



Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología

www.elsevier.es/rot



INVESTIGACIÓN

Estudio del papel de los miARN en células madre mesenquimales aisladas de pacientes artrósicos



P. Tornero-Esteban^{a,*}, J.A. Hoyas^a, E. Villafuertes^a, I. Garcia-Bullón^b, E. Moro^b, B. Fernández-Gutiérrez^a y F. Marco^b

^a Unidad de Gestión Clínica de Reumatología, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, España

^b Unidad de Gestión Clínica de Traumatología, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, España

Recibido el 24 de octubre de 2013; aceptado el 20 de diciembre de 2013

Disponible en Internet el 28 de febrero de 2014

PALABRAS CLAVE

Células madre mesenquimales;
Microácidos ribonucleicos;
Artrosis

Resumen

Objetivo: Los miARN actúan como silenciadores génicos que están implicados en la regulación de funciones celulares esenciales. El miR-335 participa regulando los procesos de diferenciación celular en células progenitoras. Las células madre mesenquimales (MSC) son células progenitoras de los condrocitos y osteoblastos encargados del mantenimiento homeostático del cartílago y hueso. El objetivo de este estudio era determinar una posible asociación entre la expresión de miR-335 y la enfermedad artrósica.

Metodología: Las MSC obtenidas de la médula ósea de 3 pacientes artrósicos y 3 controles sin signos clínicos de artrosis ni osteoporosis se cultivaron y caracterizaron fenotípica y funcionalmente en el pase 3 de cultivo. Así mismo, mediante PCR cuantitativa se determinaron los niveles de expresión de miR-335 y del gen mesoderm-specific transcript *-MEST-*, que controla su expresión.

Resultados: Se detectaron diferencias entre las MSC aisladas de pacientes con artrosis y los controles en los niveles de expresión de miR-335 y de *MEST* (mediana [rango intercuartílico]: 1,69 [0,85-1,74]; 3,85 [3,20-5,67]). Aunque las diferencias detectadas no alcanzaron una significación estadística ($p = 0,1$), sí se apreció una clara tendencia a una menor expresión de miR-335 en las MSC de pacientes artrósicos.

Conclusiones: Teniendo en cuenta que miR-335 tiene como dianas potenciales diferentes genes que participan en la vía de señalización de la Wnt, la tendencia observada podría determinar, al menos en parte, algunas de las alteraciones que determinan el inicio o progresión de la artrosis, y puede, por lo tanto, servir en el diseño de futuras dianas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

© 2013 SECOT. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mpTORNERO@gmail.com (P. Tornero-Esteban).

KEYWORDS

Mesenchymal stem cells;
Microribonucleic acids;
Osteoarthritis

Study of the role of miRNA in mesenchymal stem cells isolated from osteoarthritis patients**Abstract**

Objective: MiRNAs act as gene silencers that are involved in the regulation of essential cell functions. miR-335 is involved in regulating cell differentiation processes in progenitor cells. Mesenchymal stem cells (MSCs) are progenitor cells of chondrocytes and osteoblasts responsible for homeostatic maintenance of cartilage and bone. The aim of this study was to determine a possible relationship between the expression of miR-335 and osteoarthritis.

Methods: MSCs obtained from the bone marrow of 3 osteoarthritic patients and 3 controls with no clinical signs of osteoarthritis or osteoporosis were cultured and phenotypically and functionally characterised in a 3-step culture. Expression levels of miR-335 and the mesoderm-specific transcript gene *-MEST-* that controls its expression were determined by quantitative PCR.

Results: Differences in the expression levels of miR-335 and *MEST* (median [interquartile range]: 1.69 [0.85-1.74], and 3.85 [3.20-5.67] were detected between MSCs isolated from patients with osteoarthritis and controls. Although the differences detected did not reach statistical significance ($P=.1$), a clear trend towards lower expression of miR-335 in osteoarthritis MSCs was observed.

Conclusions: Given that miR-335 has the different genes involved in the Wnt signalling pathway as potential targets, the observed trend may help to ascertain, at least partially, some of the alterations which determine the onset or progression of osteoarthritis, and can therefore serve for the design of future therapeutic targets for the treatment of this disease.

© 2013 SECOT. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La artrosis es la afectación reumática más prevalente que afecta especialmente a individuos de edad avanzada¹. Se caracteriza por el daño crónico y progresivo de la articulación, la inflamación, el dolor y, en estadios avanzados, una pérdida de la función en las articulaciones afectadas. A nivel tisular, la principal característica de la artrosis es la esclerosis del hueso subcondral y, secundariamente, la pérdida progresiva del cartilago articular². Si bien la alteración de la homeostasis articular, resultante en una pérdida neta de cartilago y formación de osteofitos, es concomitante a la enfermedad, las causas que la originan son desconocidas. A día de hoy, se acepta la etiología multifactorial de la artrosis y su asociación con factores metabólicos, estructurales, genéticos y ambientales³⁻⁶.

Dadas las evidentes alteraciones fisiológicas que ocurren en el cartilago, durante años se asumió que el inicio de la enfermedad comenzaba en aquel; sin embargo, las investigaciones llevadas a cabo en los últimos años han puesto en evidencia la importancia, en el desarrollo de la enfermedad, del hueso subyacente al cartilago (hueso subcondral)⁷⁻¹⁰. En este contexto, nuestro grupo ya describió la existencia de una asociación de un polimorfismo genético que relacionaba al colágeno de tipo X con su menor expresión en las células madre mesenquimales (MSC) de origen artrósico. Estos hallazgos experimentales evidenciaban que el mecanismo responsable de la correcta regeneración del cartilago en la artrosis tenía su origen tanto en una deficiente formación de la matriz extracelular como en posibles alteraciones en el potencial de diferenciación de las MSC hacia condrocitos hipertróficos¹¹.

El papel de las MSC en la enfermedad artrósica no es trivial, ya que son las células progenitoras de osteoblastos y condrocitos, responsables, a su vez, de la síntesis de la matriz extracelular ósea y cartilaginosa y, por lo tanto, esenciales en la formación y regeneración del hueso y cartilago¹².

Teniendo en cuenta estas evidencias, es muy probable que una alteración del proceso de diferenciación en estas células pueda generar anomalías en el desarrollo y homeostasis tisular, contribuyendo en la etiopatogénesis de la artrosis. En este sentido, nuestro grupo describió recientemente la existencia de alteraciones en la vía de la señalización de Wnt/ β -catenina¹¹ en MSC de artrosis. Esta vía es esencial para la regulación de procesos tan importantes como la proliferación, migración y diferenciación celular¹³⁻¹⁵.

La expresión génica es regulada por diferentes mecanismos que permiten o impiden su transcripción y, en última instancia, su función a través de la proteína que codifican. Uno de los mecanismos de regulación más recientemente estudiado es el ejercido por los miARN. Estos son una familia de ARN no codificantes, con un tamaño aproximado de entre 18 y 24 nucleótidos de longitud. Los miARN actúan a modo de silenciadores génicos reprimiendo la traducción del ARN mensajero o induciendo su degradación¹⁶. Así, en función del contexto biológico son potencialmente capaces de modular la actividad señalizadora de una vía de transducción de señales celulares, por ejemplo, implicadas en la diferenciación de las MSC, mediante la represión o activación selectiva de componentes específicos¹⁷.

Recientemente, y debido al interés creciente en el estudio de los miARN en relación con la regulación de la diferenciación tisular, se han identificado varios miARN cuya expresión se encuentra aumentada durante la diferenciación

de MSC a distintos fenotipos mesenquimales. Así, miR-26b¹⁸ y miR-337¹⁹ regularían la diferenciación adipocítica y la condrogénesis, respectivamente. También se han identificado varios miARN que actuarían regulando la diferenciación osteogénica, entre ellos, miR-125b²⁰ y miR-196a²¹. Los antecedentes descritos indican que la expresión de miARN durante la diferenciación de las MSC dirige el compromiso de estas células hacia un linaje específico mediante un control estricto de la expresión génica.

Recientemente se ha propuesto un papel regulador clave de miR-335 en la biología de las MSC, en concreto se ha descrito que miR-335 (codificado por el segundo intrón del gen mesoderm-specific transcript [*MEST*]) tiene entre sus dianas potenciales al gen *DKK1*, un inhibidor de la vía de señalización Wnt²². Dada la importancia de esta ruta en los procesos que tienen lugar durante la diferenciación de las MSC, nuestro objetivo fue establecer la posible relación de miR-335 en la enfermedad artrósica.

Material y métodos

Selección de pacientes y muestras

Se analizaron 2 cohortes consecutivas de pacientes intervenidos de artroplastia total de cadera por artrosis o fractura subcapital. El diagnóstico se basó en criterios del Colegio Americano de Reumatología²³.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una medida de la densidad mineral ósea de la cadera contralateral y de la columna vertebral incluyendo las 4 regiones lumbares y midiendo la T-score < -2,5. Se descartaron aquellos sujetos que presentaron signos de osteoporosis. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado, y el estudio fue aprobado por el Comité Ético institucional.

Los *criterios de inclusión* para los pacientes del estudio fueron:

- Sujetos a los que se sometió a una cirugía de sustitución protésica de cadera por artrosis o fractura subcapital.
- Edad comprendida entre 60-70 años.
- Caucásicos.

Los *criterios de exclusión* para el estudio fueron:

- Presentar enfermedad adicional que afecte al metabolismo del hueso.
- Pacientes que en los 3 meses previos a la cirugía hayan recibido esteroides y/o citostáticos o se les haya administrado antirresortivos.
- Presentar afección reumatológica adicional, como enfermedades sistémicas, espondilitis o artritis reumatoide.

Atendiendo a estos criterios se seleccionaron 3 pacientes de cada cohorte, asumiendo como controles aquellos sujetos que presentaban fractura subcapital, sin signos de artrosis. El día de la cirugía se recogieron los aspirados de médula ósea y se conservaron en frigorífico a 4°C hasta su procesamiento dentro de las 18 h siguientes a su obtención.

Cultivo y diferenciación celular

Cada aspirado medular se diluyó 1:1 con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), y se realizó un gradiente de *Ficoll* para aislar las células mononucleares. Las MSC fueron aisladas por adherencia al soporte de cultivo durante la expansión. El cultivo se realizó en medio DMEM suplementado con 10% de fetal bovine serum y antibióticos¹². Todos los experimentos del estudio se realizaron una vez las células alcanzaron el tercer pase de cultivo confluyente al 80%.

Caracterización de las células madre mesenquimales

La caracterización de las células aisladas se llevó a cabo mediante análisis de la presencia de los marcadores de superficie (CD90-PE, CD73-FITC, CD105-PE y CD166-PE) o ausencia (CD45-PE) por citometría de flujo utilizando un citómetro Cytomics FC500, de Beckman Coulter (Estados Unidos).

Diferenciación de las células madre mesenquimales en 3 linajes celulares: condrogénico, adipogénico y osteogénico

La multipotencialidad de las células aisladas se examinó utilizando los kits de diferenciación osteogénica, condrogénica o adipogénica (Lonza PT-3002, PT-3003 y PT-3004), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Diferenciación osteogénica

Para la diferenciación osteogénica, las MSC se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos con medio de crecimiento de MSC: DMEM + 10% fetal bovine serum. Cuando las células llegaron a confluencia, el medio de crecimiento fue sustituido por un medio que contenía dexametasona, L-glutamina, ácido ascórbico, β -glicerolfosfato y factores de crecimiento para el crecimiento de las MSC (Lonza PT-3002). El cultivo se mantuvo durante 21 días, y la formación de depósitos de calcio fue evaluada con rojo alizarina S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).

Diferenciación condrogénica

Para la diferenciación condrogénica, las MSC se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos con medio de crecimiento de MSC: DMEM + 10% fetal bovine serum. Cuando las células llegaron a confluencia, el medio de crecimiento se sustituyó por un medio que contenía dexametasona, ácido ascórbico, el suplemento insulina transferrina-selenio, piruvato sódico, prolina y L-glutamina y 10 ng/ml TGF- β 3 (Lonza PT-3003). El cultivo se mantuvo durante 28 días, cambiando el medio cada 3. La evaluación de la condrogénesis se realizó mediante tinción con azul de toluidina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).

Diferenciación adipogénica

Para la diferenciación adipogénica las MSC se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos con medio de crecimiento de MSC. La estimulación al linaje adipogénico se

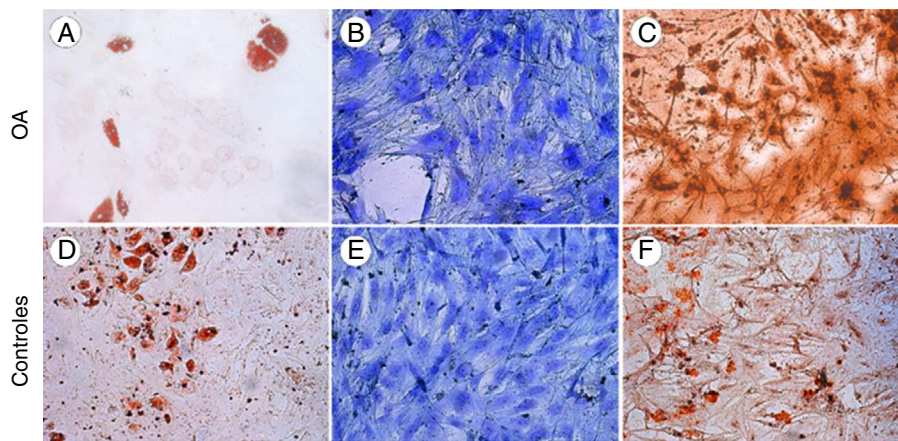


Figura 1 Muestras representativas de MSC aisladas de médula ósea de pacientes con OA y sujetos control tras diferenciación en los linajes adipogénico (A y D), condrogénico (B y E) y osteogénico (C y F).

realizó utilizando 3 ciclos de inducción adipogénico y mantenimiento (Lonza PT-3004). Después de completar los 3 ciclos, las MSC se cultivaron durante 7 días más en el medio de mantenimiento. La evaluación de la adipogénesis se realizó mediante tinciones con Oil Red O (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).

Aislamiento de ácido ribonucleico y transcripción inversa

Para determinar la expresión de miARN se aisló el ARN total de las MSC de sujetos artrósicos y controles, utilizando el protocolo miRNeasy® Mini Kit (Catalog No. 74104, Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos). Los niveles de miR-335 y el gen *MEST* se cuantificaron por RT-PCR utilizando los correspondientes ensayos de expresión génica TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Como controles endógenos de la normalización de miARN y *MEST* se utilizó el RNU48 (pequeño nucleolar ARN, C/D cuadro 48) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, respectivamente.

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante un test no paramétrico (Mann-Whitney), comparando las diferencias entre los cambios de expresión ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) obtenidos ($\Delta Ct = \text{número de ciclos del gen referencia} - \text{número de ciclos del gen problema}$). Los cálculos y gráficas se realizaron mediante el software GraphPad Prism® 5.01. El nivel de significación estadística se estableció para valores $p < 0,05$.

Resultados

Caracterización fenotípica y funcional de las células madre mesenquimales

Para determinar la uniformidad de las poblaciones celulares estudiadas, se realizó una caracterización fenotípica destinada a garantizar la pureza de la población aislada por adherencia y expandida en cultivo. Todas las células del estudio eran positivas para los marcadores de superficie

característicos de las MSC, CD90, CD73, CD105 y CD166. Así mismo, las poblaciones aisladas carecían de marcadores hematopoyéticos como CD45.

Como control de calidad final, se determinó el potencial de las poblaciones aisladas para diferenciarse, en condiciones de estímulo específicas, en 3 linajes mesodérmicos (osteogénico, condrogénico y adipogénico). Todas las poblaciones celulares utilizadas fueron capaces de diferenciarse hacia los distintos linajes (fig. 1).

En conjunto, los resultados indicaban la uniformidad y garantizaban la identidad de las células aisladas para los estudios subsiguientes, en función de los parámetros mínimos establecidos en la bibliografía como definitorias de una MSC, esto es: adherencia al soporte de cultivo, presencia de marcadores específicos y ausencia de marcadores hematopoyéticos, y, finalmente, potencial de diferenciación en 3 linajes mesodérmicos.

Las células madre mesenquimales aisladas de pacientes con artrosis presentaron menores niveles de expresión de miR-335 que las de los controles

Con la finalidad de determinar si los niveles de expresión de miR-335 se asociaban con la enfermedad artrósica, se analizaron los niveles de expresión diferencial de miR-335 en MSC mediante PCR cuantitativa. Los resultados mostraron que en las MSC aisladas de pacientes con artrosis los niveles de expresión de miR-335 eran menores (mediana 3,85 y rango intercuartílico 3,20-5,67) que en las MSC aisladas de sujetos control (mediana 1,69 y rango intercuartílico 0,85-1,74), con $n = 3$ (fig. 2).

Esta menor expresión, aunque no alcanzó significación estadística, sí mostró una tendencia hacia una expresión disminuida.

Discusión

El mecanismo por el cual las MSC son capaces de diferenciarse y comprometerse a un linaje determinado no es del todo conocido, no obstante, se sabe que los miARN ejercen un papel crítico en estos procesos mediante la activación y

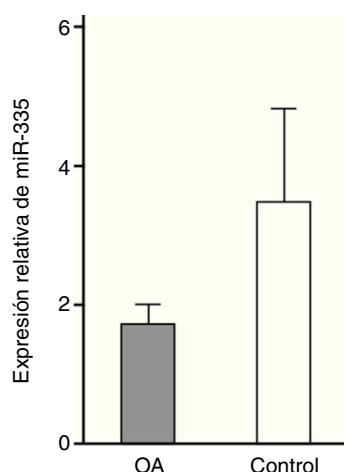


Figura 2 Niveles de expresión génica de miR-335 en MSC humanas obtenidas de pacientes con artrosis (n=3) y sujetos control (n=3).

supresión de diferentes genes a nivel de traducción o a través de interacciones con sus ARN dianas. Se ha planteado que cada miARN es capaz de regular cientos de mensajeros de ARN y que su participación abarca múltiples funciones biológicas que incluyen embriogénesis, organogénesis, diferenciación y apoptosis²⁴. Por lo tanto, las alteraciones en la regulación de miARN y, por extensión, de sus dianas, pueden ser esenciales en el desarrollo de múltiples enfermedades, como se ha descrito para algunos casos de tumorigénesis²⁵ o cardiopatías²⁶, o en el desarrollo de la artrosis^{27,28}.

En este contexto, se ha descrito recientemente que los niveles de expresión de miR-335 son variables durante la diferenciación condrogénica y osteogénica, lo que indica probablemente su papel en el control de la transición entre los fenotipos de células indiferenciadas y diferenciadas y en la regulación del destino celular en los tejidos mesodérmicos²⁹. En apoyo de este posible papel, se sabe que entre los genes diana potenciales de miR-335 se incluyen diferentes factores de transcripción y genes relacionados con el desarrollo del mesoderma (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>).

Las MSC son células progenitoras de condrocitos y osteoblastos y, por tanto, capaces de llevar a cabo la regeneración de los tejidos óseo y cartilaginoso. Dado que en la artrosis ocurre un desequilibrio homeostático de estos tejidos, el objetivo de este estudio fue establecer una posible asociación entre la expresión de miR-335 en MSC y la existencia de un proceso artrósico.

El análisis de los niveles de expresión de miR-335 en MSC indicaba la posible existencia de un patrón de expresión diferencial entre sujetos artrósicos y sujetos control. Aunque estas diferencias no eran significativas, la disminución observada de los niveles del gen *MEST* en MSC de pacientes artrósicos en comparación con sujetos control en un estudio previo realizado por nuestro grupo, en el que se analizaban los datos de un *microarray* de ADN del genoma completo, está en consonancia con estos resultados¹¹.

A pesar de que tanto los niveles de expresión del microARN como del gen *MEST* están claramente reducidos mostrando una tendencia clara a la menor expresión de ambos en MSC de artrosis, la inexistencia de significación

estadística se justifica por el reducido tamaño muestral; así, este trabajo solo puede considerarse como un estudio piloto previo a la realización de nuevos experimentos con un tamaño muestral mayor que permita una validación y el refuerzo de los resultados obtenidos para definir la contribución exacta de miR-335. Este estudio, en consonancia con observaciones de investigaciones previas²⁹, evidencia un papel de miR-335 en la fisiopatología de la artrosis. Concretamente, se ha propuesto un papel regulador clave de miR-335 en la biología de las MSC, concluyendo que la regulación positiva de miR-335 alteraba el fenotipo reparador de las MSC²⁹.

Dado que los microARN actúan regulando la expresión génica es lógico pensar que una reducción en los niveles de expresión de miR-335 constituye posiblemente un factor perjudicial para la regeneración adecuada de los tejidos articulares. Por tanto, se hace necesario llevar a cabo más investigaciones que permitan entender y definir mejor el papel de miR-335 y de otros miARN sobre el control de los mecanismos implicados en la diferenciación y regeneración tisular en la artrosis. Este conocimiento puede también contribuir al desarrollo de futuros enfoques terapéuticos.

Nivel de evidencia

Nivel de evidencia III.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes y que todos los pacientes incluidos en el estudio han recibido información suficiente y han dado su consentimiento informado por escrito para participar en dicho estudio.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Financiación

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación concedida por la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (SECOT) a través de una beca de investigación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Bitton R. The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care*. 2009;15 8 Suppl:S230-5.
2. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;213:34-40.
3. Cimmino MA, Cutolo M. Plasma glucose concentration in symptomatic osteoarthritis: A clinical and epidemiological survey. *Clin Exp Rheumatol*. 1990;8:251-7.
4. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: New insights. Part 1: The disease and its risk factors. *Ann Intern Med*. 2000;133:635-46.
5. Wright GD, Hughes AE, Regan M, Doherty M. Association of two loci on chromosome 2q with nodal osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996;55:317-9.
6. Karlson EW, Mandl LA, Aweh GN, Sangha O, Liang MH, Grodstein F. Total hip replacement due to osteoarthritis: The importance of age, obesity, and other modifiable risk factors. *Am J Med*. 2003;114:93-8.
7. Sniekers YH, Intema F, Lafeber FP, van Osch GJ, van Leeuwen JP, Weinans H, et al. A role for subchondral bone changes in the process of osteoarthritis; a micro-CT study of two canine models. *BMC Musculoskelet Disord*. 2008;9:20.
8. Muraoka T, Hagino H, Okano T, Enokida M, Teshima R. Role of subchondral bone in osteoarthritis development: A comparative study of two strains of guinea pigs with and without spontaneously occurring osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3366-74.
9. Shibakawa A, Yudoh K, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Nakamura H. The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13:679-87.
10. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: Reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1193-206.
11. Lamas JR, Rodríguez-Rodríguez L, Vigo AG, Alvarez-Lafuente R, López-Romero P, Marco F, et al. Large-scale gene expression in bone marrow mesenchymal stem cells: A putative role for COL10A1 in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1880-5.
12. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
13. Miki T, Yasuda SY, Kahn M. Wnt/beta-catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev*. 2011;7:836-46.
14. Zimmerman ZF, Moon RT, Chien AJ. Targeting Wnt pathways in disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;1:4-11.
15. Moon RT, Kohn AD, de Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: Diseases and therapies. *Nat Rev Genet*. 2004;5:691-701.
16. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350-5.
17. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.
18. Song G, Xu G, Ji C, Shi C, Shen Y, Chen L, et al. The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. *Gene*. 2014;533:481-7.
19. Zhong N, Sun J, Min Z, Zhao W, Zhang R, Wang W, et al. MicroRNA-337 is associated with chondrogenesis through regulating TGFBR2 expression. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20:593-602.
20. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;368:267-72.
21. Kim YJ, Bae SW, Yu SS, Bae YC, Jung JS. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *J Bone Miner Res*. 2009;24:816-25.
22. Zhang J, Tu Q, Bonewald LF, He X, Stein G, Lian J, et al. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1. *J Bone Miner Res*. 2011;26:1953-63.
23. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988;31:315-24.
24. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*. 2005;132:4653-62.
25. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med*. 2009;60:167-79.
26. Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:419-29.
27. Hong E, Reddi AH. MicroRNAs in chondrogenesis, articular cartilage, and osteoarthritis: Implications for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18:445-53.
28. Song J, Kim D, Lee CH, Lee MS, Chun CH, Jin EJ. MicroRNA-488 regulates zinc transporter SLC39A8/ZIP8 during pathogenesis of osteoarthritis. *J Biomed Sci*. 2013;20:31.
29. Tomé M, López-Romero P, Albo C, Sepúlveda JC, Fernández-Gutiérrez B, Dopazo A, et al. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2011;18:985-95.