

Delgado-Calle J¹, Sañudo C¹, Sumillera M², Garcés CM², Riancho JA¹

¹ Departamento de Medicina Interna - H.U. Marqués de Valdecilla - IFIMAV - Universidad de Cantabria - Santander

² Departamento de Cirugía Ortopédica y Traumatología - H.U. Marqués de Valdecilla - Santander

Expresión de RANKL y OPG en osteoblastos primarios

Correspondencia: José A. Riancho - Departamento de Medicina Interna - Hospital U.M. Valdecilla - IFIMAV - Universidad de Cantabria - Av. Marqués de Valdecilla, s/n - 39008 Santander (España)
Correo electrónico: rianchoj@unican.es

Fecha de recepción: 20/06/2012

Fecha de aceptación: 19/11/2012

Resumen

Objetivo: Los osteoblastos son células especializadas encargadas principalmente de la formación ósea. Además son capaces de modular la osteoclastogénesis a través de la producción de RANKL y OPG. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de estas citocinas en osteoblastos primarios.

Material y métodos: Se obtuvieron osteoblastos primarios usando tejido óseo trabecular de pacientes sometidos a colocación de una prótesis de cadera por fractura (n=28) o artrosis (n=26). Se excluyeron del estudio aquellos pacientes con osteoporosis secundaria, con fracturas debidas a traumatismos de alta energía o artrosis secundaria. La expresión de RANKL y OPG se estudió mediante PCR cuantitativa.

Resultados: La expresión de RANKL y OPG no varió significativamente durante un proceso de mineralización *in vitro*. Además, la expresión de OPG fue marcadamente superior a la de RANKL. Dado que en un trabajo previo encontramos una mayor abundancia de RANKL y un mayor cociente RANKL/OPG en el tejido óseo de pacientes osteoporóticos que en el de artrósicos, decidimos estudiar si esta expresión anormal en tejido se daba también en los osteoblastos. Sin embargo, en cultivos de osteoblastos primarios no encontramos diferencias en los niveles de expresión de RANKL, ni de OPG, entre los dos grupos de pacientes.

Conclusiones: En conjunto, nuestros datos confirman que los osteoblastos son capaces de producir RANKL y OPG. Sin embargo, las diferencias de expresión encontradas a nivel de tejido óseo entre pacientes osteoporóticos y artrósicos no parecen relacionarse con diferentes características intrínsecas de sus osteoblastos, pues no se reproducen en los cultivos primarios.

Palabras clave: osteoclastogénesis, remodelado óseo, osteoporosis, artrosis.

Expression of RANKL and OPG in primary osteoblasts

Summary

Objective: Osteoblasts are specialized cells responsible for bone formation. Furthermore, these cells modulate osteoclast formation and maturation, mainly by the production of RANKL and OPG. We previously reported that the bone tissue of osteoporotic patients showed increased RANKL expression and RANKL/OPG ratio when compared to osteoarthritic patients. Thus we decided to explore whether this aberrant expression may be related to an abnormal expression of these genes by osteoblasts. The aim of this study was to explore the transcriptional levels of these factors in primary osteoblasts.

Methods: Primary human osteoblasts (hOBs) were obtained by the primary explant technique from bone tissue of patients undergoing hip replacement surgery for hip fractures (n=28) or osteoarthritis (n=26). Patients with secondary osteoporosis, fractures due to high-energy trauma or secondary osteoarthritis were excluded. RANKL and OPG gene expression was explored by real time quantitative PCR.

Results: No statistical differences in RANKL and OPG gene expression were found along the *in vitro* mineralization of hOBs. Interestingly, OPG transcriptional levels were markedly higher than RANKL levels. However, no differences in the transcriptional levels of RANKL and OPG were observed between both groups.

Conclusions: Overall, our data confirm that osteoblasts produce RANKL and OPG. However, our results suggest that the gene expression differences found in the osteoporotic and osteoarthritic bone tissue are not explained by the intrinsic characteristics of osteoblasts.

Key words: osteoclastogenesis, bone remodeling, osteoporosis, osteoarthritis.

Introducción

El hueso es una forma especializada de tejido de sostén formado por diferentes tipos celulares y materiales mineralizados que le confieren rigidez y resistencia marcadas, a la vez que le permiten conservar un cierto grado de elasticidad. Debido a esta peculiar composición, el tejido óseo también es un importante reservorio de calcio y otros iones inorgánicos, y participa activamente en el mantenimiento de la homeostasis del calcio. Cada uno de los huesos es esculpido mediante un complicado proceso denominado modelado¹. Además, el tejido óseo es renovado constantemente por un proceso conocido como remodelado². El remodelado desempeña un papel esencial en la homeostasis del calcio y además preserva la solidez de los huesos al sustituir el hueso viejo por nuevo hueso.

A diferencia del modelado, el remodelado óseo requiere la acción coordinada de osteoclastos, células que se encargan de resorber hueso, y osteoblastos, células formadoras de hueso. Básicamente, el proceso de remodelado se puede dividir en cuatro fases^{3,4}. La primera fase, conocida como de activación, implica el proceso de comienzo de remodelado mediante la activación de osteoclastos en una región determinada del hueso a través de la atracción de precursores de osteoclastos y la inducción de su diferenciación a osteoclastos maduros. En una segunda etapa, de resorción, los osteoclastos se fijan a la matriz ósea creando una cavidad de resorción. La fase de resorción finaliza con la apop-

tos de los osteoclastos. Conjuntamente a la apoptosis osteoclástica se producen señales responsables del reclutamiento de osteoblastos hacia las cavidades de resorción (fase de proliferación). Este acoplamiento entre la acción de los osteoclastos y osteoblastos es secuencial, de forma que los procesos de resorción y formación ósea no conviven en el tiempo ni en el espacio. Además es crítico para que se de un adecuado proceso de remodelado. Finalmente, durante la última etapa, conocida como de formación, los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica no mineralizada, y posteriormente son responsables de su mineralización.

A pesar de que no se conocen con detalle todos los mecanismos moleculares responsables de este proceso, sí se han logrado identificar algunos de ellos. El sistema de señalización RANKL-RANK, crítico para el inicio de la osteoclastogénesis, es quizás el mecanismo molecular más importante para la diferenciación de los osteoclastos⁵. El ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) es una proteína producida por varios tipos celulares; entre ellos, los osteoblastos son una de las principales fuentes en el tejido óseo⁶. Esta proteína se une al receptor activador del factor nuclear κ B (RANK), presente en la membrana de precursores de osteoclastos, induciendo la diferenciación de éstos a través de la activación en un último término del factor de transcripción NFATc-1, que se encarga de modular la expresión de los genes necesarios para formar un osteoclasto maduro y preparado para resorber

hueso⁷. Por otro lado, los osteoblastos también son capaces de producir osteoprotegerina (OPG), otra proteína que actúa como un receptor soluble para el RANKL, bloqueando de esta forma la posible interacción entre el RANKL y su receptor RANK⁸. De hecho, el cociente RANKL/OPG determina en buena medida la tasa de la osteoclastogénesis. Directamente relacionado con esto, en un trabajo previo hemos observado que la expresión génica de RANKL y el cociente RANKL/OPG en el tejido óseo son significativamente mayores en pacientes con fracturas osteoporóticas que en pacientes artrósicos, sugiriendo que los pacientes con osteoporosis podrían tener una mayor activación de la osteoclastogénesis, y como consecuencia un desequilibrio en el remodelado óseo que provoca una pérdida de masa ósea y una mayor probabilidad de sufrir fracturas⁹. A pesar de que los datos de otros autores confirman estos resultados^{10,11}, por el momento se desconocen las razones que provocan estas diferencias en la producción de RANKL y OPG.

Dada su capacidad de producir RANKL y OPG, los osteoblastos no son sólo cruciales para la formación ósea, sino que también son esenciales para el inicio de la osteoclastogénesis y un correcto acoplamiento resorción-formación. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en la expresión de RANKL y OPG en osteoblastos primarios durante un proceso de mineralización *in vitro* y comparar los niveles de transcripción en osteoblastos procedentes de pacientes osteoporóticos y artrósicos.

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Se obtuvieron muestras de tejido óseo procedentes de la cabeza femoral durante artroplastias sustitutivas. El estudio fue aprobado por el Comité Regional de Ética en Investigación Clínica, y todas las muestras se recogieron tras obtener consentimiento informado. Los osteoblastos primarios se obtuvieron mediante la técnica de explante¹², usando tejido óseo trabecular de la parte central de la cabeza femoral, evitando el área fracturada y regiones subcondrales. Los osteoblastos se cultivaron en DMEM, complementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos, y se mantuvieron en un incubador a 37°C, con un 5% de CO₂ y a una humedad relativa superior al 90%.

Para los experimentos de mineralización se plaquearon las células a una densidad de 40.000 células/cm². Una vez que las células llegaron a confluencia, se añadió medio osteogénico (DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino, antibióticos, 50 µM de ácido ascórbico y 10 mM de β-glicerofosfato). Se estudió el progreso de la calcificación mediante tinción con Alizarin Red S¹³. Para el análisis de la expresión de RANKL y OPG en pacientes artrósicos y osteoporóticos se utilizaron cultivos de osteoblastos primarios con una confluencia del 80% (pases 1-2) procedentes de pacientes sometidos a colocación de una prótesis de cadera por fractura o artrosis. Para la selección de pacientes se utilizaron criterios de evaluación determinantes para diagnosticar la osteoporosis y

la artrosis, como son la presencia de fracturas en el caso de los primeros, o de artrosis grave en el caso de los segundos. Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes con osteoporosis secundaria, con fracturas debidas a traumatismos de alta energía o con artrosis secundaria.

Expresión génica

Se extrajo ARN de los cultivos de osteoblastos primarios semiconfluentes usando Trizol, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Para la síntesis de cDNA se usó 1 µg de ARN y se siguieron las instrucciones del fabricante para el kit Superscript III First Strand (Invitrogen). Durante el cultivo de las células en medio osteogénico se extrajo ARN de forma consecutiva cada 7 días.

Se cuantificó la expresión génica de RANKL y OPG mediante PCR cuantitativa (RT-qPCR) con sondas TaqMan siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Para evitar la variabilidad inter-experimental se incluyeron muestras de los dos grupos en cada uno de los análisis realizados. Las sondas TaqMan usadas fueron: TNFSF11 (isoforma I, RANKL): Hs00243519_m1 y TNFRSF11B (OPG): Hs00900360_m1. Para cada gen se calculó la expresión relativa, usando como referencia la expresión del gen de la proteína de unión a cajas TATA (TBP), expresado constitutivamente en las células. La expresión fue calculada usando el método 2-ΔCt, siendo ΔCt la diferencia entre el ciclo umbral (Ct) del gen de interés y TBP.

Análisis estadísticos

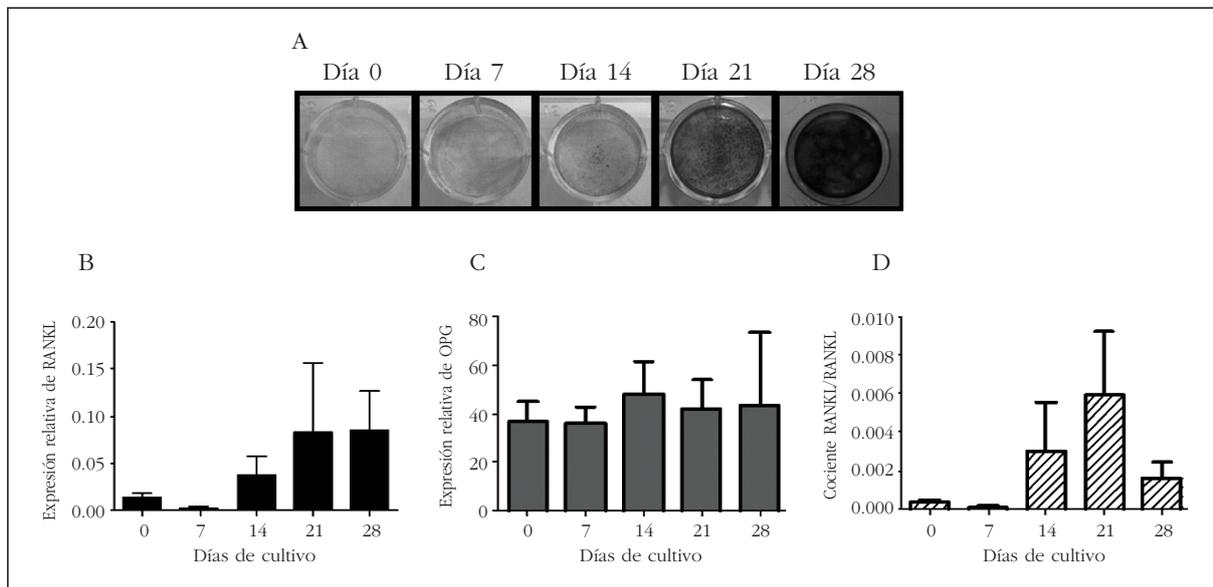
Para la comparación de la expresión de RANKL y OPG a lo largo del proceso de diferenciación osteogénica se usó el test t-Student de dos colas. La significación estadística de las diferencias entre los pacientes con osteoporosis y la artrosis se estudió con el test de Mann-Whitney de dos colas. Se fijó el valor p=0,05 como límite de la significación estadística. Los datos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism, versión 5.01.

Resultados

Estudio de la expresión de RANKL y OPG durante un proceso de mineralización *in vitro*

Los cultivos de osteoblastos primarios en condiciones osteogénicas mostraron una mineralización progresiva, puesta de manifiesto mediante tinción con Alizarin Red S (Figura 1A). De forma paralela estudiamos la expresión de RANKL y OPG a lo largo del proceso (Figura 1B). La expresión de RANKL mostró una tendencia a aumentar con el avance de la calcificación, haciéndose notable a partir de las tres semanas de cultivo, si bien no llegó a ser estadísticamente significativa. Por otro lado, no detectamos diferencias en los niveles transcripcionales de OPG (Figura 1C). Cabe destacar que la expresión génica de OPG fue muy superior a la de RANKL durante todo el proceso. En consecuencia, los valores del cociente RANKL/OPG fueron llamativamente bajos, aunque de nuevo observamos una tendencia no significativa a aumentar con el tiempo de cultivo (Figura 1D).

Figura 1. Expresión génica de RANKL y OPG en un proceso de mineralización *in vitro* en osteoblastos primarios. A) Cada 7 días, se valoró la deposición mineral mediante Alizarin Red S. B) La expresión de RANKL mostró una tendencia no significativa a aumentar con el tiempo. C) La expresión de OPG fue constante a lo largo del proceso de mineralización *in vitro*. D) El cociente RANKL/OPG aumenta de forma no significativa en los últimos días del proceso. En las figuras se ha representado la media y la desviación estándar de los valores de expresión relativa obtenidos a partir de procesos de mineralización con 4 muestras independientes de osteoblastos primarios



Estudio de la expresión de RANKL y OPG en osteoblastos primarios procedentes de pacientes con fractura y con artrosis

En la Tabla 1 se resume las características de los pacientes de los que se obtuvieron las muestras. No encontramos diferencias significativas en la expresión génica de RANKL, OPG, ni tampoco en el cociente RANKL/OPG, entre los dos grupos de osteoblastos analizados (Tabla 2). Al igual que en los cultivos en medio de mineralización, en ambos grupos la expresión de OPG fue llamativamente superior a la de RANKL. Por otro lado, analizamos los resultados estratificando las muestras por edades. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas, los osteoblastos obtenidos de pacientes artrósicos con edades comprendidas entre los 81 y los 90 años mostraron una clara tendencia a expresar más OPG. Asimismo, el cociente RANKL/OPG fue menor en los cultivos de osteoblastos procedentes de pacientes artrósicos (Tabla 3).

Finalmente analizamos los datos separando las muestras por sexos. No se encontraron diferencias entre hombres o mujeres cuando se compararon los dos grupos de osteoblastos. Del mismo modo, tampoco se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres dentro del mismo grupo (Tabla 4).

Discusión

Desde el descubrimiento del sistema de señalización RANKL-OPG-RANK han sido muchos los estudios diseñados para comprender los mecanismos que regulan este sistema. Los estudios con ratones "knock out" han demostrado que la ausencia de estos genes está directamente relacionada con

cambios en la masa ósea¹⁴. Por tanto, este sistema se ha convertido en una diana terapéutica valiosa para el tratamiento de enfermedades esqueléticas prevalentes como la osteoporosis. De hecho, los anticuerpos frente a RANKL han demostrado reducir el número de fracturas en pacientes osteoporóticas postmenopáusicas¹⁵. Por tanto, parece claro que estamos ante uno de los mecanismos de señalización críticos para la homeostasis ósea, capaz de inclinar la balanza hacia una mayor o menor resorción en función de la relación entre la producción de RANKL y de OPG.

Por el momento, no se conocen con exactitud cuales son los mecanismos que desencadenan el comienzo del remodelado óseo, pero se cree que son los osteocitos los encargados de señalar el lugar y reclutar a los precursores de osteoclastos a la región, supuestamente a través de procesos de quimioatracción^{16,17}. La producción de RANKL por parte de los osteoblastos y, según recientemente se ha publicado, por los osteocitos¹⁸, induce la maduración de los precursores de osteoclastos y el comienzo de la resorción. Sin embargo, osteoclastos y osteoblastos no conviven en el tiempo, ni en el espacio. Por un lado, se sabe que los osteoclastos sufren apoptosis y desaparecen. Por otro lado, nuestros datos procedentes de mineralización *in vitro* usando osteoblastos primarios sugieren que durante la formación ósea hay una mayor expresión génica de OPG que de RANKL. Esto, teóricamente, reduciría las posibilidades de una interacción entre el RANKL y RANK, previniendo así una posible activación de la osteoclastogénesis durante la formación ósea. Curiosamente, la expresión de RANKL y

Tabla 1. Distribución de sexos y edades de las muestras recogidas para el análisis de la expresión de RANKL y OPG

	N			Edad		
	Total	Mujeres	Hombres	Total	Mujeres	Hombres
FRX	28	23	5	81±6	82±6	79±5
ART	26	9	17	75±6	73±9	76±4
Valor p				0,003	0,20	0,02

Tabla 2. Valores de expresión génica (media y desviación estándar) para los genes RANKL y OPG en osteoblastos primarios

	OPG	RANKL	RANKL/OPG
FRX	25,52±4,06	0,024±0,013	0,001±0,0006
ART	45,86±19,67	0,042±0,023	0,042±0,039
Valor p	0,57	0,50	0,81

Tabla 3. Análisis estratificado por edad de la expresión génica de RANKL y OPG en osteoblastos primarios (media y desviación estándar)

	Edad		OPG		RANKL		RANKL/OPG	
	70-80	81-90	70-80	81-90	70-80	81-90	70-80	81-90
FRX	75±1	85±3	24,9±4,7	26,92±6,36	0,02±0,01	0,02±0,02	0,002±0,001	0,0006±0,0002
ART	73±1	82±2	25,0±8,2	133±93,76	0,03±0,02	0,05±0,05	0,049±0,048	0,0001±0,0001
Valor p	0,21	0,14	0,69	0,09	0,57	0,23	0,18	0,052

Tabla 4. Análisis estratificado por sexo de la expresión génica de RANKL y OPG en osteoblastos primarios (media y desviación estándar)

	OPG		RANKL		RANKL/OPG	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂
FRX	26,73±0,01	23,02±7,05	0,028±0,012	0,008±0,004	0,0013±0,0007	0,0003±0,0001
ART	96,77±53,88	18,96±5,02	0,096±0,066	0,014±0,006	0,1131±0,1129	0,0017±0,0011
Valor p	0,35	0,47	0,93	0,31	0,40	0,64

OPG no se vio modificada de forma significativa durante el proceso de mineralización. Sin embargo, sí se observó una ligera tendencia de aumento en la expresión de RANKL en días más avanzados, en los que la mineralización era más patente. Este ligero aumento en la expresión de RANKL se acompaña de un ligero aumento del cociente RANKL/OPG.

La osteoporosis y la artrosis son dos enfermedades esqueléticas que se caracterizan por tener valores de masa ósea opuestos¹⁹. Mientras que los pacientes osteoporóticos presentan una reducción de la masa ósea en comparación con sujetos sanos, los pacientes artrósicos tienden a tener una mayor masa ósea. Dado el impacto que el RANKL y la OPG tienen sobre la homeostasis ósea, cabría espe-

rar que las diferencias en la producción de estas proteínas podrían explicar, al menos en parte, las diferencias en la masa ósea entre estos pacientes. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado recientemente que la producción de RANKL, y en consecuencia el cociente RANKL/OPG está aumentado en el tejido óseo de pacientes osteoporóticos⁹. Otros autores han descrito resultados similares, lo que sugiere que realmente estamos ante un patrón de expresión característico de los pacientes osteoporóticos. En un intento de buscar una explicación a esta disregulación de la expresión de RANKL, estudiamos si había diferencias en la metilación de la región promotora de este gen en el tejido óseo de pacientes osteoporóticos y artrósicos, pero no

fue el caso. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el tejido óseo está formado por diferentes tipos celulares, varios de los cuales son capaces de producir RANKL y OPG. Por ello decidimos estudiar la expresión de estos genes de forma selectiva en osteoblastos primarios procedentes de pacientes osteoporóticos y artrósicos. Al igual que observamos en los osteoblastos primarios en mineralización, tanto en pacientes osteoporóticos como en pacientes artrósicos los valores de expresión de OPG fueron superiores a los de RANKL. En el análisis global de los resultados no encontramos diferencias significativas en la expresión de RANKL u OPG entre los dos grupos estudiados. Estos resultados están en sintonía con observaciones previas realizadas por otros grupos^{20,22}. Tampoco encontramos diferencias al analizar la expresión por sexos o por edades. Sin embargo, sí encontramos una clara tendencia a expresar más OPG en pacientes artrósicos con edades comprendidas entre los 81 y los 90 años, y en consecuencia los mismos pacientes mostraron un cociente RANKL/OPG inferior. En conjunto, estos datos sugieren que las diferencias observadas a nivel de tejido óseo no se deben a que los osteoblastos de pacientes artrósicos y osteoporóticos sean intrínsecamente diferentes en cuanto a la expresión de estos genes. Cabe la posibilidad de que las diferencias a nivel tisular puedan explicarse por la producción diferencial por parte de otros tipos celulares, como los osteocitos o las células del sistema inmune. En consonancia con esto último, el cociente RANKL/OPG encontrado en los cultivos de los osteoblastos primarios era mucho menor que el encontrado a nivel de tejido óseo⁹, lo que supone que otras células distintas a los osteoblastos contribuyen a la producción de RANKL en el tejido óseo. En este mismo sentido, recientemente se ha sugerido que los osteocitos son la fuente principal de RANKL en el hueso, al menos en el ratón¹⁸. Por tanto, es posible especular que las diferencias encontradas puedan deberse a una producción diferencial de RANKL específica en este tipo celular. De hecho, no sería sorprendente que los osteocitos de los pacientes osteoporóticos presentaran una producción anormal de RANKL, pues ya hemos observado en trabajos previos una alteración de la expresión de varios genes implicados en el metabolismo óseo²³. Del mismo modo, las células osteoblásticas de revestimiento, consideradas como osteoblastos inactivos, podrían estar implicadas en las diferencias de expresión de RANKL en el tejido óseo, pues nuestros estudios indican que el patrón de metilación del promotor del gen RANKL permite que estas células sean capaces de expresar tanto RANKL como OPG⁹.

Por otro lado, no debemos olvidar que, al trabajar con células primarias, éstas se encuentran aisladas de su entorno habitual, el microambiente óseo, sin verse estimuladas por factores capaces de modular positiva o negativamente la producción de RANKL y OPG. Diversas moléculas, como la hormona paratiroidea o los estrógenos, entre muchas otras, pueden alterar la expresión de estos

genes y, por tanto, pueden ser responsables de la desregulación descrita en los pacientes osteoporóticos. Finalmente, nuestros análisis se han centrado exclusivamente en la expresión génica, sin valorar la cantidad de proteína presente. En este sentido, trabajos previos han demostrado que, a pesar de no encontrar diferencias a nivel transcripcional, la síntesis de OPG está aumentada en osteoblastos derivados de pacientes osteoporóticos^{20,22}. Las causas de esta desincronización entre los niveles transcripcionales y proteícos son actualmente desconocidas. Cabría especular con una posible desregulación de la expresión de determinados miRNAs capaces de influir en el proceso de traducción del ARN mensajero o cambios en marcas post-traduccionales que afectan la estabilidad o vida media de la proteína. En este sentido, sería interesante realizar estudios que confirmen que las diferencias observadas a nivel de transcripcional también ocurren a nivel proteíco, así como profundizar en los mecanismos post-transcripcionales y post-traduccionales que influyen en la cantidad de proteína producida.

En conjunto, nuestros datos sugieren que las diferencias en la producción de RANKL y OPG encontradas a nivel del tejido óseo entre pacientes osteoporóticos y artrósicos no se deben a las características intrínsecas de los osteoblastos de estos pacientes, sino que han de tener su origen en otras células esqueléticas, o ser la consecuencia de las complejas interacciones celulares y moleculares que tienen lugar en el microambiente óseo. Serán necesarios nuevos estudios centrados en otros tipos celulares para identificar los mecanismos que subyacen a la desregulación de la expresión de RANKL en el hueso osteoporótico.

Financiación: El trabajo fue financiado con una beca AMGEN S.A. (AMGEN--SEIOMM 2009). Jesús Delgado-Calle tiene una beca predoctoral del IFI-MAV. Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Teti, A. Bone development: Overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep* 2011;9:264-73.
2. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1092:385-96.
3. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010;285:25103-8.
4. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008;19:444-51.
5. Boyce BF, Xing, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007;9(Suppl1):S1.
6. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597-602.
7. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008;29:155-92.

8. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
9. Delgado-Calle J, Sañudo C, Fernández AF, García-Renedo R, Fraga MF, Riancho JA. Role of DNA methylation in the regulation of the RANKL-OPG system in human bone. *Epigenetics* 2012;7:83-91.
10. Logar DB, Komadina R, Prezelj J, Ostanek B, Trost Z, Marc J. Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2007;25:219-25.
11. D'Amelio P, Roato I, D'Amico L, Veneziano L, Suman E, Sassi F, et al. Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. *Osteoporos Int* 2011;22:2869-77.
12. Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, Perez-Castrillon JL, Perez-Aguilar MD, Perez-Nuñez MI, et al. Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study. *Osteoporos Int* 2010;21:109-18.
13. Delgado-Calle J, Sañudo C, Sánchez-Verde L, García-Renedo RJ, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone* 2011;49:830-8.
14. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001;142:5050-5.
15. Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, Kendler DL, Wang H, Liu Y, et al. Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2149-57.
16. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 2010;21:1457-69.
17. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26:229-38.
18. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011;17:1231-4.
19. Dequeker J, Aerssens J, Luyten FP. Osteoarthritis and osteoporosis: clinical and research evidence of inverse relationship. *Aging Clin Exp Res* 2003;15:426-39.
20. Giner M, Rios MJ, Montoya MJ, Vázquez MA, Miranda C, Pérez-Cano R. Alendronate and raloxifene affect the osteoprotegerin/RANKL system in human osteoblast primary cultures from patients with osteoporosis and osteoarthritis. *Eur J Pharmacol* 2011;650:682-7.
21. Giner M, Montoya MJ, Vázquez MA, Rios MJ, Moruno R, Miranda MJ, et al. Modifying RANKL/OPG mRNA expression in differentiating and growing human primary osteoblasts. *Horm Metab Res* 2008;40:869-74.
22. Giner M, Rios MA, Montoya MA, Vázquez MA, Naji L, Pérez-Cano R. RANKL/OPG in primary cultures of osteoblasts from post-menopausal women. Differences between osteoporotic hip fractures and osteoarthritis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:46-51.
23. Delgado-Calle J, Arozamena J, García-Renedo R, García-Ibarbia C, Pascual-Carra MA, González-Macías J, et al. Osteocyte deficiency in hip fractures. *Calcif Tissue Int* 2011;89:327-34.