

# Búsqueda de agonistas LGR4 como antirresortivos en el tratamiento de la osteoporosis.

Nerea Baños Sánchez<sup>a</sup>, Esperanza Lezana Juberías<sup>b</sup>, Irene de Miguel García<sup>c</sup>,  
Lucía Serrano Garcíad<sup>d</sup>

Departamento de Biología de Sistemas. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. Spain.

a. nere11a@hotmail.com b. esperanzalezana@gmail.com c. irenedemiguelgarcia@gmail.com  
d. luchiserga@gmail.com

IV Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2019.  
20-22 de marzo, 2019. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España  
Sesión de paneles.

**Palabras clave:** osteoporosis; LGR4; diana terapéutica; ensayos HTS

## Resumen

La osteoporosis es una enfermedad metabólica caracterizada por la pérdida de masa ósea, el deterioro del tejido óseo y la alteración de la microarquitectura ósea. Es un problema sanitario a nivel global, afectando a más de 200 millones de personas, y, debido al aumento de la esperanza de vida con el paso de los años, la osteoporosis podría convertirse en una epidemia mundial. La fisiopatología de la osteoporosis se basa en un desequilibrio entre la formación y resorción ósea, donde la formación se ve disminuida mientras que la resorción aumenta. Dado que el desequilibrio entre osteoclastos y osteoblastos resulta en el desarrollo de enfermedades óseas es fundamental una estricta regulación de la diferenciación de los osteoclastos, responsables de la reabsorción ósea. La diferenciación de los osteoclastos está regulada por los osteoblastos a través de la secreción de RANKL y OPG. Recientemente se ha identificado la presencia de un nuevo receptor para RANKL en osteoclastos, el receptor 4 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR4). LGR4 compite con RANK por la unión a RANKL, por lo que atenúa la activación de RANK. Además, la activación de LGR4 consigue impedir la transcripción de los genes responsables de la osteoclastogénesis a través de NFAT-C1. LGR4 ejerce un importante papel en el control de la diferenciación de los osteoclastos mediante mecanismos de retroregulación negativa. Por tanto, planteamos que la estimulación de LGR4 mediante el uso de agonistas podría ser un buen objetivo terapéutico para tratar la osteoporosis. Con este fin, proponemos LGR4 como diana a partir de la cual potenciar dicha regulación negativa. De este modo, sugerimos iniciar una búsqueda de agonistas de LGR4 a partir de una colección de nuevas moléculas que serán sometidas a un cribado de alto rendimiento donde se seleccionarán aquellas capaces de activar LGR4. A continuación, se realiza un segundo cribado con el fin de descartar aquellos compuestos que también activen RANK y promuevan en último término la diferenciación a osteoclastos, evento contrario a nuestro objetivo.

**Cita:** Baños Sánchez, Nerea; Lezana Juberías, Esperanza; de Miguel García, Irene; Serrano Garcíad, Lucía (2019) Búsqueda de agonistas LGR4 como antirresortivos en el tratamiento de la osteoporosis. Actas del IV Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2019. 20-22 de marzo, 2019. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España. Sesión de paneles. *dianas* 8 (1): e201903fa01. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e201903fa01](http://journal.dianas.e201903fa01) <http://www3.uah.es/dianas?e201903fa01>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Baños-Sánchez N, Lezana-Juberías E, de-Miguel-García I, Serrano-Garcíad L. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



## Introducción

La osteoporosis es una enfermedad metabólica, caracterizada por la pérdida de masa ósea, el deterioro del tejido óseo y la alteración de la microarquitectura ósea. Esto se traduce, en un aumento en la susceptibilidad de sufrir fracturas óseas, lo que conlleva un importante gasto en las intervenciones quirúrgicas. Se estima que por cada un 10% de disminución en la masa ósea, el riesgo de fractura se duplica, lo que produce un incremento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes [1].

Considerado un problema sanitario a nivel global, ya que afecta a más de 200 millones de personas, predomina en mujeres, caucásicos y personas de edad avanzada. Puesto que la esperanza de vida va aumentando conforme al paso de los años, la osteoporosis está cada vez más cerca de ser considerada una epidemia a nivel mundial [1].

## Fisiopatología de la osteoporosis

El hueso es un tejido que está en constante formación y destrucción a lo largo de toda la vida. Este fenómeno se conoce como el remodelado óseo y se lleva a cabo por medio de la unidad de remodelación ósea que consiste en un conjunto de células encargadas de destruir pequeñas porciones de hueso, que son posteriormente sustituidas por hueso nuevo. El remodelado óseo tiene dos funciones principales: en primer lugar, al sustituir el tejido óseo viejo por joven, aumentando la resistencia del esqueleto a las fracturas y en segundo lugar, asegurando la disponibilidad de minerales como el calcio, el fósforo o el magnesio, para ser transportado del hueso al líquido extracelular y viceversa, de acuerdo con las necesidades del organismo. En el hueso encontramos tres tipos de células: osteoblastos: células derivadas de tejido conectivo encargados de formar la matriz ósea. Para ello sintetizan fosfatasa alcalina (ALP). Por otro lado, tenemos los osteocitos, que una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. A su vez se encuentran los osteoclastos (macrófagos especializados en destruir hueso): encargadas de la reabsorción de la matriz ósea. La osteoporosis se basa en un desequilibrio entre la formación y resorción ósea, es decir, la formación se ve disminuida mientras que la resorción está aumentada [1].

## Tratamiento de la osteoporosis

Actualmente, el tratamiento de la osteoporosis consiste en una terapia dual de agentes anabólicos junto con antirresortivos con la finalidad de producir un aumento en la formación del hueso y una disminución de su resorción. En la terapia con antirresortivos se encuentran los bifosfonatos y el Denosumab (anticuerpo monoclonal anti RANKL); en cuanto a la anabólica se encuentran la PTH, PTHrp, Teripatida y Abaloparatida. Aunque se han desarrollado nuevos tratamientos, muchos de ellos han sido retirados debido a los efectos secundarios. Tal es el caso de un inhibidor de esclerostina con acción dual denominado Romosozumab, la FDA denegó su aprobación debido al riesgo cardiovascular que provoca. También se ha suspendido el desarrollo del inhibidor de CatK, llamado Odanacatib por el riesgo asociado de producir accidente cerebrovascular. Con todos estos tratamientos, actualmente los bifosfonatos son la primera línea farmacológica, no obstante, se desconoce su seguridad a largo plazo [2]. Por lo tanto, la osteoporosis constituye un problema a nivel social, sanitario y económico, siendo necesario desarrollar nuevos tratamientos que sean efectivos y seguros a largo plazo. Por ello, decidimos seleccionar esta enfermedad y buscar una nueva diana terapéutica sobre la cual poder actuar suprimiendo los efectos adversos que los anteriores fármacos han demostrado tener.

## Vías de señalización y posibles dianas terapéuticas

Dado que el desequilibrio entre osteoclastos y osteoblastos resulta en el desarrollo de enfermedades óseas es fundamental una regulación estricta de la diferenciación de los osteoclastos, responsables de la reabsorción ósea. La diferenciación de los osteoclastos está regulada por los osteoblastos a través de la secreción de dos moléculas, RANKL y OPG [3].

La osteoclastogénesis requiere la señalización RANK. La unión de RANKL al receptor RANK induce su trimerización, favoreciendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras asociadas al mismo como TRAF6. Finalmente, promueve la activación de distintas vías de señalización, NF- $\kappa$ B y MAPK, que en último término aumentan la expresión de factores transcripcionales como AP-1 (c-fos) y MYC, encargados de inducir la expresión de NFAT-C1. NFAT-C1 (factor nuclear del citoplásmico 1 de las células T activadas) es un factor transcripcional fundamental en la diferenciación de los osteoclastos. La interacción entre RANKL y RANK está a su vez controlada por la osteoprotegerina (OPG) liberada por los osteoblastos. La OPG actúa como receptor señuelo de RANKL, de modo que compite con RANK por la unión al ligando RANKL y, por tanto, regula negativamente la osteoclastogénesis [4].

Recientemente se ha identificado la presencia de un nuevo receptor para RANKL en osteoclastos, el receptor 4 acoplado a la proteína G que contiene repeticiones ricas en leucina (LGR4). LGR4 compite con RANK por la unión a RANKL, por lo que atenúa la activación de RANK. Además, la activación de LGR4 activa G $\alpha$ q, que resulta en la activación de GSK3- $\beta$ , responsable de la fosforilación de NFAT-C1 y la consiguiente salida del núcleo. De este modo, NFAT-C1 no transcribe los genes responsables de la osteoclastogénesis. Por todo ello, LGR4 ejerce un importante papel en el control de la diferenciación de los osteoclastos mediante mecanismos de retroregulación negativa [5].

## Diana terapéutica

Teniendo en cuenta los mecanismos moleculares y celulares de la patología de la osteoporosis y conociendo la existencia fisiológica de bucles de retroalimentación encargados de atenuar la diferenciación de los osteoclastos, nuestro objetivo es desarrollar terapias que potencien estos mecanismos de regulación intrínsecos y consigan frenar la resorción ósea. Con este fin, proponemos LGR4 como diana a partir de la cual potenciar dicha regulación negativa.

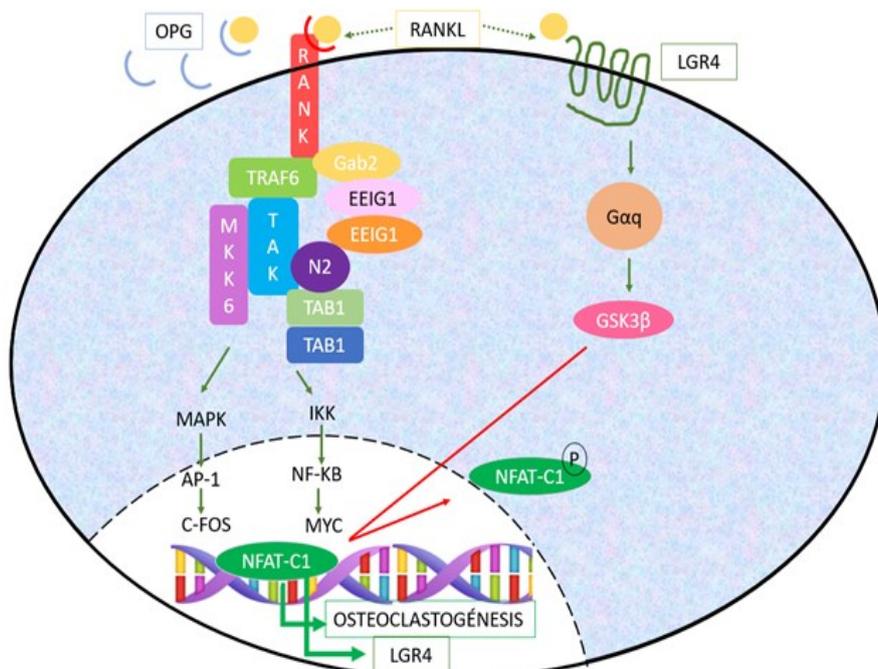


Figura 1.- Vía de señalización RANK/RANKL en la osteoclastogénesis.

En la actualidad, el tratamiento de la osteoporosis se basa en la combinación de terapias anabólicas que estimulen la formación ósea seguidas de un antirresortivo. Las terapias antirresortivas se han focalizado sobre RANK y RANKL con el objetivo de bloquear dicha señalización. Sin embargo, el bloqueo de la señalización desde RANK suprime los mecanismos de retroalimentación negativa intrínsecos. Además, se ha demostrado que esta señalización desempeña un papel fundamental en una amplia gama de procesos biológicos, por lo que sería interesante utilizar dianas que ejerzan un papel en los osteoclastos pero no en otros tipos celulares. Finalmente, es necesaria una terapia dual capaz de atenuar la resorción ósea y promover la reparación ósea. LGR4 también se expresa en osteoblastos regulando su diferenciación [6]. Por tanto, proponemos que la estimulación de LGR4 mediante el uso de agonistas podría ser un buen objetivo terapéutico para tratar la osteoporosis.

### Desarrollo de los HTS

Una vez obtenida nuestra quimioteca de potenciales agonistas de LGR4, nuestro objetivo es seleccionar aquel compuesto de la librería capaz de activar nuestra diana, LGR4. Para ello, se ha diseñado un ensayo de cribado de alto rendimiento o high trough screening (HTS) in vitro mediante el cual determinar la activación de LGR4.

A continuación, se realiza un segundo cribado con el fin de descartar aquellos compuestos que además de estimular nuestra diana, también activen RANK y promuevan en último término la diferenciación a osteoclastos, evento contrario a nuestro objetivo.

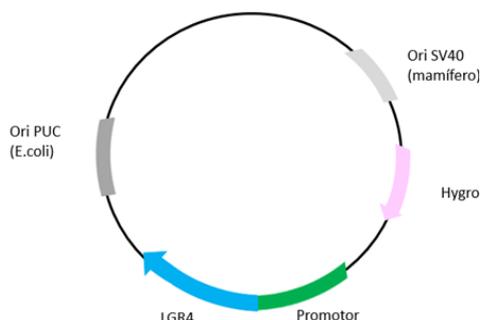


Figura 2.- Diseño del plásmido [LGR4/Hygro]. Plásmido que permite la selección de las células transfectadas con el vector que porta los genes codificantes del receptor LGR4 gracias a conferir resistencia a la higromicina.

### Ensayo de activación de LGR4

Para identificar la activación de LGR4 se realiza un ensayo de segundo mensajero basado en células. Se utiliza la línea celular de macrófagos RAW264.7 por su gran capacidad para diferenciarse a osteoclastos.

Para poder estudiar el efecto de los compuestos sobre el receptor, las células son transfectadas con el vector [LGR4/Hygro] usando como medio de transfección lipofectamina. Tras 48 horas de la transfección, se procede a la selección de las células que hayan incorporado el plásmido y, que, por tanto, vayan a expresar finalmente LGR4 en su membrana mediante la adición de Higromicina B, sobreviviendo únicamente las células resistentes al antibiótico.

La detección de la activación de LGR4 se realiza mediante un ensayo de segundo mensajero. Los segundos mensajeros están más cerca de los eventos iniciales de la señalización de GPCR, por lo que los análisis de segundos mensajeros reflejan directamente el efecto que tiene un compuesto sobre el receptor. Estos ensayos son, por tanto, más confiables que el ensayo gen reportero para medir la actividad de un GPCR. De este modo, realizamos el ensayo IP-One que utiliza el formato de detección HTRF (transferencia de energía por resonancia de FÖRSTER), basado en la metodología FRET, para medir la actividad de nuestro GPCR acoplado a proteína Gαq.

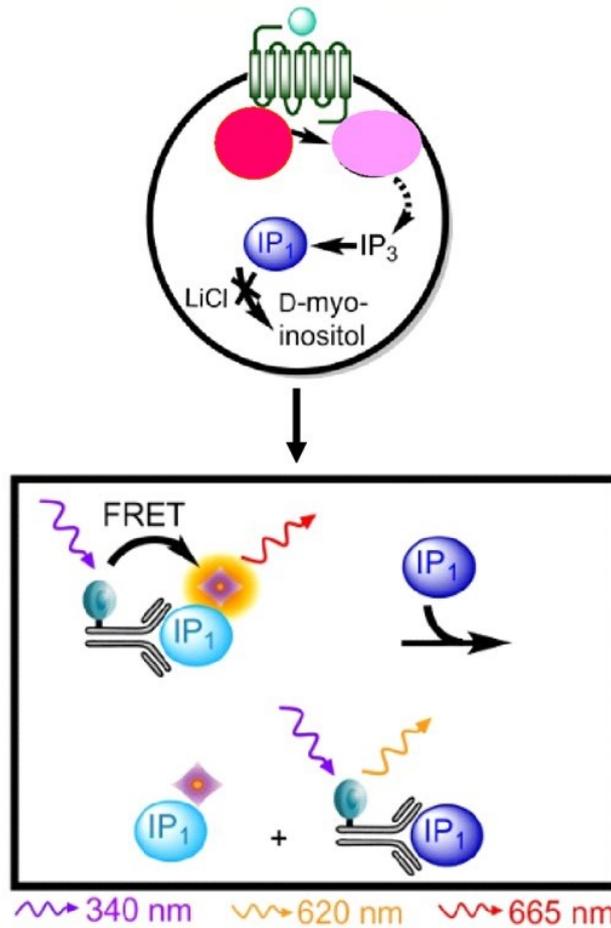


Figura 3.- Ensayo IP-One con formato de detección HTRF. Inmunoensayo competitivo que utiliza un Ac específico para cuantificar la cantidad de IP1 acumulado en la célula. La unión de un agonista a LGR4 conduce a la activación de una proteína Gαq, desencadenando la formación del segundo mensajero IP3 a través de la activación de la PLC. El IP3 es rápidamente metabolizado a IP2, a continuación, a IP1 y por último D-mio-inositol. Para evitar la conversión de IP1 a D-mioinositol se utiliza LiCl (cloruro de litio). La detección se basa en la competencia por los sitios de unión al anticuerpo anti-IP1 entre el IP1 administrado y etiquetado con el aceptor d2 y el IP1 producido por la célula. El anticuerpo está marcado con un donador, que tras ser excitado retorna a su estado fundamental y emite una longitud de onda coincidente con el espectro de absorción del aceptor d2 unido al IP1 administrado. De este modo, cuando el IP1 se acumula en la célula desplaza la unión del conjugado IP1-d2 al anticuerpo y conduce a una disminución de la señal FRET detectada.

Los macrófagos transfectados expresan LGR4. Para la búsqueda de agonistas del receptor se les administra en cada pocillo un compuesto de nuestra librería. De este modo, si el compuesto resulta ser agonista, se producirá un aumento de los niveles intracelulares de IP1. Para cuantificar estos niveles mediante el ensayo IP-One, se realiza una lisis previa de las células y se añaden los reactivos del HTRF, el anticuerpo anti-IP1 y el conjugado IP1-d2. Finalmente se procede a cuantificar la emisión de fluorescencia. Un aumento en los niveles de IP1 endógeno conducirá a un desplazamiento del conjugado, y, por tanto, una disminución de la fluorescencia detectada.

En función de los resultados obtenidos, se seleccionan aquellos compuestos capaces de unirse y activar el receptor LGR4. A continuación, dichos compuestos se someten a un segundo cribado que permita descartar aquellos capaces de activar el receptor RANK.

### Ensayo de activación de RANK

En cuanto a la detección de activación de RANK, se procede a realizar un ensayo de bioluminiscencia con un gen reportero o informador, el cual aporta una señal proporcional a la expresión del gen de interés. La línea celular usada es RAW264.7, utilizando para la transfección el plásmido pBlueScrip-Sk[Luc2p/NFκB-RE/Hygro/RANK] y lipofectamina como medio para la reacción. De esta forma, conseguimos expresar en la membrana de estas células el receptor RANK, con el objetivo de poder evaluar la actividad de la vía.

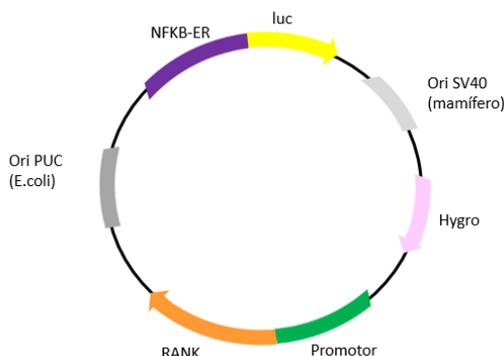


Figura 4.- Diseño del plásmido [RANK/Hygro]. Plásmido que permite la selección de las células transfectadas con el vector que porta los genes codificantes del receptor RANK debido a la resistencia frente a la higromicina.

Tras 48 horas de la transfección, se añade higromicina B y se seleccionan las células resistentes, ya que estas han incorporado el vector y expresarán finalmente RANK. A continuación, éstas células se someten a la acción de los compuestos que han logrado superar el primer cribado. Los compuestos capaces de unirse, así como también activar RANK, conducirán a una activación de la vía NF-κB. NF-κB es un factor transcripcional, capaz de unirse al DNA a través de su elemento de respuesta específico. El plásmido transfectado incorpora dicho elemento de respuesta como promotor de la luciferasa. Por lo tanto, aquel compuesto que sea capaz de unirse a RANK activará a NF-κB y en último término inducirá la expresión de la luciferasa. Esta última, será detectada y cuantificada tras la adición de su reactivo D-Luciferina. De esta manera, la luciferasa será oxidada a oxiluciferina con la consiguiente emisión de bioluminiscencia.

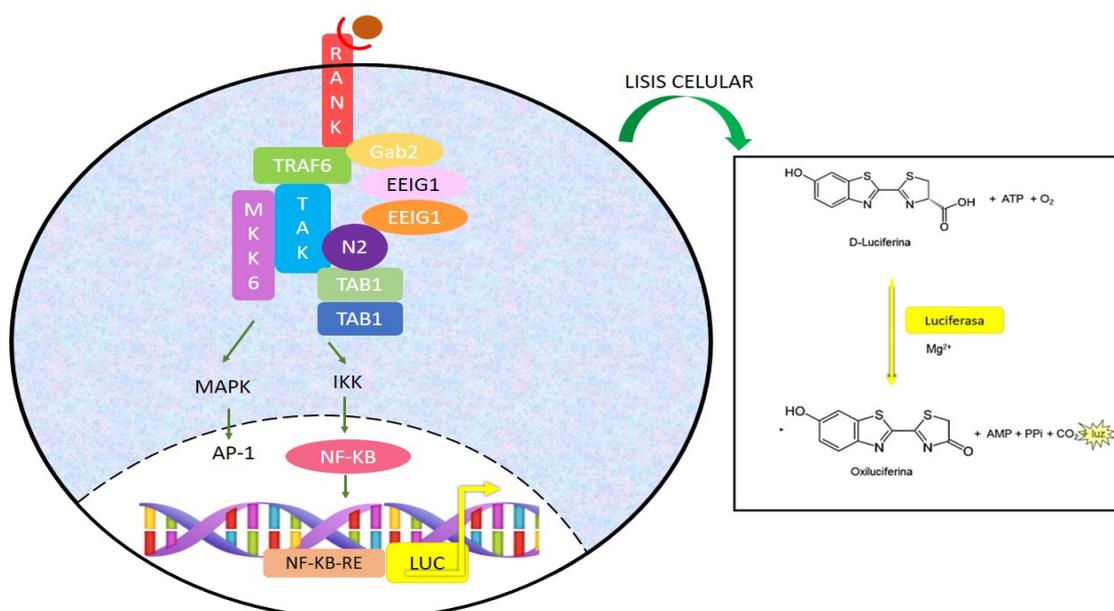


Figura 5.- Ensayo de bioluminiscencia con gen reportero. Los compuestos seleccionados del primer cribado se incorporan a las células resistentes a higromicina. La unión y activación de los compuestos desencadena la activación de la vía de señalización y en último término también a NF-κB, produciendo la expresión de luciferasa que en presencia de D-Luciferasa produce bioluminiscencia. Por tanto el compuesto es capaz de activar RANKL y es descartado.

La finalidad de este cribado es descartar aquellos compuestos que además de activar la señalización de LGR4 activen la vía RANK, ya que de este modo contrarrestarían el efecto inhibitorio deseado. Los compuestos seleccionados, es decir, aquellos capaces de activar la señalización de LGR4, pero no de RANK, serían los cabezas de serie.

A partir de los compuestos seleccionados se podrían sintetizar derivados químicos con distintas propiedades en cuanto a la eficacia, potencia, especificidad y toxicidad, excluyendo finalmente aquellos menos válidos desde el punto de vista farmacológico.

### Ensayo *in vitro*

Se realiza un cultivo mixto de osteoblastos junto con osteoclastos (obtenidos a partir de fragmentos de trabéculas óseas femorales mediante cirugía ortopédica), con el fin de reproducir las condiciones fisiológicas de la regulación característica del remodelado óseo.

Posteriormente, el cultivo es sometido a la acción de los candidatos a fármaco con el objetivo de evaluar su efecto sobre la diferenciación de osteoclastos. Se utilizan distintas dosis.

Dado que NFAT-C1 es un factor transcripcional esencial para regular la expresión de los genes responsables de la osteoclastogénesis, se procede a la cuantificación de sus niveles como indicador del efecto que tienen los candidatos a fármaco sobre este proceso. En primer lugar, se requiere la separación de osteoblastos y osteoclastos mediante citometría de flujo gracias a la identificación de marcadores específicos de tipo celular. Para identificar los osteoclastos en citometría se utilizan anticuerpos específicos de linaje de estas células, como son TRAP (fosfatasa ácida tartrato resistente) CL-R (receptor de calcitonina), así como catepsina-k. Para obtener los osteoblastos, se usan anticuerpos específicos de linaje de este tipo celular como CXCL12 o Anexina II [7].

Una vez obtenidos los osteoclastos se produce su lisis celular y la extracción de proteínas. Finalmente, los niveles de NFAT-C1 se determinarán mediante WB. Los niveles de NFAT-C1 deberían disminuir como consecuencia del efecto del compuesto candidato a fármaco, reduciendo así la osteoclastogénesis.

Así mismo, se realizan ensayos MTT y resazurina con el fin de estudiar la viabilidad de las células sometidas al tratamiento propuesto.

### Ensayo *in vivo*

Para observar el posible efecto de nuestro fármaco *in vivo*, se elige un modelo murino de osteoporosis, obtenido a partir de ovariectomía (C57BL/6J mice) [8]. La patología se diagnostica mediante Densitometría dual de rayos X y cuantificación de marcadores de resorción ósea en suero. La densitometría permite evaluar el remodelado óseo mediante un análisis de densidad ósea a partir de la visualización de trabéculas óseas (generalmente en fémur) de ratón [9]. Entre los marcadores de resorción ósea encontramos los telopéptidos carboxiterminales (ICTP, CTX) y aminoterminales (NTX) del colágeno, además de la fosfatasa ácida tartrato resistente 5b (FATR 5b), que al tratarse de una enzima lisosómica de osteoclastos nos permite cuantificar la actividad de estas células y, por tanto, la resorción ósea [10]. La cuantificación es realizada mediante la técnica de Western blot a partir del suero del ratón.

Ambos métodos de análisis se realizan previa y posteriormente a la administración de nuestro fármaco con el fin de analizar el efecto de este en el avance de la enfermedad. Debido a que el proceso de remodelación ósea está comprendido entre 3 y 6 meses, se realiza el primer diagnóstico, se administra la terapia propuesta y se vuelven a realizar los métodos diagnósticos 6 meses después [11].

Nuestro fármaco será efectivo si produce una disminución significativa (40-70%) en los marcadores de resorción, así como un aumento en la densidad ósea tras administrar el fármaco.

## Perspectivas futuras

### Efectos secundarios

Un aspecto importante en el modelo *in vivo*, sería descartar la existencia de posibles efectos tóxicos del compuesto, ya que LGR4 es un receptor GPCR implicado en diversas vías de señalización entre las que se encuentran Wnt/ $\beta$  catenina y la vía de los inosítoles. Así mismo, también se relaciona con distintos procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos, pues está involucrado en remodelado óseo, cáncer, diferenciación...

Aunque en nuestro ensayo nos centraremos en LGR4 de tejido óseo, concretamente en osteoclastos, también se encuentra localizado en otros tejidos como epidermis, células de Paneth en intestino, folículos pilosos, colon, órganos reproductores, riñón, células de los islotes pancreáticos, aspecto a tener en cuenta a la hora de prevenir la toxicidad de la terapia dirigida hacia este receptor [12,13].

## Vehiculización de fármacos: direccionamiento del fármaco a los osteoclastos

En la actualidad se están empleando nanopartículas para dirigir fármacos debido a que mejoran la solubilidad, disminuyen la toxicidad de estos, y favorecen la liberación del mismo en el sitio adecuado. Además, su pequeño tamaño permite flexibilidad en la orientación y no produce una activación del sistema inmune. Estas nanopartículas se han empleado sobre todo en la metástasis ósea

En nuestro caso, se ha identificado a los bifosfonatos como buenos candidatos para dirigir las nanopartículas debido a que estos actúan sobre la Hidroxiapatita presente en el hueso (HA). Nuestra estrategia es la de acoplar bifosfonatos a los ácidos glicólicos poliméricos que luego se mezclan con polímeros anfipáticos que crean nanopartículas por fuerzas no covalentes entre las que se encuentran las de Van der Waals y enlaces de hidrógeno. En estas partículas es donde vamos a introducir nuestro fármaco (agonista del receptor LRG4). Dependiendo de la naturaleza de nuestro fármaco, este se va a encontrar en el interior (naturaleza hidrofílica), o en el exterior (naturaleza hidrofóbica). En concreto nos vamos a centrar en el risedronato que se une a la hidroxiapatita. Este risedronato se une a nanopartículas de ácido metoxi poli (etilenglicol) -poli láctico-co-glicólico (mPEG-PLGA), y es capaz de dirigirlas a hueso. Otra opción es la desarrollar un sistema de direccionamiento de NP compatible biodegradable que utiliza poli (d, l) lactida-ácido co-glicólico conjugado a alendronato [14].

Una vez hecho esto, ya tenemos las nanopartículas en hueso, pero tenemos que hacer que vayan específicamente a los osteoclastos. Aquí lo que estudiamos fue una proteína de membrana específica de los osteoclastos para que nuestro fármaco se pudiera liberar de forma específica en el osteoclasto, debido a que el receptor LRG4 también se encuentra en los osteoblastos. Una vez realizado lo anterior, nos encontramos analizando cuál resultaría ser la mejor estrategia para llegar de forma específica hasta los osteoclastos. Podemos hacerlo mediante anticuerpos, teniendo en cuenta los receptores y moléculas presentes en la superficie de la membrana de los osteoclastos. Aquí nuestras potenciales dianas son: receptor de calcitonina, K catepsina, integrina  $\alpha\beta3$ . En cuanto a la vía de administración, las nanopartículas se administran vía oral o endovenosa. En nuestro caso aún estamos desarrollando el mejor modelo farmacocinético debido a que los bifosfonatos tienen una baja biodisponibilidad, sobre todo cuando se administran junto con comida o líquidos, y, por ello, nos estamos planteando la opción de la administración endovenosa para eliminar así este problema.

## Discusión

La osteoporosis es una patología que afecta a 200 millones de personas en todo el mundo, constituyendo un problema a nivel social, sanitario y económico. Consiste en un desequilibrio de la homeostasis del hueso, produciéndose un aumento de la degradación ósea y una disminución su síntesis [1].

En el proceso de resorción ósea, se encuentra implicado el ligando de RANK (RANKL), que, al unirse a su receptor, RANK, activa vías de señalización que desencadenan la formación de osteoclastos, células encargadas de la degradación de hueso. Sin embargo, RANKL posee otro receptor, LGR4 asociado a proteínas G, que actúa como regulador negativo de este proceso de degradación [4,5]. La activación de este receptor disminuiría la resorción ósea, siendo LGR4 una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la osteoporosis.

Nuestro proyecto de estudio se basa en identificar agonistas de LGR4 capaces de potenciar la regulación intrínseca de la resorción ósea [6]. Por tanto, mediante el agonista identificado estaríamos potenciando una vía fisiológica, lo que reduciría considerablemente los efectos adversos y podría sustituir o usarse en combinación con los tratamientos disponibles actualmente.

## Bibliografía

1. Sosa- Henríquez, M. and Gómez- Díaz, J. 2010. La osteoporosis. Definición. Importancia. *Fisiopatología y Clínica*, 2 (Supl 5): S3-S7.
2. Tu KN, Lie JD, Wan CK, Cameron M, Austel AG, Nguyen JK, Van K, Hyun D. Osteoporosis: a review of treatment options. *Pharmacy and Therapeutics*. 2018 Feb;43(2):92.
3. Zaidi, M. and Iqbal, J. 2016. Closing the loop on the bone-resorbing osteoclast. *on Nature Medicine*, 22: 460-461.
4. Takahashi, N., Maeda, K., Ishihara, A., Uehara, S. and Kobayashi, Y. 2011. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *on Frontiers in bioscience*, 1(16):21-30.
5. Van Dam, P.A., Verhoeven, Y., Trinh, X.B., Wouters, A., Lardon, F., Prenen, H., Smits, E., Baldewijns, M. and Lammens, M. 2019. RANK/RANKL signaling inhibition may improve the effectiveness of checkpoint blockade in cancer treatment. *on Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 133:85-91.

6. Luo, J., Yang, Z., Ma, Y., Yue, Z., Lin, H., Qu, G., Huang, J., Dai, W., Li, C., Zheng, C., Xu, L., Chen, H., Wang, J., Li, D., Siwko, S., Penninger, J.M., Ning, G., Xiao, J. and Liu, M. 2016. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. on *Nature Medicine*, 22(5):539-46.
7. Bertini, K., Drnovsek, M., Echin, M., Ercolano M., Mingote, E. and Rubin, Z. 2014. Osteoimmunology: An Integrated Vision of Immune and Bone Systems. Novel Perspectives for Bone Diseases. on *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*. 51:25-29.
8. Zhu, C., Zheng, X.F., Yang, Y.H., Li, B., Wang, Y.R., Jiang, S.D. and Jiang, L.S. 2016. LGR4 acts as a key receptor for R-spondin 2 to promote osteogenesis through Wnt signaling pathway. on *Cellular signalling*. Aug 1;28(8):989-1000.
9. Brem J.J., Lanari Zubiaur A.E., Trulls H.E., Pochon D.O. and Picot J.A. 2002. Densitometría ósea en ratas deficientes en cobre. In *Anales de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la SGCYT–UNNE*.
10. Romero Barco, C.M., Manrique Arija, S. and Rodríguez Pérez, M. Marcadores bioquímicos en osteoporosis. 2012. Utilidad en la práctica clínica. on *Reumatología Clínica*, 1;8(3):149-52.
11. Gómez, J.G. 2008. El proceso de remodelación ósea. *Ortho-tips*.;4(3):170-6.
12. Mustata R.C., Van Loy T., Lefort A., Libert F., Strollo S., Vassart G., Garcia M.I. 2011. Lgr4 is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells ex vivo. on *EMBO reports*. 1;1,(6):558-64.
13. Yi J., Xiong W., Gong X., Bellister S., Ellis L.M. and Liu Q. 2013. Analysis of LGR4 receptor distribution in human and mouse tissues. on *PLoS One*, 21;8(10):e78144.
14. Stapleton, M., Sawamo, J., Almérciga-Díaz, C., Mackenzie, W., Mason, R., Orii, T. and Tomatsu, S. 2017. Development of Bone Targeting Drugs, 18(7): 1345.