	AAUAAU ACAUGG UUGAUC UUU	MIMAT0000721	hsa-mir-369	241	UUGAAGGGGAGAUC GACCGUGUUUAU UCGCUUUUAUUGACU UCGAAUAAUACAUG GUUGAUCUUUUCU CAG	MI0000777
hsa-miR-374a-5p	170	UUAUAA UACAACC UGAUAA GUG	MIMAT0000727	hsa-mir-374a	242	UACAUCGGCAUUA UAAUACAACCUGAU AAGUGUUUAAGCAC UUAUCAGAUUGUA UUGUAAUUGUCUG UGUA	MI0000782
hsa-miR-375	171	UUUGUU CGUUCG GCUCGCG UGA	MIMAT0000728	hsa-mir-375	243	CCCCGCGACGAGCCC CUCGCACAAACCGG ACCUGAGCGUUUUG UUCGUUCGCGUCGC GUGAGGC	MI0000783
hsa-miR-376c-3p	172	AACAUAG AGGAAA UUCCACG U	MIMAT0000720	hsa-mir-376c	244	AAAAGGUGGAUUAU UCCUUCUAUGUUU AUGUUUUUAUGG UUAAACAUAGAGGA AAUCCACGUUUU	MI0000776
hsa-miR-378a-5p	173	CUCCUGA CUCCAGG UCCUGU GU	MIMAT0000731	hsa-mir-378a	245	AGGGCUCCUGACUC CAGGUCCUGUGUG UUACCUAGAAUAG CACUGGACUUGGAG UCAGAAGGCCU	MI0000786
hsa-miR-451a	174	AAACCGU UACCAUU ACUGAG UU	MIMAT0001631	hsa-mir-451a	246	CUUGGGAAUGGCAA GGAAACCGUUACCA UUACUGAGUUUAG UAAUGGUAUUGGU UCUCUUGCUAUACC CAGA	MI0001729

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-454-3p	175	UAGUGC AAUAAU GCUAAU AGGGU	MIMAT0003885	hsa-mir-454	247	UCUGUUUAUCACCA GAUCCUAGAACCCU AUCAAUAUUGUCUC UGCUGUGUAAAUA GUUCUGAGUAGUG CAAUAUUGCUAUA GGUUUUUGGUGUU UGGAAAGAACAUG GGCAGG	MI0003820
hsa-miR-486-3p	176	CGGGGCA GCUCAG UACAGG AU	MIMAT0004762	hsa-mir-486	248	GCAUCCUGUACUGA GCUGCCCCGAGGCC CUUCAUGCUGCCCA GCUCGGGGCAGCUC AGUACAGGAUAC	MI0002470
hsa-miR-486-5p	177	UCCUGU ACUGAGC UGCCCCG AG	MIMAT0002177	hsa-mir-486	249	GCAUCCUGUACUGA GCUGCCCCGAGGCC CUUCAUGCUGCCCA GCUCGGGGCAGCUC AGUACAGGAUAC	MI0002470
hsa-miR-493-5p	178	UUGUAC AUGGUA GGUUUU CAUU	MIMAT0002813	hsa-mir-493	250	CUGGCCUCCAGGGC UUUGUACAUGGUA GGUUUUCAUUAUU CGUUUGCACAUUCG GUGAAGGUCUACU GUGUGCCAGGCCU GUGCCAG	MI0003132
hsa-miR-500a-5p	179	UAAUCCU UGCUACC UGGGUG AGA	MIMAT0004773	hsa-mir-500a	251	GCUCCCCUCUCUA AUCCUUGCUACCUG GGUGAGAGUGCUG UCUGAAUGCAAUGC ACCUGGGCAAGGAU UCUGAGAGCGAGAG C	MI0003184
hsa-miR-532-3p	180	CCUCCA CACCAA GGCUUG CA	MIMAT0004780	hsa-mir-532	252	CGACUUGCUUUCUC UCCUCAUGCCUUG AGUGUAGGACCGU UGGCAUCUUAUUUA CCCUCACACCCAA GGCUUGCAAAAAG CGAGCCU	MI0003205
hsa-miR-545-3p	181	UCAGCAA ACAUUU AUUGUG UGC	MIMA T0003165	hsa-mir-545	253	CCCAGCCUGGCACA UUAGUAGGCCUCAG UAAAUGUUUAUUA GAUGAAUAAAUGAA UGACUCAUCAGCAA ACAUUUUUUGUGU GCCUGCUAAAGUGA GCUCCACAGG	MI0003516
hsa-miR-550a-3p	182	UGUCUU ACUCCU CAGGCAC AU	MIMAT0003257	hsa-mir-550a-1	254	UGAUGCUUUGCUG GCUGGUGCAGUGCC UGAGGGAGUAAGA GCCUGUUGUUGU AAGAUAGUGUCUU ACUCCUCAGGCAC AUCUCCAACAAGUC UCU	MI0003600

ES 2 704 748 T3

hsa-miR-550a-5p	183	AGUGCC UGAGGG AGUAAG AGCCC	MIM AT0004800	hsa-mir-550a-1	255	UGAUGCUUUGCUG GCUGGUGCAGUGCC UGAGGGAGUAAGA GCCUGUUGUUGU AAGAUAGUGUCUU ACUCCUCAGGCAC AUCUCCAACAAGUC UCU	MI0003600
hsa-miR-589-5p	184	UGAGAA CCACGUC UGCUCU GAG	MIMAT0004799	hsa-mir-589	256	UCCAGCCUGUGCCC AGCAGCCCUGAGA ACCACGUCUGCUCU GAGCUGGGUACUGC CUGUUCAGAACAAA UGCCGGUUCACAGA CGCUGCCAGCUGGC C	MI0003599
hsa-miR-590-3p	185	UAAUUU UAUGUA UAAGCU AGU	MIMAT0004801	hsa-mir-590	257	UAGCCAGUCAGAAA UGAGCUUAUUCUAU AAAGUGCAGUAUGG UGAAGUCAUCUGU AAUUUUAUGUAUA AGCUAGUCUCUGAU UGAAACAUGCAGCA	MI0003602
hsa-miR-598-3p	186	UACGUCA UCGUUG UCAUCG UCA	MIMAT0003266	hsa-mir-598	258	GCUUGAUGAUGCU GCUGAUGCUGGCG GUGAUCCGAUGGU GUGAGCUGGAAAU GGGGUGCUACGUCA UCGUUGUCAUCGUC AUCAUCAUCAUCCG AG	MI0003610
hsa-miR-627-5p	187	GUGAGU CUCUAAG AAAAGAG GA	MIMAT0003296	hsa-mir-627	259	UACUUAUUACUGG UAGUGAGUCUCUAA GAAAAGAGGAGGU GGUUGUUUCCUC CUCUUUUUUUGA GACUCACUACCAU AAUAAGAAAUACUA CUA	MI0003641
hsa-miR-629-5p	188	UGGGUU UACGUU GGGAGA ACU	MIMAT0004810	hsa-mir-629	260	UCCUUUCCCAGGG GAGGGGUCUGGGUU UACGUUGGGAGAAC UUUUACGGUGAACC AGGAGGUUCUCCA ACGUAAGCCAGCC CCUCCCUUGCCU	MI0003643
hsa-miR-7-5p	189	UGGAAG ACUAGU GAUUUU GUUGU	MIMAT0000252	hsa-mir-7-1	261	UUGGAUGUUGGCC UAGUUCUGUGUGG AAGACUAGUGAUU UUGUUGUUUUUAG AUAACUAAAUCGAC AACAAUACAGUC UGCCAUAUGGCACA GGCCAUGCCUCUAC AG	MI0000263
hsa-miR-92a-3p	190	UAUUGC ACUUGU CCCGGCC UGU	MIMAT0000092	hsa-mir-92a-1	262	CUUUUCACACAGGU UGGGAUCGGUUGC AAUGCUGUGUUUC UGUAUGGUUUUGC ACUUGUCCCGCCU GUUGAGUUUGG	MI0000093

hsa-miR-93-3p	191	ACUGCU GAGCUA GCACUUC CCG	MIMAT0004509	hsa-mir-93	263	CUGGGGGCUCCAAA GUGCUGUUCGUGC AGGUAGUGUGAUU ACCCAACCUACUGC UGAGCUAGCACUUC CCGAGCCCCCGG	MI0000095
hsa-miR-93-5p	192	CAAAGU GCUGUU CGUGCA GGUAG	MIMAT0000093	hsa-mir-93	264	CUGGGGGCUCCAAA GUGCUGUUCGUGC AGGUAGUGUGAUU ACCCAACCUACUGC UGAGCUAGCACUUC CCGAGCCCCCGG	MI0000095
hsa-miR-941	193	CACCCGG CUGUGU GCACAUG UGC	MIMAT0004984	hsa-mir-941-1	265	UGUGGACAUGUGCC CAGGGCCCGGACA GCGCCACGGAAGAG GACGCACCCGGCUG UGUGCACAUGUGCC CA	MI0005763
hsa-miR-942-5p	194	UCUUCUC UGUUUU GGCCAU GUG	MIMAT0004985	hsa-mir-942	266	AUUAGGAGAGUUAU CUUCUCUGUUUUUG GCCAUGUGUGUACU CACAGCCCCUCACAC AUGGCCGAAACAGA GAAGUUACUUUCCU AAU	MI0005767
hsa-miR-96-5p	195	UUUGGC ACUAGCA CAUUUU UGCU	MIMAT0000095	hsa-mir-96	267	UGGCCGAUUUUGG CACUAGCACAUUUU UGCUGUGUCUCU CCGCUCUGAGCAAU CAUGUGCAGUGCCA AUAUGGGAAA	MI0000098
hsa-miR-98-5p	196	UGAGGU AGUAAG UUGUAU UGUU	MIMAT0000096	hsa-mir-98	268	AGGAUUCUGCUCAU GCCAGGGUGAGGUA GUAAGUUGUAUUG UUGUGGGGUAGGG AUUUUAGGCCCAA UUAGAAGUAACUA UACAACUUAUCUACU UUCCUGGUGUGU GGCAUAUUA	MI0000100

Bibliografía

- Anastas, J. N. y Moon, R. T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(1), 11-26. doi:10.1038/nrc3419
- 5 Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
- Canalis, E. (2013). Wnt signalling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(10), 575-83. doi:10.1038/nrendo.2013.154
- 10 Cefalu, C. A. (2004). Is bone mineral density predictive of fracture risk reduction? *Current Medical Research and Opinion*, 20(3), 341-349. doi:10.1185/030079903125003062
- Deng, Y., Bi, X., Zhou, H., You, Z., Wang, Y., Gu, P., & Fan, X. (2014). Repair of critical-sized bone defects with anti-miR-31-expressing bone marrow stromal stem cells and poly(glycerol sebacate) scaffolds. *European Cells & Materials*, 27, 13-24; discussion 24-5. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425157>
- 15 Dong, S., Yang, B., Guo, H. y Kang, F. (2012). MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(4), 587-591. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.075
- Kanis, J. A., McCloskey, E. V, Johansson, H., Cooper, C., Rizzoli, R., Reginster, J.-Y., & Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) y Committee of

- Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation (IOF). (2013). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 24(1), 23-57. doi:10.1007/s00198-012-2074-y
- 5 Kapinas, K., Kessler, C. B., & Delany, A. M. (2009). miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, 108(1), 216-224. doi:10.1002/jcb.22243
- Keller, A., Leidinger, P., Bauer, A., Elsharawy, A., Haas, J., Backes, C., ... Meese, E. (2011). Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nature Methods*, 8(10), 841-3. doi:10.1038/nmeth.1682
- 10 Li, Z., Hassan, M. Q., Volinia, S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Croce, C. M., ... Stein, G. S. (2008). A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), 13906-13911. doi:10.1073/pnas.0804438105
- Rubin, K. H., Abrahamsen, B., Friis-Holmberg, T., Hjelmborg, J. V. B., Bech, M., Hermann, A. P., ... Brixen, K. (2013). Comparison of different screening tools (FRAX®, OST, ORAI, OSIRIS, SCORE and age alone) to identify women with increased risk of fracture. A population-based prospective study. *Bone*, 56(1), 16-22. doi:10.1016/j.bone.2013.05.002
- 15 Seeliger, C., Karpinski, K., Haug, A., Vester, H., Schmitt, A., Bauer, J. y van Griensven, M. (2014). Five Freely Circulating miRNAs and Bone Tissue miRNAs are Associated with Osteoporotic Fractures. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. doi:10.1002/jbmr.2175
- Trompeter, H.-I., Dreesen, J., Hermann, E., Iwaniuk, K. M., Hafner, M., Renwick, N., ... Wernet, P. (2013). MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. *BMC Genomics*, 14(1), 111. doi:10.1186/1471-2164-14-111
- 20 Van Wijnen, A. J., van de Peppel, J., van Leeuwen, J. P., Lian, J. B., Stein, G. S., Westendorf, J. J., ... Kakar, S. (2013). MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Current Osteoporosis Reports*, 11(2), 72-82. doi:10.1007/s11914-013-0143-6
- 25 Vasikaran, S., Eastell, R., Bruyère, O., Foldes, A. J., Garnero, P., Griesmacher, A., ... IOF-IFCC Bone Marker Standards Working Group. (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 22(2), 391-420. doi:10.1007/s00198-010-1501-y
- 30 Weilner, S., Schraml, E., Redl, H., Grillari-Voglauer, R., & Grillari, J. (2013). Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging. *Experimental Gerontology*, 48(7), 626-633. doi:10.1016/j.exger.2012.11.017
- Zhao, X., Xu, D., Li, Y., Zhang, J., Liu, T., Ji, Y., ... Xie, X. (2013). MicroRNAs regulate bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. doi:10.1007/s00774-013-0537-7.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de diagnóstico de osteoporosis o de determinación del riesgo de fracturas osteoporóticas en un sujeto, que comprende las etapas de:
  - a) proporcionar una muestra de sangre de dicho sujeto,
  - 5 b) medir el nivel de hsa-miR-188-3p y por lo menos uno de:
    - i) miARN de grupo II que consisten en hsa-miR-382-3p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-1227-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-133b, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-136-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-181a-3p, hsa-miR-1908, hsa-miR-190a, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-215, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-377-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-487b, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-624-5p, hsa-miR-642a-5p, hsa-miR-941 y hsa-miR-942, o isoformas o variantes de los mismos, y/o
    - 15 ii) miARN de grupo III que consisten en hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-32-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-132-3p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-154-5p, hsa-miR-16-2-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-3p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-1908, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19b-1-5p, hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-210, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-301b, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-363-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-493-5p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-545-3p, hsa-miR-550a-3p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-589-5p, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-598, hsa-miR-627, hsa-miR-629-5p, hsa-miR-7-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-93-3p, hsa-miR-93-5p, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-96-5p y hsa-miR-98-5p o isoformas o variantes de los mismos, y
    - 20 c) comparar el nivel de dichos miARN con el nivel del miARN correspondiente en una muestra de sangre de referencia de un individuo sano,
    - 25 en donde una diferencia superior a 1,5 veces en dicho nivel en comparación con la muestra de referencia es indicativa de osteoporosis o riesgo de fracturas.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el nivel de dichos miARN se compara con el nivel medio de miARN correspondientes en sujetos sanos, en donde una diferencia superior a una desviación estándar es indicativa de osteoporosis con riesgo incrementado de futuras fracturas.
- 35 3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde se mide el nivel de al menos 4, preferiblemente de al menos 5 miARN de cualquiera de los grupos II o III.
4. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde se mide el nivel de todos los miARN de grupo II y/o grupo III.
5. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde se mide además los niveles de hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-133b, hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-203a, hsa-miR-20b-5p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-378a-5p, hsa-miR-454-3p, hsa-miR-500a-5p, hsa-miR-550a-5p, hsa-miR-941 y hsa-miR-942.
- 40 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se detecta uno o más miARN adicionales, en donde dichos miARN adicionales se seleccionan de los miARN de grupo V, que consiste en hsa-miR-140-5p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-20a, hsa-miR-200a, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-26a, hsa-miR-27a, hsa-miR-2861, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-29c-3p, hsa-miR-204-5p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34c, hsa-miR-370-3p, hsa-miR-3960 y hsa-miR-503-5p, o isoformas y variantes de los mismos.
- 45 7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los sujetos son sujetos en los que se determinará el riesgo de fracturas, o son pacientes de osteoporosis u osteopenia que sufren de, o están en riesgo de sufrir, fracturas óseas, o son pacientes que están en riesgo de sufrir o sufren diabetes mellitus tipo 2.
- 50 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la diferencia de niveles de miARN se determina mediante PCR cuantitativa o digital, secuenciación, micromatrices, ensayos de ácido nucleico Luminex, u otras técnicas basadas en la hibridación.

Figura 1

a

FX vs. Control : ROC de mejores modelos con tamaños 1 a 4

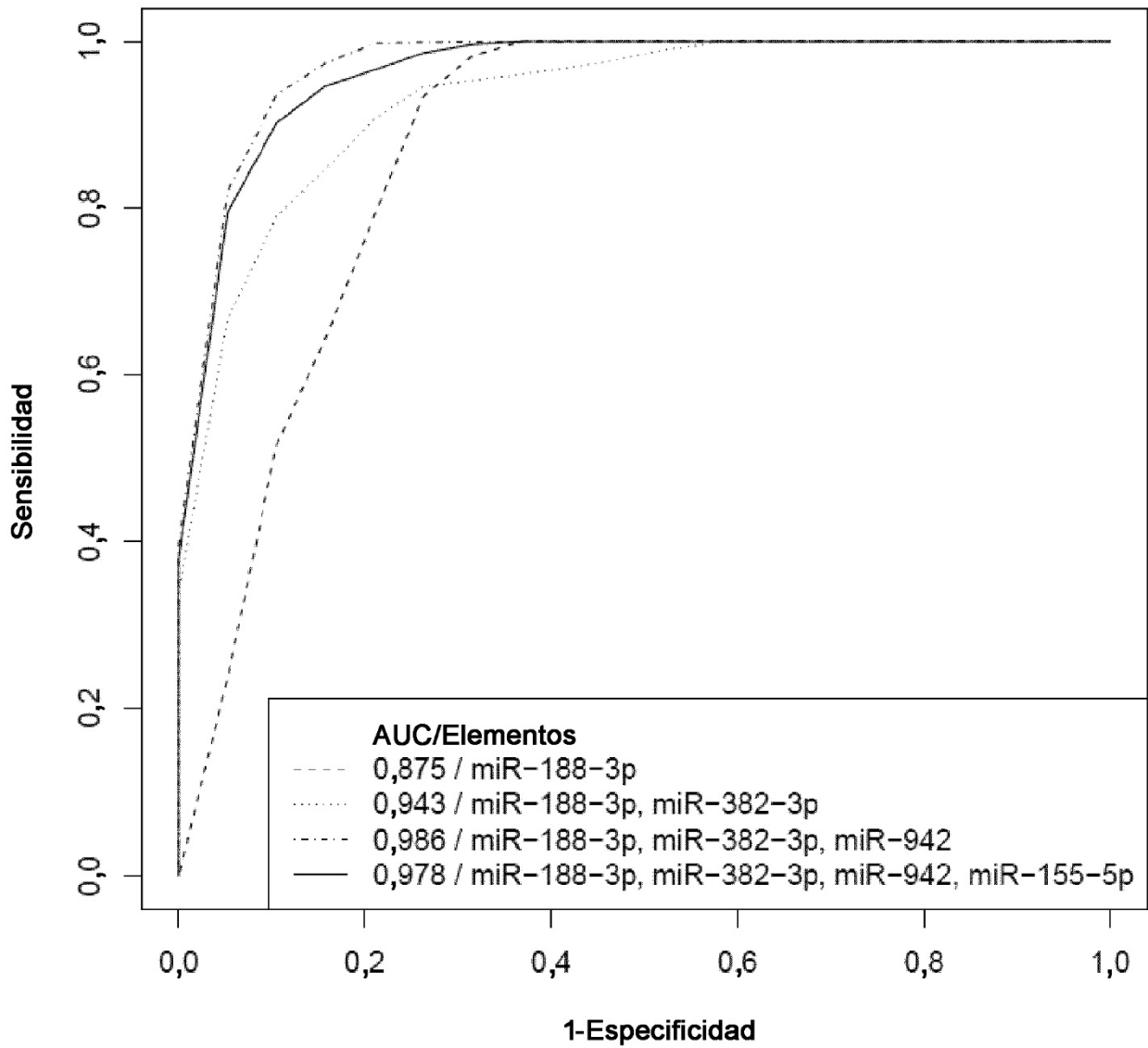




Figura 1 (continuación)

b

FX vs. Control : diagramas de cajas de los 4 mejores miARN

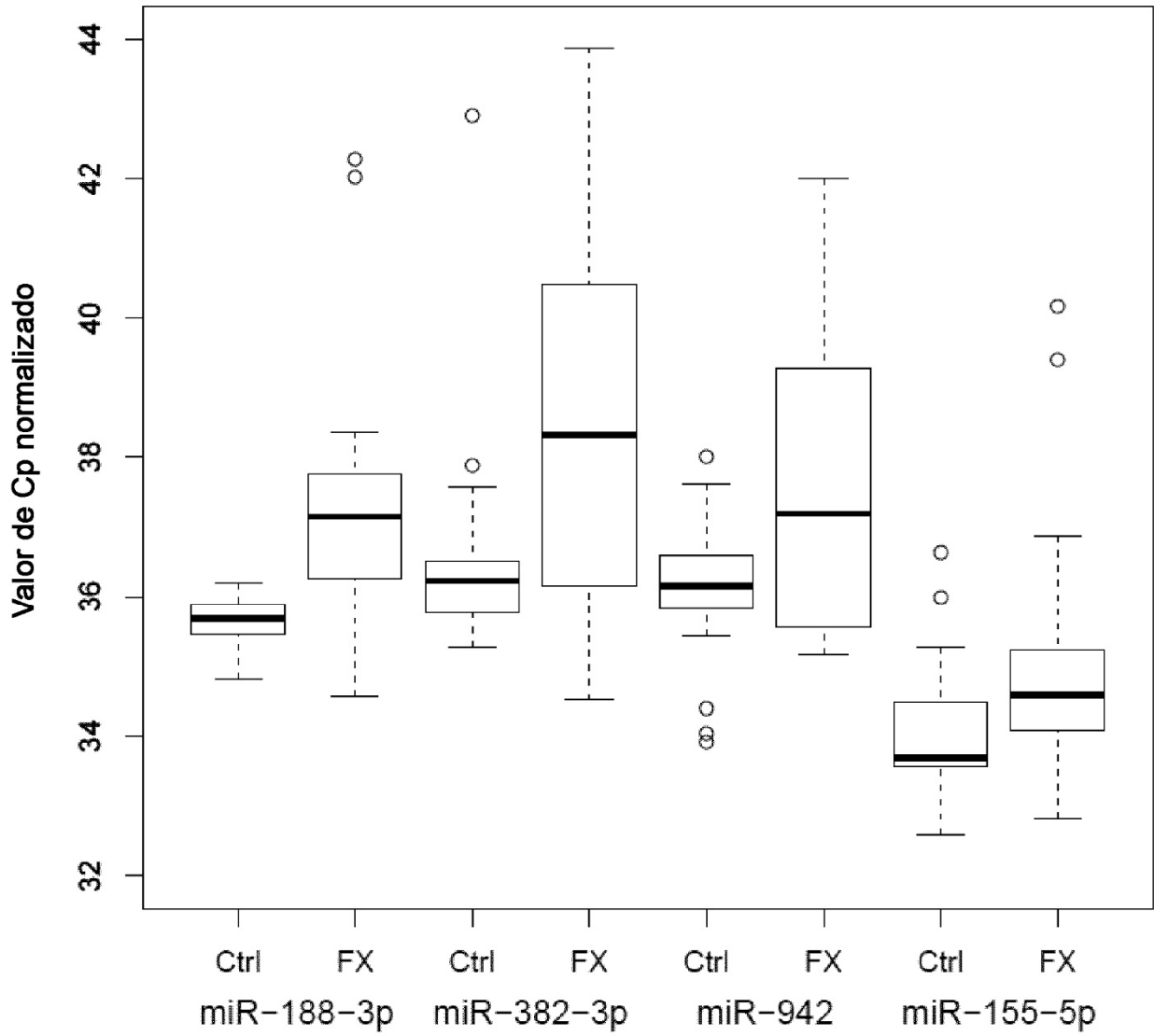


Figura 1 (continuación)

**c**

**DMFX vs. DM: ROC de los mejores modelos con tamaños 1 a 4**

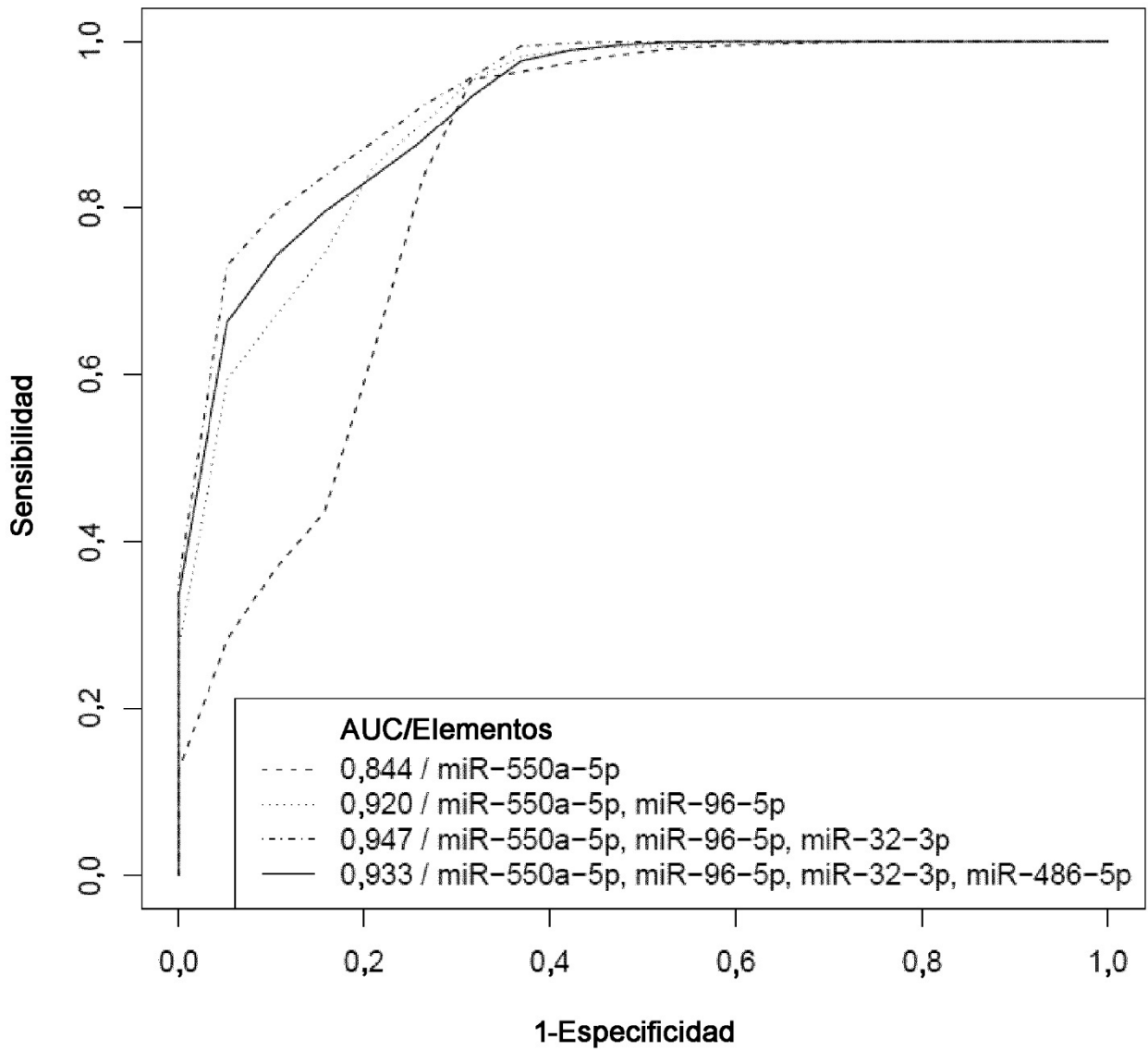


Figura 1 (continuación)

d

DMFX vs. DM : Diagramas de cajas de los 4 mejores miARN

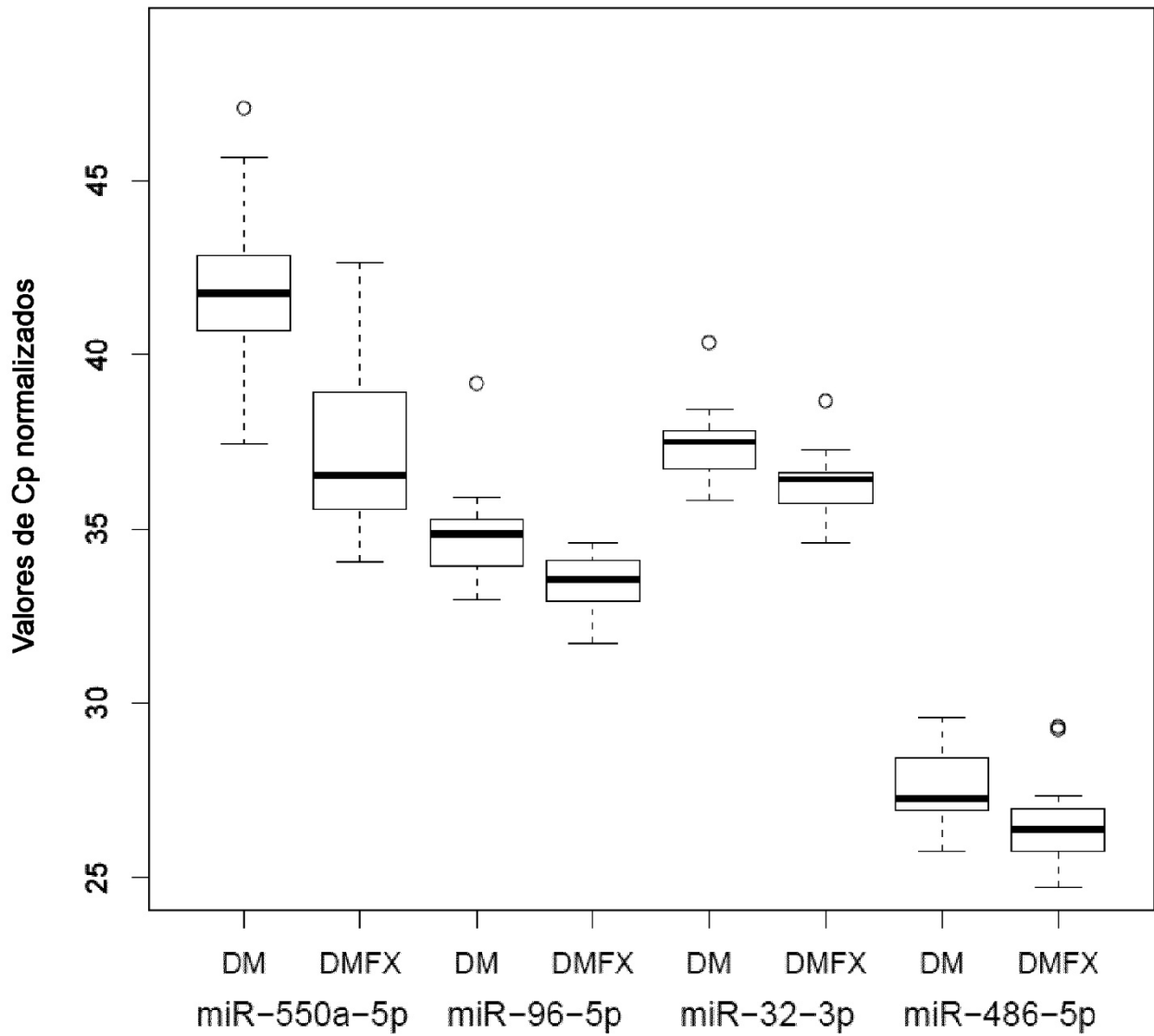


Figura 2

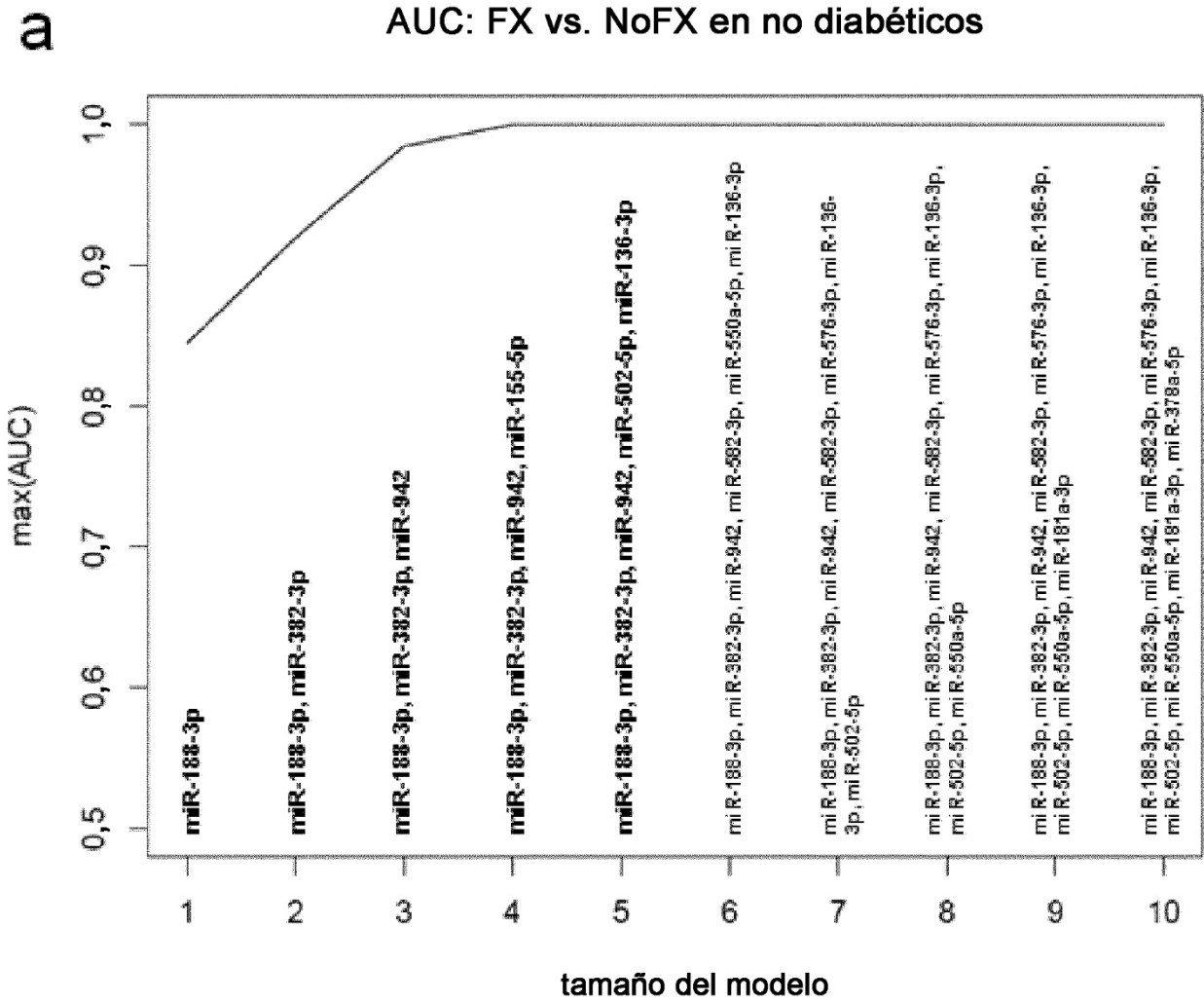


Figura 2 (continuación)

**b**

**AUC: FX vs. NoFX entre diabéticos**

